Universitat Autònoma de Barcelona

ESTATINAS Y AUTOIMNUNIDAD. MÉTODOS DE DETECCIÓN E IMPORTANCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HMGCR

Marcelo Alvarado Cárdenas

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

ESTATINAS Y AUTOIMNUNIDAD. MÉTODOS DE DETECCIÓN E IMPORTANCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HMGCR

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Marcelo Alvarado Cárdenas

2018

Directores

Albert Selva O'Callaghan

Iago Pinal Fernández

A mi Madre y Hermanos.

A la memoria de mi Padre.

“Acquire the art of detachment, the virtue of method, and the quality of thoroughness, but above all the grace of humility.”

Sir. William Osler (1849-1919).

The Book of Unusual Quotations **(1957)**

by Rudolf Franz Flesch.

PREFACIO Y AGRADECIMIENTOS.

Desde mi llegada a Barcelona, hace ya varios años, he pasado un largo camino lleno de incontables vicisitudes que ha ido marcado mi vida no solo profesional sino a nivel personal también, que de alguna manera me ha traído hasta la culminación de esta tesis doctoral. Al acordarme de mi inicio profesional en el Hospital Vall d'Hebrón, surgen gratos recuerdos de cuando el primer día, perdido por los pasillos de este "inmenso" hospital, recibí aquella cálida bienvenida, en primera instancia por el Dr. Antonio San José y el Profesor Miquel Vilardell, Jefe de Servicio de Medicina Interna, y luego por el Dr. Albert Selva O'Callaghan quién sería a la postre mi tutor y referente durante los años de mi formación como residente y que continua siendo así. A todos ellos mi más profundo agradecimiento.

Dentro de mis primeras rotaciones por el servicio de Medicina Interna, tuve la suerte de coincidir con la persona que marcaría mi recorrido en la vida médica. Su interés humano por el paciente tanto como por la enfermedad desde el punto de vista científico, su pasión por transmitir su conocimiento a quienes veíamos con admiración el manejo integral que tenía con cada paciente, la afabilidad al momento de hablar y humildad, fue como el Dr. Albert Selva O'Callaghan captó mi interés como modelo a seguir. En los años siguientes tuve la oportunidad de trabajar realizando colaboraciones en alguna publicación médica, en la cual pude ser testigo de su meticulosidad, esfuerzo, rigurosidad y honestidad, cualidades necesarias para desarrollar un trabajo digno y sobresaliente en beneficio principalmente de sus pacientes, y que además fue despertando en mi la curiosidad por la investigación; a él mi primer agradecimiento, no solo por que me brindo su confianza para la realización de esta tesis doctoral sino por su amistad y por dejarme una de las enseñanzas mas importantes, los limites nos los ponemos nosotros mismos y no otros, por todo esto y más, gracias Albert.

La realización de esta tesis doctoral ha supuesto un esfuerzo importante pero a la vez gratificante que no solo me ha permitido adquirir conocimientos específicos sobre las miopatías inflamatorias sino que además me ha dado la oportunidad de conocer grandes profesionales de diferentes ámbitos con los que he podido colaborar.

Deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis doctoral, Dr. Albert Selva, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas, por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas.

Al Dr. Iago Pinal Fernández, co-director de esta tesis doctoral, por su dedicación, disponibilidad, tiempo y sus importantes aportaciones científicas, que a lo largo de este tiempo han contribuido a la culminación de este proyecto.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. En este caso mi más sincero agradecimiento al Dr. Ricardo Pujol, Bs. Ana Marín y Bs. Eva Balada, su conocimiento profundo sobre el campo de la autoinmunidad en el laboratorio, paciencia y oportunas observaciones, han sido sin duda imprescindibles para cumplir con la satisfacción del trabajo bien hecho. También me gustaría expresar mi agradecimiento a Bs. Nenuca Martínez del Servicio de Inmunología del Hospital de la Santa Cruz i Sant Pau, y al Prof. Josep María Grau, del Hospital Clinic de Barcelona, por su inestimable ayuda en el día a día de nuestros pacientes con miositis. Asimismo me gustaría mostrar mi agradecimiento a los médicos del servicio de Medicina Interna -enfermedades autoinmunes sistémicas- por su amable colaboración en el estudio de estas facinantes enfermdades, al Dr. Víctor Vargas por su colaboración en el estudio de las hepatitis autoinmunes, al Dr. Joan Lima por su inestimable ayuda en el análisis de los pacientes con dislipemias familiares graves, al Dr. Estevo Santamarina, del Servicio de Neurología por su aportación de pacientes con ictus en tratamiento

con estatinas, y finalmente al Dr. Xavier Mundet por su ayuda en el análisis de los pacientes atendidos en el Centro de Atención Primaria del Carmel, en Barcelona. Por su orientación y atención a mis consultas sobre el análisis estadístico, mi agradecimiento al Dr. Xavier Vidal y sus valiosas sugerencias en momentos de duda.

Pero un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y la energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Gracias a mis amigos, especialmente a Jorge, Esteban, Mohamed, Mireia, Manón, Marcelo, Rox, que han sido mi segunda familia en esta ciudad huésped y que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión.

Pero, sobre todo, gracias a mi familia, a mis padres (Susana y †Marcelo) quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyeron en mi en todo momento y no dudaron de mis habilidades; a mis hermanos (Susana, Cristina, Andrés) porque con ellos compartí una infancia feliz, que guardo en el recuerdo, a mis sobrinos (Sebastián y Luciana) que su inocencia en todo momento es inspiradora y fuente de alegría, a mis cuñados (Paúl y Ximena) gracias por sumarse a esta familia y ser personas con quién contar en los buenos y malos momentos. Sin su apoyo este proyecto nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

Los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR), conocidos como estatinas, son los fármacos más utilizados en el tratamiento de la hipercolesterolemia y en la prevención tanto primaria como secundaria de enfermedades cardiovasculares y asociadas a aterosclerosis. A pesar de que son bien tolerados por la mayoría de los pacientes y de tener un perfil muy seguro, algunos pacientes presentan ciertos efectos adversos entre los que destacan las alteraciones musculares.

La descripción reciente de una forma de toxicidad muscular inmunomediada asociada a anticuerpos dirigidos contra la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (anti-HMGCR), sustrato frente al que actúan las estatinas, implica a estos fármacos como responsables en parte de fenómenos autoinmunes asociados a la administración del fármaco.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral, están encaminados a establecer la prevalencia de estos anticuerpos en la población general tratada con estatinas, pero también en enfermedades autoinmunes, entre las que las miopatías inflamatorias –por estar incluida la miopatía necrosante inmunomediada en el grupo- y las hepatitis autoinmunes –por explorar la reproducibilidad del modelo tóxico-inmunológico atribuido a la miopatía necrosante inmunomediada por estatinas- tienen una especial relevancia.

En estos estudios se ha podido comprobar que la prevalencia en la población general es inferior al 1%, tal y como otros grupos han publicado, y que en los pacientes con enfermedades autoinmunes la prevalencia es también baja, con la salvedad de las miopatías inflamatorias, en las que aumenta a expensas de las formas relacionadas con las estatinas (miopatía necrosante inmunomediada). No se ha conseguido reproducir el modelo en los pacientes con hepatitis autoinmune. Otros grupos a estudio, como las dislipemias familiares graves o la prevención secundaria del ictus, que contemplan la administración de estatinas a dosis altas han mostrado también una muy baja prevalencia.

La determinación de los anticuerpos anti-HMGCR es un punto relevante de estudio de estos pacientes, por lo que en esta Tesis se ha explorado la reproducibilidad y fiabilidad de dos técnicas de ELISA –una realizada en nuestro laboratorio (*in-house*) y otra comercial- observando una excelente concordancia entre ambas. Así mismo se ha descrito un nuevo patrón de inmunofluorescencia indirecta en triple tejido (HALIP), característico de estos autoanticuerpos, y que facilita su diagnóstico por su simplicidad y posibilidad de realización en la mayoría de laboratorios

Finalmente, se ha establecido un algoritmo diagnóstico-terapéutico sobre la actitud a tomar ante pacientes que reciben terapia con estatinas y presentan alteraciones musculares.

SUMMARY

Drugs that inhibit the enzyme, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), known as statins, are one of the most widely used medications. Statin use is associated with reductions in cardiovascular risk and mortality due to cardiovascular disease. Muscle toxicity is recognized as the main adverse effect of these drugs.

Recently, an immune-mediated muscle toxicity associated with antibodies against HMGCR has been described. It means a possible statins-related autoimmune mechanism of toxicity.

The aims of this Doctoral Thesis include the study of the prevalence of these anti-HMGCR antibodies in patients from the community treated with statins, but also the prevalence of anti-HMGCR antibodies in patients with different autoimmune diseases, especially in idiopathic inflammatory myopathies –given that immune-mediated necrotizing myopathy belongs to the group- and in autoimmune hepatitis –in order to examine the reproducibility of the well-known toxic-immunologic model of immune-mediated necrotizing myopathy.

Data obtained from these studies shown that prevalence in patients from the community treated with statins was less than 1%, and similar data was obtained in patients with autoimmune diseases. Only patients with idiopathic inflammatory myopathies, because of the inclusion of patients with statin-associated immune-mediated necrotizing myopathy, showed a higher prevalence. On the other hand we failed to demonstrate that patients with autoimmune hepatitis were positive to these anti-HMGCR antibodies. We also studied other groups of patients, such as those with severe familiar dyslipidemia and those in secondary prevention after a cerebrovascular event, treated with high doses of statins, but the prevalence was again less than 1%.

Method for anti-HMGCR detection is a relevant issue in the study of these patients. Thus, one of the points addressed in this Doctoral Thesis was to study de reproducibility and concordance of different test. Both ELISA test, in-house and commercial showed an excellent

concordance. Moreover, a distinct and characteristic immunofluorescence pattern on triple rat tissue not previously described, that we called HALIP (HMGCR Associated Liver IFL Pattern) was found. This pattern would help to identify patients with statin-associated autoimmune myopathy in a standard laboratory setting.

A practical approach to establish clinical recommendations regarding the muscle complaints related to statin use is reported as an algorithm at the end of the Doctoral Thesis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS…….....21

1. INTRODUCCIÓN……...25

1.1 Reseña histórica…….....25

1.2 Epidemiología…….26

1.3 Efectos secundarios –beneficiosos o adversos- de las estatinas…….……..29

1.3.1 Efectos pleiotrópicos e inmunomoduladores…….…….....29

1.3.2 Efectos adversos…….……..30

1.3.2.1 Síntomas musculares…….…….31

1.3.2.2 Toxicidad Hepática…….……...32

1.3.2.3 Diabetes Mellitus…….……..32

1.3.2.4 Cáncer…….…….……..33

1.3.2.5 Función cognitiva y pérdida de memoria…….……...33

1.3.2.6 Alteraciones inmunológicas…….……...34

1.4 Fenómenos autoinmunitarios, enfermedades autoinmunes y estatinas……..…….....35

1.4.1 Miopatías y autoinmunidad…….…….……..35

1.4.2 Hepatitis autoinmunes…….…….……..54

1.4.3 Artritis reumatoide …….…….……..56

1.4.4 Síndrome antifosfolipídico…….…….……...58

1.4.5 Lupus eritematoso sistémico…….…….…….....60

1.4.6 Vasculitis…….…….…….……61

1.4.7 Espondilitis anquilosante…….…….…….....61

1.4.8 Esclerodermia…….…….…….....62

1.4.9 Corolario…..…….…….…….....64

2. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS…….……65

2.1 Justificación del estudio…….…….……..65

2.2 Objetivos…….…….…….....66

3. PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO, MATERIAL Y METODOS, Y RESULTADOS. ……..…….…….…….67

PRIMER ESTUDIO

- Prevalencia de anticuerpos anti-HMGCR en una cohorte de pacientes atendidos en atención primaria en tratamiento con estatinas. …...…….69

SEGUNDO ESTUDIO

- Prevalencia de los anticuerpos anti-HMGCR en enfermedades autoinmunes sistémicas y en pacientes con ictus y dislipemias familiares en tratamiento con estatinas. …….…….……....75

TERCER ESTUDIO

- Comparación entre las diferentes técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-HMGCR. Técnica ELISA (*in-house*) versus ELISA comercial…….85

CUARTO ESTUDIO

- Estudio de pacientes con MNIM y anti-HMGCR y descripción de un nuevo patrón mediante la técnica IFI en triple tejido de rata…….…….....95

4. DISCUSIÓN GENERAL…….…….…….……..111

5. CONCLUSIONES…….…….…….…….....129

6. BIBLIOGRAFÍA……..131

7. ANEXO…….…….…….……...161

ABREVIATURAS.

AEMPS	Agencia Española de Medicamentos
ACC	American College of Cardiology
AR	Artritis reumatoide
APS	Anticuerpos anti-fosfolipídicos
AIC	Artritis Inducida por Colágeno
ANCA	Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos)
CEVUH	Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana
CK	Creatina Fosfocinasa
CPA	Células presentadoras de antígeno
CAT	Complejo trombina-antitrombina
DMll	Diabetes mellitus
DM	Dermatomiositis
EK	Enfermedad de Kawasaki
EA	Espondilitis Anquilosante
ES	Esclerosis Sistémica
FT	Factor Tisular
FVW	Factor de von Willebrand
FPP	Farnesil pirofosfato
FR	Fenómeno de Raynaud
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GTP	Guanosin trifosfato

GDP	Guanosin difosfato
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa
HLA	Human leukocyte antigen
HAI	Hepatitis autoinmunitaria
ICAM	Molécula de Adhesión Intercelular
LPS	Lipopolisacáridos
LP	Peróxido de lípido
LTH	Linfocitos T *Helper*
LES	Lupus eritematoso sistémico
MNIM	Miopatía necrosante inmunomediada
MDA	Malondialdehído
NF-KB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NF-jB	Factor nuclear-j Beta
OA	Osteoartritis
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor.
SHAQ-DI	Índice de Discapacidad de Salud de Esclerodermia modificado
SNP	Single nucleotide polymorphisms
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
T reg	Celulas T reguladoras

UD	Ulceración digital
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

I. INTRODUCCIÓN

1.1 RESEÑA HISTÓRICA

Las estatinas, descritas por primera vez por el químico japonés, Akira Endo en 1976 [1] tras el análisis de extractos de más de 6.000 microorganismos, se utilizan de forma masiva en la población no solo en los pacientes donde el objetivo es una reducción de las cifras del colesterol, sino que, atendiendo a sus efectos pleiotrópicos, también como fármacos que inciden sobre la salud cardiovascular.

Endo aisló un metabolito del hongo *Penicillium citrinum*, denominado compuesto ML-236B (luego conocido como mevastatina), capaz de inhibir competitivamente la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR), que cataliza un paso limitante en la síntesis de colesterol y otros compuestos isoprenoides; planteó que probablemente algunos microorganismos podrían producir metabolitos con capacidad para inhibir la HMGCR como un mecanismo de defensa contra otros microorganismos agresores, que dependían del colesterol o de compuestos isoprenoides para la invasión y posterior crecimiento [1,2].

Durante la siguiente década se descubrieron otros metabolitos similares, entre ellos, la lovastatina, aislada de *Aspergillus terreus* [3,4], que fue evaluada en ensayos clínicos entre 1984 y 1986, obteniendo resultados que confirmaban su acción hipolipemiante, sin presentar, aparentemente, efectos adversos significativos.

En julio de 1982, la publicación del llamado *Informe de Mabuchi* [5] realizado por un grupo de científicos de la Universidad de Kanazawa (Japón) informó de los impresionantes resultados del tratamiento con *compactin (mevastina)* altamente eficaz en pacientes heterocigotos graves con hipercolesterolemia familiar, lo que despertó el interés en médicos de prestigiosas universidades de la época tales como *Oregon Health Sciences University y Texas University*, que comenzaron a tratar con estos fármacos a sus pacientes con hipercolesterolemia grave que no respondían a los agentes disponibles hasta entonces.

El fármaco mostro una actividad excelente en la reducción del colesterol LDL, con muy pocos efectos secundarios. Esto llevó a la compañía farmacéutica Merck a iniciar ensayos

clínicos a gran escala con lovastatina en pacientes de alto riesgo y estudios de toxicidad a largo plazo en perros en 1984. El fármaco redujo drásticamente las cifras de colesterol y fue bien tolerado. No se detectaron tumores. En noviembre de 1986, Merck envió a la FDA de Estados Unidos las nuevas aplicaciones clínicas del fármaco y la lovastatina recibió la aprobación para convertirse en la primera estatina comercial en septiembre de 1987 [6,7].

A partir de ese momento, se desarrollaron nuevas estatinas mediante modificaciones bioquímicas, dando origen a la simvastatina y la pravastatina. Finalmente, fue posible la producción de moléculas similares, pero totalmente sintéticas, con diferencias en su solubilidad, vida media y potencia, como la fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina y pitavastatina, todas ellas utilizadas hoy día en la práctica clínica [8].

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Los inhibidores de la HMGCR más comúnmente conocidos como estatinas, son los fármacos más utilizados en el tratamiento de la hipercolesterolemia y han demostrado su eficacia en la prevención, tanto primaria como secundaria, de enfermedades cardiovasculares y asociadas a aterosclerosis. El impacto de estos tratamientos es tan importante que aproximadamente el 25% de la población mundial mayor de 65 años recibe o ha recibido tratamiento con estatinas [9-11]. En términos de consumo, un estudio realizado entre los años 2009 y 2011 presentado durante el *Encuentro Anual del American College of Cardiology en 2016 (ACC)* detectó un aumento en España del 442% en los últimos 10 años según datos de la *Agencia Española de Medicamentos* (AEMPS).

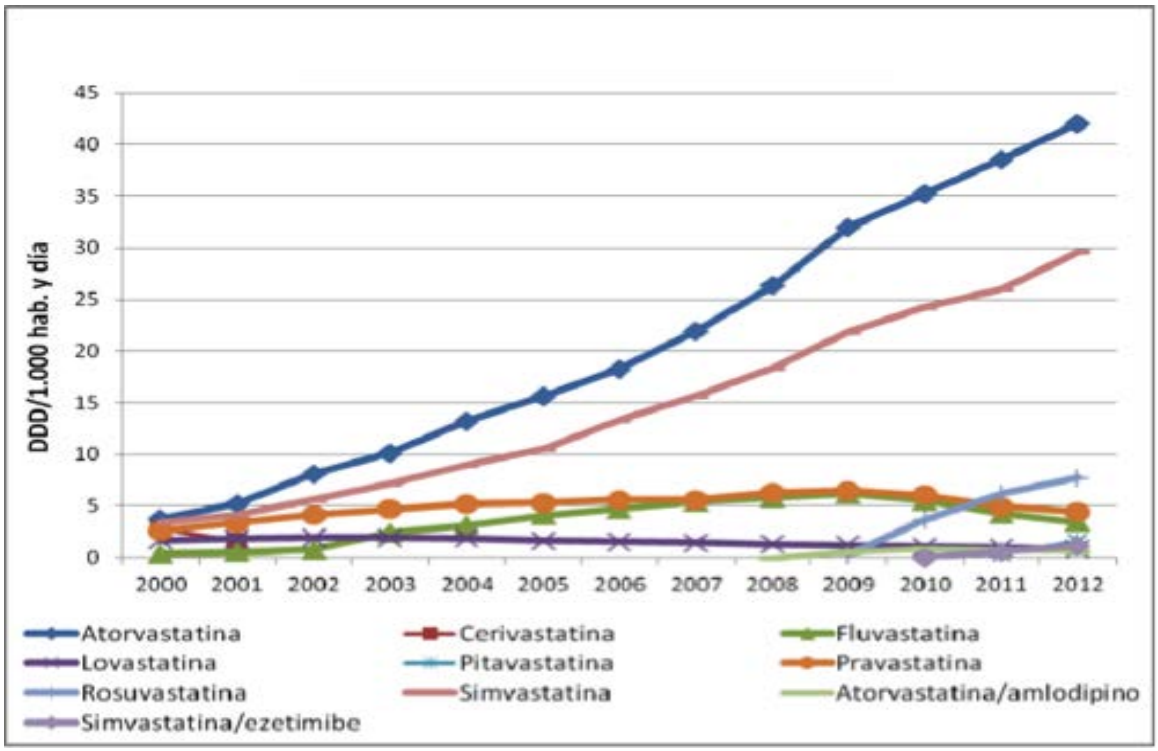
A lo largo del la última década, se han introducido nuevos hipolipemiantes en España, como la rosuvastatina (2009) y pitavastatina (2011), colesevelam (2011) y otros modificadores de lípidos como ezetimiba (2004) y ácidos grasos omega 3 (2005). Además, se han

comercializado nuevas asociaciones a dosis fijas como la atorvastatina/amlodipino, ezetimiba/simvastatina o el ácido nicotínico/laropiprant.

Recientemente, la utilización de anticuerpos monoclonales (evolocumab) que inhiben la proproteín-convertasa subtisili/kexina tipo 9 (PCSK9) han demostrado reducir un 60% los valores de LDL colesterol. Este mecanismo de acción podría competir con las estatinas como el hipolipemiante de elección y supone una alternativa viable en pacientes con intolerancia a las estatinas [(12)].

La estatina más utilizada en España en los últimos años ha sido la atorvastatina, seguida por la simvastatina como segundo fármaco más administrado. La suma de atorvastatina y simvastatina representaron en 2012 el 78,2% del consumo del total de estatinas [(13)] (Figura 1) y este porcentaje podría incrementarse en caso de aprobarse las nuevas guías terapéuticas propuestas por algunos organismos internacionales.

Figura 1. Consumo de Estatinas en España.



Fuente: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad y Política Social. Utilización de medicamentos hipolipemiantes en España durante el periodo 2000-2012. Informe de utilización de medicamentos. 2014;1-4.[13]

1.3 EFECTOS SECUNDARIOS -BENEFICIOSOS O ADVERSOS- DE LAS ESTATINAS

1.3.1 Efectos pleiotrópicos e inmunomoduladores

En algunos ensayos experimentales se describen, tanto *in vitro* como *in vivo*, otros efectos biológicos asociados a las estatinas, no necesariamente relacionados con la reducción del colesterol plasmático, conocidos como efectos pleiotrópicos [(14)] y que se recogen en la Tabla 1. Se cree que esos efectos se pueden deber a la disminución de la síntesis del L-mevalonato, lo que afectaría la comunicación intercelular al impedir la formación de balsas de lípidos en la superficie celular e interferir en la función de diferentes subpoblaciones celulares al limitar la prenilación de proteínas de señalización intracelular. Estos efectos beneficiosos han sido demostrados en la enfermedad aterosclerótica, tanto por el control de la producción de óxido nítrico (reduciendo el daño oxidativo) como por otros efectos que contribuyen a la mejoría de la función endotelial [(14,15)].

Tabla 1.

Efectos pleiotrópicos atribuidos a las estatinas.

Regulación de la sintetasa del óxido nítrico del endotelio y mejora de la respuesta fisiopatológica, incluyendo la vasoconstricción y la promoción de reendotelización
Efecto antioxidante a través de la inhibición de nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidasa y su reacción oxidativa
Propiedades antiinflamatorias, incluida la reducción de la proteína C reactiva, la interleucina 6, el factor de necrosis tumoral alfa y el factor K nuclear
Disminución de citocinas y quimiocinas
Estabilización de las placas ateroscleróticas e inhibición de la inflamación de la placa
Disminución de la activación de la cascada de la coagulación
Aumento de la actividad parasimpática
Inducción de la autofagia en la inhibición de la angiogénesis en células neoplásicas
Neuroprotección y apoyo de las funciones de barrera hematoencefálica

Fuente: Alvarado Cárdenas M, Marín Sánchez A, Lima Ruiz J. Statins and autoimmunity. Med Clin (Barc). 2015;145:399-403[(15)].

Estos efectos pleiotrópicos explican, al menos en parte, los efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores e incluso antitrombóticos de las estatinas, así como su potencial utilidad

frente a algunas infecciones y enfermedades crónicas, como la osteoporosis, o las demencias, incluyendo la enfermedad de Alzheimer [14-17].

Entre los efectos no esperados se incluyen los *efectos inmunomoduladores*. Diversos estudios han demostrado estos efectos de las estatinas sobre las células del sistema inmune, al modular la respuesta de los linfocitos T efectores (LT), linfocitos B (LB), monocitos y células dendríticas (DC); se ha comunicado que estos fármacos también afectan a una subpoblación de células T $CD4^{+}$, además el efecto inmunomodulador de estos fármacos puede depender en parte de la disminución de la respuesta inflamatoria Th17 [18] o de su capacidad para activar PPAR (del ingles, *peroxisome proliferator activated receptor*) que interfieren con la vía de activación NF-kB, inhibiendo la expresión de diferentes citocinas [19].

Estos fármacos parecen desempeñar un rol terapéutico coadyuvante en algunas enfermedades autoinmunes debido no sólo a su posible carácter antiinflamatorio e inmunomodulador, sino también a su capacidad de minimizar el potencial aterogénico tanto de la propia enfermedad como de los fármacos utilizados para su tratamiento, entre los que se encuentran los glucocorticoides [14-17]. Se postula que la capacidad de las estatinas para inhibir la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) de clase II en las células presentadoras de antígeno puede provocar una disminución de la activación de linfocitos Th1 y la inhibición de la secreción de citocinas proinflamatorias [18,19].

1.3.2 Efectos adversos

En general, y a pesar de ser fármacos bien tolerados y con un perfil favorable de seguridad [20], un número significativo de pacientes puede experimentar efectos adversos. En las últimas décadas, diversos estudios observacionales han atribuido a las estatinas varios efectos secundarios, incluyendo síntomas musculares, gastrointestinales, fatiga, elevación de enzimas hepáticas, neuropatía periférica, insomnio o alteraciones cognitivas, entre otros.

1.3.2.1 Síntomas musculares

Las molestias a nivel muscular son el efecto adverso más frecuente relacionado con las estatinas. La Sociedad Europea de Aterosclerosis publicó un documento de consenso sobre el diagnóstico y el tratamiento de este problema [21] en el que se propone integrar la sintomatología de este tipo asociada a las estatinas dentro del término «*síntomas musculares*», con presencia o no de elevación de enzimas musculares (CK). Aunque en los ensayos clínicos la incidencia de los síntomas musculares es baja (1-5%), en estudios observacionales, registros de pacientes y estudios post-comercialización oscila entre el 7 y el 29% de los pacientes tratados [21,22].

La presentación clínica de los síntomas musculares es muy heterogénea, como lo refleja la variedad de definiciones que se contemplan en la bibliografía médica. Esto se debe a la subjetividad de los síntomas. El estudio STOMP [23] analizó la incidencia de síntomas musculares en 420 individuos sanos que fueron asignados de forma aleatoria a recibir dosis altas de estatinas (atorvastatina 80 mg al día) o placebo, durante 6 meses o hasta la aparición de síntomas musculares. En este estudio se observó una incidencia acumulada de síntomas musculares del 9,4% en los pacientes tratados con estatinas, y del 4,6% en los tratados con placebo.

Los síntomas musculares asociados a las estatinas habitualmente incluyen la presencia de mialgias, inflamación o debilidad muscular, y se presentan de forma simétrica, afectando sobre todo a glúteos, muslos, pantorrillas y espalda. Típicamente aparecen de forma precoz (a las 4-6 semanas de iniciar el tratamiento), pero pueden hacerlo de forma diferida años después del inicio del tratamiento. También pueden aparecer al incrementar las dosis de estatinas, o al introducir un fármaco que interaccione con ellas [21,22]. Este aspecto se desarrollará con mayor extensión en el apartado de Miopatías.

1.3.2.2 Toxicidad hepática

El tratamiento con estatinas produce elevaciones persistentes en los valores séricos de

transaminasas hepáticas (aspartato transaminasa [AST] y alanina transaminasa [ALT], fosfatasa alcalina [FA], gamma glutamiltransferasa [GGT]), en el 0,5-3% de los pacientes [24]. El efecto es dosis dependiente y se produce, sobre todo, en los primeros tres meses tras el inicio del tratamiento. Sin embargo, la afectación hepática grave por estatinas, es poco frecuente e impredecible y la monitorización periódica de enzimas hepáticas no parece ser eficaz en su detección o prevención [24]. Por este motivo, no se recomienda controlar de forma regular los valores séricos de transaminasas hepáticas en los pacientes tratados con estatinas. No obstante, está indicado realizar una determinación de la función hepática antes de iniciar el tratamiento con estatinas y repetirla únicamente si hay algún síntoma o signo clínico que así lo indique [25].

1.3.2.3 Diabetes mellitus

La evidencia actualmente disponible de ensayos clínicos de asignación aleatoria y estudios observacionales indica que existe una asociación entre la diabetes mellitus tipo 2 y el uso de estatinas. El mecanismo por el que las estatinas favorecen la aparición de diabetes es desconocido [26] y el riesgo de diabetes de nueva aparición puede variar entre las distintas estatinas. No obstante, no hay datos suficientes para establecer diferencias entre las distintas moléculas en cuanto a su asociación con la diabetes tipo 2 [27].

La aparición de diabetes parece estar relacionada con la dosis de estatina administrada. En una revisión sistemática de ensayos clínicos de asignación aleatoria [28] se concluye que las dosis altas de estatinas (atorvastatina 80 mg/d, simvastatina 40-80 mg/d) conllevan un mayor riesgo de aparición de diabetes que las dosis moderadas (pravastatina 40 mg/d, atorvastatina 10 mg/d, simvastatina 20 mg/d), diagnosticándose 2 casos más de diabetes mellitus de nueva aparición por cada 1.000 pacientes/año. Datos de un estudio observacional que incluyó más de 136.000 pacientes en prevención secundaria cardiovascular apoyan estos resultados [29].

1.3.2.4 Cáncer

Aunque en estudios preclínicos las estatinas se han asociado a un incremento de neoplasias, posteriores meta análisis de ensayos clínicos no han detectado ningún efecto en la incidencia ni en la mortalidad por cáncer [30] . Una posible limitación de estos estudios es la corta duración de los ensayos clínicos para detectar este efecto adverso. Sin embargo, el seguimiento a largo plazo (10 años) de los principales estudios que han evaluado la reducción de la morbimortalidad asociada al uso de estatinas no ha mostrado aumento del riesgo de mortalidad por cáncer [31].

1.3.2.5 Función cognitiva y pérdida de memoria

Las estatinas se han asociado con deterioro cognitivo, pérdida de memoria, confusión y olvidos. Estos efectos están recogidos en la ficha técnica del producto, son poco frecuentes y parecen resolverse al suspender el tratamiento. Ensayos clínicos han mostrado alguna evidencia de pequeños decrementos en la función cognitiva medidos en tests neurológicos. En un estudio observacional se asoció el consumo de estatinas con la pérdida de memoria en los 30 días siguientes a la exposición, si bien el grado de evidencia es poco sólido. No obstante, dado el uso generalizado de las estatinas y la alta prevalencia de disfunción cognitiva (por múltiples causas, principalmente por el envejecimiento) en la población general, cualquier síntoma neurológico compatible debe tenerse en cuenta y evaluarse de manera apropiada, lo que incluye la realización de tests neuropsicológicos adecuados en pacientes cuyos síntomas persisten a pesar de la interrupción de la estatina [32] .

1.3.2.6 Alteraciones inmunológicas

Algunos pacientes presentan ciertas alteraciones inmunológicas que en ocasiones pueden

evolucionar a enfermedades autoinmunes con una expresión clínica bien definida. Estudios recientes han mostrado que pueden desencadenar, además de los clásicos efectos adversos, también fenómenos autoinmunitarios [33] . Han sido descritas como inductores de una miopatía en parte mediada inmunológicamente, la miopatía necrosante inmunomediada (MNIM), pero también se han descrito casos relacionados con lupus eritematoso sistémico (LES), dermatomiositis (DM), hepatitis autoinmune (HAI), vasculitis con anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos (ANCA) [34-37], y alteraciones del perfil inmunológico en suero, con o sin expresión clínica acompañante.

El mecanismo es desconocido en la mayoría de estas enfermedades, y probablemente no es único. Una hipótesis contempla el comportamiento de estos fármacos como agentes proapoptóticos que liberarían antígenos nucleares a la circulación, o determinados cambios moleculares induciendo la producción de autoanticuerpos. El hecho de que el tratamiento inmunodepresor sistémico haya demostrado ser eficaz en algunos de los casos publicados apoya el mecanismo inmunológico.

1.4 FENÓMENOS AUTOINMUNITARIOS, ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y ESTATINAS

1.4.1 Miopatías y autoinmunidad

1.4.1.1 Miopatías inflamatorias. Generalidades

Las miopatías inflamatorias idiopáticas (MII) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades musculares adquiridas caracterizadas por la presencia de un infiltrado inflamatorio en la biopsia muscular. Actualmente se reconocen al menos 5 fenotipos clínicos que incluyen la dermatomiositis (DM), polimiositis (PM), miositis con cuerpos de inclusión (MCI), miositis de superposición (*overlap*) cuyo principal exponente es el síndrome antisintetasa, y miopatía necrosante inmunomediada (MNIM). La presencia de autoanticuerpos específicos y asociados refuerza la naturaleza inmune de estas enfermedades [38-45].

En 1863, Wagner describió el primer caso de miositis en un paciente con debilidad y exantema [38]. Una década más tarde Unverricht [39] describió un paciente con similares características, debilidad muscular proximal y además observo una erupción violácea en los parpados. En la autopsia, apareció un infiltrado inflamatorio en el músculo afectado, acuñando el término "dermatomiositis" para describir a los pacientes con miopatía inflamatoria y manifestaciones dermatológicas asociadas [40]. El primer caso de PM fue descrito sólo unos pocos años antes por Hepp [41] en un paciente que desarrolló una miopatía inflamatoria en ausencia de afectación cutánea. Estas entidades PM y DM fueron durante muchos años las principales formas de MII.

En 1967, en un paciente con clínica de "polimiositis crónica" caracterizada por disfagia y debilidad prominente del cuádriceps, la biopsia muscular mostro agregados intracitoplásmicos de estructuras filamentosas similares a las vistas en la infección por mixovirus [42]. Al repetirse los hallazgos de biopsia muscular en un segundo paciente, se definió la "miositis con cuerpos de inclusión" como una forma distinta de miopatía inflamatoria. En 1995, Griggs et al. [43] desarrollaron criterios diagnósticos/clasificatorios para distinguir la miositis con cuerpos de

inclusión (sIBM, del inglés *sporadic Inclusion Body Myositis*) de las diferentes formas de miopatías inflamatorias conocidas hasta ese momento: la DM y la PM.

Aunque reconocida como entidad propia, la MNIM no ha sido incluida hasta hace pocos años en el grupo de las MII. Su peculiar histología caracterizada por necrosis significativa de miofibras y escaso infiltrado inflamatorio, de predominio macrofágico, generaba ciertas reticencias para ser incluida en el grupo. Sin embargo, recientemente, la descripción fenotípica de estos pacientes, con importante debilidad e infrecuentes manifestaciones extramusculares, la asociación con los autoanticuerpos anti-SRP (*Signal Recognition Particle*) y anti-HMGCR y la expresión de antígenos MHC-I en células necróticas y no necróticas, han permitido incluirla en el grupo de las miopatías inflamatorias [(44)].

La descripción de autoanticuerpos propios de estas entidades (específicos) o asociados a otras entidades ha permitido categorizar con mayor fiabilidad estas enfermedades y sus manifestaciones clínicas [(45)]. Con frecuencia, estos autoanticuerpos se asocian e identifican a las principales formas de miositis, por ejemplo, los autoanticuerpos que reconocen la proteína de diferenciación de melanoma-5 (MDA-5) se encuentran en pacientes con DM clínicamente amiopática (CADM), que cursa con manifestaciones dermatológicas únicas como las lesiones palmares y/o ulceras cutáneas de tipo vasculopático, y que en ocasiones puede cursar con neumopatía intersticial rápidamente progresiva [(46)], mientras que los autoanticuerpos dirigidos a la partícula de reconocimiento de señal (SRP) se encuentran casi exclusivamente en pacientes con MNIM.

1.4.1.2 Epidemiología y genética de las miopatías inflamatorias

Las enfermedades musculares autoinmunes son raras y la estimación de su incidencia y prevalencia varía según los métodos estadísticos utilizados [47]. Basados en dos grandes estudios realizados en América del Norte se podría establecer una aproximación de la prevalencia e incidencia. Bernatsky et al. [48], utilizando las bases de datos de facturación y hospitalización de médicos en Quebec, estimaron que la prevalencia general de DM y PM era de 21,5 por 100 000 entre más de 7 millones de beneficiarios. En un estudio similar utilizando Medicare y Medicaid en pacientes inscritos en los EE.UU., Smoyer-Tomic et al. [49] calcularon que la incidencia de estas enfermedades era de aproximadamente 4 casos por 1.000.000 persona/año y que la prevalencia podía oscilar entre 15 y 32 casos por 100.000; hay muchos otros estudios que establecen cifras entre 5-10 nuevos casos por millón de habitantes y año. En España la incidencia anual media es similar, de 2,2 a 10,6 casos nuevos por millón de habitantes y año [50].

Las mujeres tienen aproximadamente el doble de probabilidades de desarrollar PM o DM que los hombres. Además, es más probable que las personas mayores y las que viven en zonas urbanas estén más afectadas. El estudio de Smoyer-Tomic et al. [49] encontró que la prevalencia de PM y DM era de 70 por 100 000 casos en las mujeres mayores que viven en zonas urbanas frente a un 2,7 por 100 000 en los hombres jóvenes en zonas rurales. A diferencia de DM y PM, la sIBM afecta preferentemente a varones, con una edad media de inicio de 60 años. La prevalencia de sIBM entre los mayores de 45 años está probablemente en el rango de 3-14 por 100 000 habitantes, dependiendo de las poblaciones estudiadas y las metodologías utilizadas [47] . Al igual que con muchas otras enfermedades autoinmunes, ciertos factores genéticos se asocian con un mayor riesgo de desarrollar miopatía inflamatoria. Tabla 2.

Tabla 2.

Factores de Riesgo Inmunogenético.

MIOSITIS	CARACTERÍSTICAS INMUNOGENÉTICAS.
DM	- HAPLOTIPO 8.1 [51-53] - CADENAS PESADAS IG GM 3 23 5, 13 [54] - TNF 308 A [55]
PM	- Ciertos alelos de MHC de clase II [56,57] - SNP Gen Interferón γ [58]
sIBM	- Gen NOTCH4 [59]
MNIM HMGCR	- HLA clase II alelo DRB1 * 11: 01 [53,60]

DM: Dermatomiositis. PM: Polimiositis. MNIM: Miopatía necrotizante inmunomediada. HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa. sIBM. Miopatía por cuerpos de inclusión esporádica. HLA: (del inglés) Human leukocyte antigen. SNP: (del inglés) Single nucleotide polymorphisms.

1.4.1.3 Criterios de clasificación

Numerosos criterios clasificatorios se han venido desarrollando con el fin de asistir al clínico en el diagnóstico y clasificación de estas enfermedades. En 1975, Bohan y Peter propusieron que las siguientes características clínicas y de laboratorio fueran usadas para diagnosticar PM y DM [61,62]: (1) debilidad muscular simétrica proximal; (2) enzimas musculares elevadas; (3) electromiografía con un patrón de características miopáticas; (4) una biopsia muscular con infiltrado inflamatorio: fibras musculares necróticas y fibras musculares regenerando. Después de excluir las miopatías tóxicas y las miopatías hereditarias, se clasificó a los sujetos sin erupción cutánea como PM definitiva cuando cumplían con los cuatro criterios, PM probable con tres criterios y PM posible con dos criterios. En presencia de una erupción característica de DM, los pacientes se clasificaron como DM definitiva con cuatro criterios, DM probable con tres criterios, y DM posible con sólo dos criterios.

Los criterios de Bohan y Peter han sido extremadamente útiles y todavía se utilizan en la actualidad. Sin embargo la sIBM y la MNIM se reconocen hoy día como formas distintas de miositis. Además, ahora apreciamos características histológicas únicas en las biopsias musculares de pacientes con DM, PM, MNIM, sIBM, e incluso en pacientes con síndrome antisintetasa [63-65] .

Los esquemas de diagnóstico más modernos han tenido en cuenta estos avances. En el 2004, en la reunión del ENMC (del inglés *European Neuromuscular Center*), se acordó una nueva clasificación basándose en las características histológicas únicas de cada entidad. Así pues, la PM se distingue por la presencia de células T que rodean y/o invaden las fibras musculares no necróticas, las biopsias de músculo en la DM revelan atrofia perifascicular y las biopsias de las MNIM tienen necrosis significativa de miofibras, degeneración y regeneración con escasas colecciones de células inflamatorias. Los criterios de ENMC de 2004 no proporcionan un esquema para diagnosticar sIBM, pero a diferencia de los criterios de Bohan y Peter, establecen pautas para excluir a estos pacientes: aquellos con características clínicas típicas (por ejemplo, debilidad asimétrica o distal) o biopsia muscular con cuerpos de inclusión [(66)]. Tabla 3.

Desde que Griggs et al. [(43)] publicaron los primeros criterios diagnósticos de sIBM en 1995, varios autores han comunicado otros criterios clasificatorios. Lloyd et al. en 2014, sugieren que la mayoría de ellos tienen una alta especificidad (> 96%) pero una sensibilidad relativamente baja (11-84%). Estos autores utilizaron 20 características clínicas para desarrollar unos criterios que mejoraran la detección de sIBM: (1) debilidad de los músculos flexores de la mano; (2) inflamación endomisial; (3) e invasión de fibras musculares no necróticas por células mononucleares (linfocitos T $CD8^+$) o fibras musculares con vacuolas ribeteadas (vacuolas en anillo) [(67)]. Estos criterios, que no requieren de inmuno-histoquímica especializada o análisis de microscopía electrónica en tejido de biopsia muscular, parecen ser útiles para médicos tanto dentro como fuera de centros académicos especializados.

Tabla 3.

Comparación entre tres criterios clasificatorios.

Autores	Punto positivo	Consideración.	Sensibilidad	Especificidad
Bohan & Peter 1975 [61,62]	Útil como herramienta de cribado. Utilizado hasta ahora para la inscripción de pacientes en ensayos clínicos	Incapaz de diferenciar PM de sIBM o distrofias. La imagen y los autoanticuerpos no se consideran.	0,943	0,294
Dalakas & Hohfeld 2003 [63]	Muy alta especificidad. Se consideran los pacientes con DAM. La definición de características histológicas es precisa.	Baja sensibilidad de algunos artículos. La imagen y los autoanticuerpos no se consideran.	0,771	0,999
ENMC 2004[64]	Se consideran imágenes y autoanticuerpos. La definición de características histológicas es precisa.	No se consideran la superposición y la DM paraneoplásica. Complejo a utilizar en la práctica clínica.	0,714	0,824

DM: dermatomiositis; PM: Polimiositis; sIBM: Miopatia de cuerpos de inclusión esporádica; DMA: Dermatomiositis amiopática; ENMC European Neuromuscular Center.

Fuente: Modificado de H. Linklater, N. et al. Classifying idiopathic inflammatory myopathies: comparing the performance of six existing criteria. Clin Exp Rheumatol. 2013;31:767-9 [66].

Dada la importancia de las características histológicas en el diagnóstico de las diferentes formas de MII, así como en la exclusión de otros diagnósticos, debe considerarse la biopsia muscular un componente esencial en la evaluación de los pacientes con sospecha de MII. Una excepción a la regla podría ser el caso de pacientes con manifestaciones cutáneas "patognomónicas" como la erupción tipo heliotropo o las pápulas de Gottron. Recientemente se han publicado unos nuevos criterios diagnósticos auspiciados por las sociedades reumatológicas europea y americana (EULAR/ACR) [68], que deberán demostrar su idoneidad en la practica clínica, aunque la posibilidad de llegar al diagnostico correcto en ausencia de biopsia muscular y la utilización de una calculadora en la web (www.imm.ki.se/biostatistics/calculators/iim) para llegar al diagnóstico facilitan al menos su uso.

1.4.1.4 Etiopatogenia

Las exposiciones ambientales pueden desempeñar un papel relevante en la etiopatogenia de la miopatía autoinmune. Existen ejemplos en embarazos de gemelos monocigóticos en el que

solo uno se ve afectado por PM o DM [69], lo que sugiere que los factores genéticos no son el único determinante de la susceptibilidad. Por otra parte, algunas formas de miositis asociadas a ciertos anticuerpos tienden a presentarse en ciertas épocas del año, lo que plantea la posibilidad de que una exposición específica de la estación, como una "infección vírica estacional", pueda desencadenar el proceso autoinmune [70]. Algunos subgrupos de miositis juvenil tienen un patrón de parto estacional, sugiriendo que exposiciones perinatales pueden jugar un rol en el desarrollo de la enfermedad [71].

Hasta la fecha, sólo dos exposiciones ambientales bien definidas han sido identificadas como factores de riesgo: 1) la exposición a fármacos como las estatinas y su asociación a anticuerpos anti-HMGCR y 2) la exposición a la luz ultravioleta que parece asociarse a una mayor frecuencia DM y anticuerpos anti-Mi2 [72-74].

1.4.1.5 Manifestaciones clínicas, signos y síntomas de las miopatías inflamatorias

Ante la sospecha clínica de MII, la anamnesis debe incluir preguntas que ayuden a identificar los grupos musculares afectados. Por ejemplo, la dificultad para subir escaleras o levantar los brazos por encima de la cabeza sugiere debilidad proximal, como se ve en DM, PM y MNIM. En contraste, la dificultad para abrir frascos, atarse los cordones de los zapatos, anudarse la corbata, o la tendencia a tropezar y caer puede indicar un patrón distal de debilidad, como puede observarse en los pacientes con sIBM. Los pacientes con sIBM también pueden reportar caídas inesperadas repentinas que a menudo son el resultado de la debilidad del músculo cuádriceps que es común en esta enfermedad. También se debe preguntar a los pacientes si su debilidad es simétrica, como se espera en DM, PM y MNIM, o asimétrica, como es más frecuente en sIBM. El interrogatorio sobre las características de la deglución es también importante. Así, la disfagia temprana desproporcionada es más típica de la sIBM. Aquellos con enfermedad más grave pueden requerir un soporte ventilatorio por fracaso de la musculatura respiratoria, en concreto del

diafragma, o alimentación a partir de gastrostomía endoscópica percutánea cuando la disfagia es grave.

Se debe obtener un historial detallado de la medicación para determinar si el paciente está actualmente expuesto a medicamentos potencialmente miotóxicos. Ejemplos frecuentemente descritos incluyen las estatinas, colchicina e hidroxicloroquina. Dado que las estatinas están asociadas con una MNIM que progresa incluso después de suspender el fármaco [75,76], los pacientes también deben ser interrogados sobre la exposición a estatinas con anterioridad a la aparición de su sintomatología.

La historia familiar debe centrarse en otros miembros de la familia del paciente, identificando aquellos que hayan podido ser diagnosticados de algún tipo de miopatía, lo que es importante para descartar enfermedades musculares hereditarias como las distrofias de cinturas que podrían llegar a confundirse con las MII. En ocasiones, puede darse la circunstancia de que no se haya realizado un diagnóstico correcto de miopatía en los miembros de la familia del sujeto en cuestión, incluso en pacientes con un proceso miopático definido. Por lo tanto, hay que interrogar específicamente sobre síntomas de miopatía, como dificultad para caminar o usar un bastón o una silla de ruedas. Dado que la miopatía autoinmune en más de un miembro de la familia es excepcional, una historia familiar de miopatía sugiere un diagnóstico alternativo (por ejemplo, distrofia o miopatía metabólica). Sin embargo, la ausencia de antecedentes familiares no puede excluir una base genética para estas enfermedades, ya que muchas (por ejemplo, las distrofias de cintura) se heredan de una forma autosómica-recesiva. Además, los miembros de la familia ligeramente afectados con enfermedad muscular genética pueden ser relativamente asintomáticos.

La historia clínica también debe incluir las manifestaciones extramusculares de PM y DM. Por lo tanto, los pacientes deben ser interrogados sobre exantemas, dolor en las articulaciones, fiebre y fenómeno de Raynaud. Debido a que la miopatía autoinmune, especialmente la DM, puede

estar asociada a cáncer, se debe interrogar sobre la pérdida de peso inesperada, sudoración nocturna u otras manifestaciones que hagan sospechar esta patología.

Todos los pacientes con debilidad muscular requieren un examen neuromuscular detallado. La debilidad muscular simétrica proximal es típica en PM, DM y MNIM. A diferencia de estos pacientes, aquellos con sIBM pueden tener debilidad de *orbicularis oculi* (generalmente leve), tríceps más que bíceps, flexores de muñeca, flexores distales de los dedos (pero no de los músculos intrínsecos de las manos), cuádriceps (a menudo, pero no siempre, más intensa que los músculos flexores de la cadera), y dorsiflexores de tobillo.

Curiosamente, el deltoides y los músculos isquiotibiales suelen estar relativamente preservados en la sIBM en fases iniciales de la enfermedad. Los hallazgos del examen físico que sugieren un diagnóstico alternativo –no miopático- o adicional incluyen pérdida sensorial, hiperreflexia, fasciculaciones difusas, debilidad facial prominente, anormalidades del movimiento ocular y *escapula alata*.

Los pacientes con DM suelen presentar exantema violáceo palpebral, denominado en heliotropo por recordar a esta planta de color liláceo, eritema descamativo en las superficies extensoras de las manos y los nudillos (signo de Gottron), en la parte superior del pecho (erupción en "V") y sobre la parte superior de la espalda y los hombros (signo del chal). Otras manifestaciones dermatológicas pueden incluir lesiones ulceradas, calcificaciones subcutáneas y/o anomalías en el lecho ungueal (por ejemplo, bucles capilares dilatados) detectadas a partir del cribado mediante capilaroscopia periungueal, y en ocasiones incluso a simple vista del observador.

Además de la piel y los músculos, otros órganos pueden estar implicados en pacientes con enfermedad muscular autoinmune. Una tos seca persistente y/o disnea orienta a enfermedad pulmonar intersticial (ILD), que aparece en aproximadamente el 20% de los pacientes con miopatía autoinmune, especialmente aquellos con anticuerpos antisintetasa. Es recomendable que estos pacientes sean tratados de forma conjunta con especialistas en neumología. Los pacientes

con el "síndrome antisintetasa" también pueden presentar dolor en las articulaciones, fiebre y lesiones eczematosas descamativas en las cara lateral de los dedos, lo que se conoce como "manos de mecánico". Asimismo, estudios recientes parecen establecer hallazgos patológicos característicos de este síndrome en la biopsia muscular, muy específicamente la presencia de atrofia y necrosis perifascicular [65].

Los valores séricos de enzimas musculares a menudo, pero no siempre, se encuentran elevados en pacientes con MII activa [62, 77], lo que refleja el grado de daño a la membrana muscular y necrosis. Por lo tanto, los valores séricos de CK tienden a ser especialmente altos en pacientes con MNIM sin tratar, con un valor máximo promedio de alrededor de 10.000 UI/L [78]. Por otro lado, los pacientes con sIBM suelen presentar valores de CK significativamente más bajos; típicamente menores de 1000 UI/L y rara vez tan altos como 3000-4000 UI/L. Los pacientes con DM y PM pueden presentar cifras de CK que van desde la normalidad a más de 50.000 UI/L, dependiendo del grado de lesión de la fibra muscular. Cabe señalar, sin embargo, que algunos pacientes con afectación activa del musculo, especialmente aquellos con DM, pueden presentar ocasionalmente valores discretamente elevados de CK.

Los valores séricos de aldolasa aumentan en muchos pacientes con lesión activa muscular. En algunos casos, los pacientes con MII pueden presentar valores elevados de aldolasa en el contexto de una CK normal. Sin embargo, las elevaciones séricas de aldolasa pueden no ser tan específicas para el daño muscular activo como la CK. Por ejemplo, los pacientes con fascitis aislada pueden presentar valores marcadamente elevados de aldolasa en el contexto de valores normales de CK en suero [77-79]. La presencia de fenómenos de regeneración y la afectación de las fibras musculares más periféricas parecen asociarse a valores elevados de aldolasa mas que de CK [80-81].

Otras enzimas liberadas del músculo esquelético dañado, incluyen la lactato deshidrogenasa y las "enzimas hepáticas" aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa

(ALT). Valores elevados de AST y/o ALT pueden atribuirse erróneamente a lesión o inflamación hepática, siendo útil comprobar el valor de gamma glutamiltransferasa (GGT). Dado que la GGT se libera del hígado dañado, pero no del músculo esquelético, la GGT debe elevarse sólo cuando hay daño hepático [35].

Al igual que en otras enfermedades autoinmunes sistémicas, distintos fenotipos clínicos de miositis suelen asociarse con autoanticuerpos específicos (Tabla 4). Aproximadamente el 70% de los pacientes con miositis tienen uno de los más de 15 autoanticuerpos de miositis identificados hasta la fecha. Estos autoanticuerpos pueden agruparse de acuerdo con el subtipo de enfermedad y/o manifestación clínica.

1.4.1.6. Miopatía necrotizante inmunomediada

La toxicidad muscular es un efecto adverso bien conocido asociado a la administración de estatinas, que en algunos estudios alcanza el 0,4/100.000 personas-año [125]. Sin embargo, no existe un consenso sobre su definición exacta (Tabla 5). En cualquier caso, parece que la presencia de mialgias aisladas, elevaciones moderadas de la CK o la poco frecuente rabdomiolisis con elevación extrema de las CK y fracaso renal parecen ser los síndromes miopáticos relacionados con la administración de estatinas, a los que hay que añadir la ya mencionada MNIM, en donde parece que el mecanismo patogénico contempla una toxicidad asociada a la presencia de trastornos autoinmunitarios, que incluye la enzima sobre la que actúa la estatina (HMGCR) como fuente antigénica.

Tabla 4.

Anticuerpos frente a determinados antígenos como marcadores clínicos en miositis.

Anticuerpos Miositis

Anticuerpos Anti-sintetasa	Antígeno	Características clínicas
Anti-Jo-1 [82]	Histidil t-RNA sintetasa [83]	**Miositis**, enfermedad pulmonar intersticial, Raynaud, artritis, manos de mecánico, erupción cutánea, mas frecuente [84,85]
Anti-PL-7 [86]	Threonil t-RNA sintetasa	**Enfermedad pulmonar intersticial**, miositis, Raynaud, artritis, manos de mecánico, erupción cutánea, frecuente.
Anti-PL-12 [87]	Alanil t-RNA sintetasa	**Enfermedad pulmonar intersticial**, miositis, Raynaud, artritis, manos de mecánico, erupción cutánea, frecuente.
Anti-EJ [88]	Glicil t-RNA sintetasa	Enfermedad pulmonar intersticial, miositis, Raynaud, artritis, manos de mecánico, erupción cutánea.
Anti-OJ [88]	Isoleucil t-RNA sintetasa	Enfermedad pulmonar intersticial, miositis, Raynaud, artritis, manos de mecánico, erupción cutánea.
Anti-KS [89]	Asparaginil t-RNA sintetasa	Enfermedad pulmonar intersticial, miositis, Raynaud, artritis, manos de mecánico, erupción cutánea.
Anti-Zo [90]	Fenilalanil t-RNA sintetasa	**Enfermedad pulmonar intersticial**, miositis, Raynaud, artritis, manos de mecánico, erupción cutánea.
Anti-Ha [91]	Tirosil t-RNA sintetasa	Enfermedad pulmonar intersticial, miositis, Raynaud, artritis, manos de mecánico, erupción cutánea.
Anticuerpos Dermatomiositis		
Anti-Mi-2 [91,92]	Enzima de remodelación de Cromatina [93,94]	Enfermedad grave de la piel, buena respuesta al tratamiento [95-96]

Anti-MDA5 [97]	Diferenciación del melanoma asociado al Gen 5 [98]	Síndrome cardiopulmonar, papulas palmares Ulceras dolorosas orales, ulceraciones cutáneas [97,98]
Anti-TIF1γ [99,100]	Factor 1 γ intermediario de transcripción [101]	Aumento de riesgo de malignidad. [99,100]
Anti-NXP-2 [102]	Proteína nuclear de la matriz	Calcinosis subcutánea. [103-107] Aumento de riesgo de malignidad [107]
Anticuerpos Miopatía Necrotizante Inmunomediada		
Anti-SRP [108]	Partícula de reconocimiento de señales	Grave, Resiste al tratamiento, raro 5%, valores altos de CK [109-112] Tratamiento con Rituximab [113]
Anti-HMGCR	HMG-CoA reductasa [78,115]	Miopatía inmnunomediada asociada a estatina [114,116-118] Anti-HMGCR positiva sin estatinas [117] Tratamiento con IVIG, A veces refractarios a tratamiento [119] IFI HALIP positivo. [120]
Miositis con cuerpos de inclusión esporádica		
Anticuerpo Citosólico 5-nucleotidasa 1A	Catalizador de la hidrólisis de nucleótidos a nucleósidos	Asimétrica, miositis [121,122] Anti-NT5C1A para diferenciar de PM [123] Poca respuesta al tratamiento inmunodepresor [124]

Los mecanismos exactos que subyacen a la miopatía con estatinas no son bien conocidos, e incluyen la disminución del colesterol contenido en las membranas de las células musculares, el agotamiento de los isoprenoides (pirofosfato de farnesilo y pirofosfato de geranilo) o de la coenzima Q10 que favorece la disfunción mitocondrial [126]. Asimismo, algunos factores como el

consumo de alcohol, el hipotiroidismo, o determinados polimorfismos genéticos pueden desempeñar un papel determinante en la toxicidad muscular [127]. A todos estos mecanismos hay que añadirles la recientemente descrita toxicidad en parte inmunomediada, cuya expresión clínica parece ser la MNIM.

Distintos grupos de investigadores describieron una nueva forma de toxicidad muscular relacionada con las estatinas, en donde el sistema inmunológico parecía desempeñar un papel importante [128-130]. El interés de esta entidad radica no sólo en que el mecanismo patogénico implica al sistema inmunitario y puede ser un modelo a estudiar, sino que también es relevante desde un punto de vista terapéutico, ya que la retirada del fármaco en ocasiones no es suficiente para resolver el cuadro y se precisa una intervención con drogas inmunomoduladoras sobre el componente inmunopatológico de esta toxicidad.

Needham et al. [128] en Australia y Grable-Esposito et al. [130] en Boston, identificaron una serie de pacientes que presentaban debilidad muscular, con valores elevados de CK y miopatía necrosante en ausencia de inflamación, y que tenían en común estar en tratamiento con estatinas; este cuadro clínico persistía en algunos pacientes a pesar de la retirada del fármaco, siendo en estos casos necesaria la administración de tratamiento inmunodepresor. Posteriormente, investigadores del Johns Hopkins Myositis Center en Baltimore (EE. UU.) identificaron un nuevo anticuerpo frente a una molécula de 100-200 kDa en el suero de estos pacientes que en estudios ulteriores pudo ser identificado como la HMGCR, enzima sobre la que actúan las estatinas (anti-HMGCR) [78,115]

Epidemiología de la MNIM

La incidencia de MII en la población general es de 2,2-7,7 por millón [131] y las MNIM, que se consideran una enfermedad todavía más rara, representa alrededor del 20% de estos casos. Dos tercios de los pacientes con MNIM presentan anticuerpos específicos, principalmente anti-

SRP y anti-HMGCR [78], aunque también los anti-Jo1 (propios del síndrome por anticuerpos antisintetasa) y anti-Scl70 (marcador de esclerodermia) han sido descritos en asociación a esta forma patológica de miopatía [129]. A pesar de la reciente descripción de algunos casos de MNIM en niños [132-134], esta entidad afecta principalmente a los adultos, con un predominio en el sexo femenino [109,111,135,136]. La MNIM asociada a anti-SRP representa 3-6% de MII, con una edad de inicio de aproximadamente 47 años en pacientes europeos [111]. Los anticuerpos anti-HMGCR se encuentran en 5-7% de los pacientes con MII. De acuerdo con un estudio reciente sobre 206 pacientes europeos con sospecha de MNIM, la edad de inicio fue de 49 años [117]. El HLA-DRB1*11:01 parece asociarse con un aumento del riesgo de desarrollar MNIM en pacientes de raza blanca -caucásicos- y afroamericanos [60,134]. Se sabe que el uso de estatinas está asociado con el desarrollo de MNIM por anti-HMGCR en todas las poblaciones estudiadas. Entre el 37,5 y el 94% de estos pacientes han recibido este tipo de fármacos (Tabla 6). En este caso, la edad de inicio es mayor (64 años [117]). Dado que las estatinas pueden estar presentes en alimentos (arroz rojo) o suplementos dietéticos, algunos sujetos pueden no ser conscientes de haber estado expuestos a estas sustancias, y hay que tener en cuenta que los mismos efectos de toxicidad muscular pueden aparecer en estos pacientes [137].

Clínicamente se presentan con debilidad muscular progresiva en cinturas, que puede ser intensa y mialgias intratables, con poca o ninguna afectación sistémica. Los valores de CK oscilan entre 950 y 45.000 UI/l y los hallazgos electrofisiológicos apoyan el diagnóstico de esta entidad que se confirma mediante la biopsia muscular [138]. La presencia de anticuerpos anti-HMGCR en suero y la asociación al alelo de HLA-DRB1*11:01[60] apoyan la naturaleza inmunomediada del proceso. Es imprescindible realizar estudios inmunohistoquímicos, ya que la presencia de necrosis muscular diseminada en ausencia de componente inflamatorio, junto con la expresión de antígenos de clase I del HLA en las fibras musculares necróticas y en las que no lo son, confirma el diagnóstico.

El reconocimiento de esta MNIM es relevante, ya que en ocasiones no basta con la retirada del fármaco, sino que se debe instaurar el correspondiente tratamiento inmunodepresor, que en la mayoría de los casos es eficaz y permite resolver el cuadro pudiendo retirarse con el tiempo. En general, los valores plasmáticos de anti-HMGCR se correlacionan con los de CK y con la evolución clínica del cuadro, llegando a negativizarse, de ahí el interés de su determinación precoz para confirmar su positividad [75].

Ante los datos disponibles, se ha planteado que la exposición a estatinas aumentaría la expresión de HMGCR y que esta se acompañaría de una proteólisis aberrante de dicha molécula, con la consiguiente liberación de péptidos proteicos que, a su vez, serian presentados por las células presentadoras de antígeno vía HLA clase II, favoreciendo una respuesta inmunitaria en un contexto de exposición continuada a estatinas. La necrosis muscular inmunomediada derivada de este proceso favorecería la aparición de fibras musculares regenerativas, que es sabido que expresan HMGCR en exceso, frente a la que actuarían los anti-HMGCR, cerrando así el circulo vicioso de lesión por autoinmunidad [139].

Las estatinas siguen siendo los fármacos más eficaces disponibles para el tratamiento de la dislipemia y cumplen un papel importante en el tratamiento de la aterosclerosis y de sus complicaciones cardiovasculares [9,10]. Algunos individuos, probablemente con una cierta predisposición genética, presentaran fenómenos autoinmunitarios y/o enfermedades autoinmunes en relación con la administración de estos fármacos, entre los que tiene un protagonismo propio la MNIM.

Es posible que, en individuos genéticamente predispuestos, las estatinas actúen como desencadenantes en algunos casos, actuando como agentes proapoptóticos, que liberan antígenos nucleares al torrente sanguíneo o provocan cambios moleculares susceptibles de inducir la producción de autoanticuerpos. Es frecuente que no baste con la retirada del fármaco, precisando tratamiento inmunodepresor para el control del trastorno autoinmunitario relacionado con las

estatinas. La eficacia de este tratamiento es un argumento mas a favor de la existencia de un conflicto inmunológico a este nivel.

La entidad descrita recientemente como MNIM con anticuerpos anti-HMGCR en relación con la administración de estatinas es un ejemplo de toxicidad en el que se encuentra implicado el sistema inmunológico, y podría servir de modelo explicativo de algunos fenómenos autoinmunitarios relacionados con las estatinas.

Tabla 5.

Definiciones propuestas para la miopatía relacionada con estatinas

Entidad clínica	ACC/AHA/NHLBI	NLA	FDA

Miopatía	Término general que se refiere a cualquier enfermedad de los músculos	Los síntomas de mialgia (dolor muscular o inflamación), debilidad o calambres, además de CK > 10 veces el LSN Sin datos	CPK>10 SLN
Mialgia	Dolor o debilidad sin elevación de CK.	Sin datos	Sin datos
Miositis	Síntomas musculares con elevación de la CK	Sin datos.	Sin datos
Rabdomiolisis.	Síntomas musculares con elevación significativa de la creatina fosfocinasa (típicamente >10 LSN), y la elevación de la creatinina (por lo general, con orinas oscuras y mioglobina urinaria	La creatina fosfocinasa>10.000UI/l o creatina fosfocinasa>10 LSN, además de una elevación de la creatinina sérica o intervención medica con hidratación intravenosa	La creatina fosfocinasa >50 LSN y evidencia de daño de órgano, como compromiso renal

ACC/AHA/NHLBI: American College of Cardiology/American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute; FDA: Food and Drug Administration; LSN: límite superior de la normalidad; NLA: National Lipid Association (207). CK: Creatina Fosfocinasa.

Tabla 6.

Porcentaje de pacientes expuestos a estatinas con MNIM asociada a anticuerpos anti-HMGCR

Estudio	País	Número de pacientes	Exposición Estatinas

		MNIM	(%)
Christopher-Stine, 2010	USA	16	63
Mammen, 2011	USA	45	67
Werner, 2012	USA	55	72,6
Allenbach, 2014	Francia	45	44
Limaye, 2014	Australia	19	94
Watanabe, 2015	Japón	8	37,5
Alvarado, 2016	España	17	96

1.4.2 Hepatitis autoinmune

La hepatitis autoinmune (HAI), es una entidad inflamatoria crónica de naturaleza autoinmune cuya patogénesis aun no es bien conocida [140]. Se caracteriza por la elevación de las enzimas hepáticas a expensas de las aminotransferasas y frecuentes manifestaciones autoinmunes extrahepáticas con valores normales o mínimamente aumentados de fosfatasa alcalina, asociado a hipergamaglobulinemia junto con títulos elevados de distintos autoanticuerpos. Esta enfermedad es más común en el género femenino y las pacientes suelen presentar una buena respuesta al tratamiento inmunodepresor [141,142].

En las muestras de biopsia hepática es característica la presencia de un infiltrado inflamatorio en la zona periportal [142]. En 1999, un grupo internacional desarrolló un sistema de puntuación diagnóstico [143] que se simplificó posteriormente [144].

La etiología de la hepatitis autoinmune no es bien conocida, pero se aduce que está mediada por una reacción inmune frente a autoantígenos hepatocitarios en el contexto de un trastorno de la inmunorregulación que en personas genéticamente predispuestas se puede inducir por un factor externo, como virus, hierbas medicinales o medicamentos [140,141].

Varios ensayos clínicos sugieren algunos fármacos como inductores de HAI [36,145]. Entre los más reconocidos están la oxitocina, nitrofurantoína, minociclina, clometacina, alfa-metildopa y también las estatinas [141,146]. Así, Björnsson et al. [147], en una serie de 261 pacientes con HAI, encontró en un 9,2% (24 pacientes) un fármaco responsable del cuadro. Un grupo francés [145] en una serie consecutiva de 65 pacientes con HAI, identificaron un 12% inducida por medicamentos. En esta línea, 5 de cada 29 (17%) pacientes con HAI en España fueron diagnosticados de HAI inducida por fármacos [148]. El creciente uso de fármacos como las estatinas, entre otros agentes farmacológicos, han llevado a un aumento en el diagnostico de HAI o "toxicidad hepática con características autoinmunes", así catalogados por no cumplir todos los criterios de HAI [149-156].

La elevación de transaminasas séricas de origen hepático se observa en aproximadamente el 1-3% de los individuos tratados con estatinas, pero ocasionalmente producen reacciones más

graves como toxicidad hepática grave, causada posiblemente por un mecanismo de toxicidad directa sobre los hepatocitos acompañado de una agresión autoinmune, puesta de manifiesta por la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) [141,157-162]. En algunos casos, el protagonismo de la agresión inmune es mayor habiéndose comunicado casos de HAI en relación con la exposición a las estatinas, en general, pocos meses tras su administración, si bien el tiempo de latencia puede ser mayor [163-166].

En el mecanismo de producción de la HAI, parecen estar implicadas vías de activación inmunológica que producirían una expansión de linfocitos T $CD8^+$, lo que evidencia la participación de las moléculas de clase I y II del sistema HLA en la presentación del antígeno [167-171]. De forma similar a lo descrito previamente, el fármaco parecería actuar como desencadenante (*trigger*), generando toxicidad hepática con presencia de autoanticuerpos, que persistiría a pesar de la retirada del fármaco [171,174], siendo preciso, en la mayoría de los casos, administrar tratamiento inmunodepresor para resolver el proceso, escenario muy similar al propuesto en la MNIM.

La presencia de ANAs positivos en aquellos pacientes que presentan toxicidad hepática inducida por fármacos tiene un significado desconocido y requiere más estudios; pero, en el 2002, Ohmoto y Yamamoto, estudiaron 64 pacientes con lesión hepática inducida por fármacos e identificaron a 6 de ellos con positividad para los ANA [172] encontrando una mayor prevalencia de enfermedades autoinmunes en este grupo, tales como hepatitis autoinmune, artritis reumatoide, o tiroiditis de Hashimoto. Los autores sugieren que los pacientes con hepatitis tóxica y ANA positivos también podrían desarrollar una HAI [173], por lo que deben controlarse a largo plazo, incluso si la función hepática se ha recuperado. Las estatinas pueden volver a reintroducirse en ciertos casos, pero existe el riesgo de que la HAI reaparezca. El riesgo de presentar toxicidad hepática aumenta con la edad para ciertos medicamentos, como las estatinas [174-179].

1.4.3 Artritis reumatoide

Los estudios realizados en modelos murinos sobre artritis reumatoide (AR) y estatinas han demostrado que estas previenen la artritis inducida por colágeno (AIC) de igual forma que detiene su progresión cuando esta ya se ha instaurado. Análisis *in vivo* también han demostrado inhibir significativamente la respuesta celular y humoral específica contra el colágeno por los linfocitos Th1. Las estatinas también han demostrado inhibir citocinas proinflamatorias como el TNF-α, IL-6, y el IFN-γ [180,181].

Varios estudios han mostrado una mejoría en la actividad inflamatoria y parámetros surrogados de riesgo vascular en pacientes con AR tratados con estatinas [182,183]. Por ejemplo, en un estudio de asignación aleatoria de 116 pacientes con AR que recibieron tratamiento con atorvastatina 40 mg/d o placebo junto al tratamiento modificador de la enfermedad se observó una mejoría significativa de la actividad de la enfermedad mediante la escala de la actividad de AR (DAS28) en los pacientes tratados con estatinas [184]. Otro estudio de cohortes, utilizó una base de datos clínicos para identificar nuevos casos de AR entre los adultos que recibieron tratamiento estatinas entre 1998 y 2007. Para evitar algún tipo de sesgo se utilizó como comparador, el riesgo de osteoartritis, (OA) una enfermedad común no asociada al uso de estatinas. Durante el periodo de seguimiento, se detectaron 2.578 nuevos casos de AR (3,07 per 1.000 personas-años) y 17.878 casos nuevos de OA (138,144 per 1.000 personas-años). La *ratio* de incidencia de AR en pacientes que no tomaban estatinas fue 51% más alta en comparación con los pacientes que estaban bajo tratamiento con estatinas, sugiriendo un posible efecto beneficioso de las estatinas en prevención primaria de la AR [185]. En otro estudio, incluyendo pacientes con AR [186] y un grupo control de 42 sujetos tratados con atorvastatina (dosis diaria 20 mg), se mostró que los pacientes tratados con estatinas presentaban mayor generación de células T-reg y T primarias, aumentando la función preexistente de las células T-reg *in vitro*. Concomitantemente, la atorvastatina redujo significativamente los valores de velocidad de

sedimentación globular, proteína C reactiva y actividad de la AR [187]. Finalmente, otro estudio de cohortes en pacientes con AR exploró el papel de la atorvastatina sobre la inflamación, la actividad de la enfermedad, la función endotelial y la rigidez arterial. Este estudio incluyó a 30 pacientes con AR precoz, divididos al azar en 2 grupos. El grupo 1 (n = 15) recibió metotrexato (MTX) y dosis bajas de prednisona. El grupo 2 (n = 15) recibió MTX y prednisona más tratamiento con atorvastatina (40 mg/día). Diez personas, ajustadas por edad y sexo, sirvieron como controles. Se midió la actividad de la enfermedad, el perfil lipídico, el acido malondialdehído (MDA), el anti-TNF, la resistina, la adiponectina y la dilatación mediada por el flujo de la arteria braquial (FA) antes y después de 6 meses del tratamiento. El grupo que recibió atorvastatina combinada con la terapia con MTX redujo significativamente el colesterol total en sangre, las lipoproteínas de baja densidad, los triglicéridos y las lipoproteínas de alta densidad. Todas las variables de actividad de la enfermedad, MDA sérico, TNF-alfa, resistina, y adiponectina, mejoraron significativamente mediante esta combinación de fármacos. Todo esto sugeriría que en pacientes con AR, el tratamiento con estatinas conduce a una reducción de la actividad de la enfermedad, factores de riesgo vascular y una mejora de la función endotelial [188]. En resumen, se puede decir que al margen del beneficio sobre el riesgo vascular, el tratamiento con estatinas parece desempeñar un papel protector o coadyuvante en el tratamiento de esta enfermedad, atribuido a los efectos pleiotrópicos del fármaco.

1.4.4 Síndrome por anticuerpos antifosfolípido

Las estatinas podrían desempeñar un papel en el síndrome por anticuerpos anti-fosfolípido (APS) debido a sus propiedades antitrombogénicas y antiinflamatorias. En un estudio

experimental con ratones, la fluvastatina demostró disminuir significativamente la trombosis mediada por APS y la activación de células endoteliales in vivo [189]. La activación endotelial mediada por el anticuerpo anti-β-2-glicoproteína I (anti-β2–GPI) parece inhibirse por las estatinas. Se utilizó fluvastatina en un experimento *in vitro* y se observó que esta estatina reducía la activación de las células endoteliales de la vena umbilical humana (CEVUH), la expresión de E-selectina y de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) inducida por anticuerpos anti-β 2-GPI , IL-6 y lipopolisacáridos [190]. En otro estudio, se purificaron IgGs de 4 pacientes con APS (IgG-APS) y de sueros control (IgG-SDC), y las CEVUH se incubaron con IgG-APS o IgG-SDC. Las preparaciones de IgG-APS aumentaron significativamente la expresión del factor tisular en las células endoteliales de una manera dosis-dependiente. La fluvastatina inhibió los efectos de las IgG-APS sobre la expresión del factor tisular, y este efecto también fue dependiente de la dosis. [191].

Se ha demostrado que la fluvastatina revierte los efectos proinflamatorios y protrombóticos de los anticuerpos APS *in vitro* y en ratones. Se midió el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor tisular soluble, la ICAM-1 soluble, la E-selectina, la PCR y la molécula de adhesión celular vascular soluble (sVCAM-1) en el suero de 9 pacientes con APS antes y después de 30 días de tratamiento con fluvastatina, encontrándose disminución de los valores de VEGF, sTF y TNFα en pacientes con APS tratados con fluvastatina [192].

El aumento de la actividad del factor tisular y la regulación positiva de las citoquinas proinflamatorias está relacionado con la trombosis en el síndrome APS. En un estudio clínico, 42 pacientes diagnósticados de APS con trombosis y 35 donantes sanos recibieron fluvastatina (20 mg/día) durante 1 mes. Se midió el FT, los receptores 1 y 2 del activador de la proteína VEGF. Se observó una inhibición significativa de FT y de receptores de activador de proteína VEGF después de 1 mes de tratamiento con fluvastatina. Esta inhibición se relacionó con la inhibición de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK) y la actividad de unión al

ADN de NFkB. La inhibición in vivo de p38 MAPK y NFkB reforzó la hipótesis de un efecto inhibitorio directo de la fluvastatina sobre los mecanismos moleculares de la inducción de TF en los monocitos de pacientes con APS [193].

En el 13º Congreso Internacional de Anticuerpos Antifosfolípidos, un grupo de investigadores elaboró un documento de consenso sobre la tromboprofilaxis primaria y secundaria en individuos con APS. Este documento se basó en una revisión sistemática y crítica de la bibliografía existente. El grupo estableció cinco preguntas clave, una de las cuales fue identificar el mejor tratamiento para prevenir la trombosis recurrente en pacientes con APS y eventos arteriales o venosos. Se seleccionaron documentos que contenían datos originales, y documentos adicionales a partir de las referencias de los artículos seleccionados [194]. La fuerza de las recomendaciones y el grado de evidencia se clasificaron de 1 a 2 y de A a C, respectivamente, utilizando el sistema de "American College of Chest Physicians" [195]. Además, se acordaron algunas recomendaciones sobre la base de la experiencia de los autores, y esas recomendaciones fueron etiquetadas como "no tradicionales". En base a esto, se llegó a la conclusión de que las estatinas podrían tener un papel coadyuvante en la prevención de la trombosis en pacientes con APS sin riesgo adicional de sangrado [194] Scoble T et al. [196] también contemplan el papel potencial de la terapia con estatinas en el tratamiento del síndrome por APS refractario. Dado los efectos pleiotrópicos ya comentados, los resultados prometedores de los estudios *in vitro* e *in vivo* mencionados anteriormente y los resultados del ensayo JÚPITER que demostraron un riesgo reducido de tromboembolia venosa, la terapia con estatinas puede considerarse como una terapia adicional o complementaria en los pacientes con síndrome por APS [197]

1.4.5 Lupus eritematoso sistémico

En varios modelos murinos de lupus eritematoso sistémico (LES), las estatinas han mostrado efectos beneficiosos. La administración intraperitoneal de estatinas a ratones con LES

dió como resultado una reducción significativa en los valores de anticuerpos anti-DNA, lesión glomerular, proteinuria y proliferación de células T. El colesterol sérico en ratones con lupus tratados con atorvastatina cayó a valores similares a los encontrados en ratones jóvenes antes de la aparición de la enfermedad [198]. En otros ratones la administración de pravastatina tuvo un efecto sobre la producción de anticuerpos anti-DNA en suero, y la combinación de pravastatina e inhibidor de la ECA (imidapril) fue superior a la monoterapia en la nefritis lúpica murina. En el modelo animal murino gld.ApoE-/-, que carece de ligando Fas funcional y apolipoproteína E y presenta características similares a lupus con lesiones ateroscleróticas graves, el tratamiento con simvastatina a largo plazo redujo el área de lesión aterosclerótica, linfadenopatía, enfermedad renal y la producción de citocinas proinflamatorias [199-201].

En un estudio de casos y controles para evaluar la eficacia de la atorvastatina en la mejora de la vasodilatación en 64 pacientes con LES, la atorvastatina a dosis de 20 mg/día mejoró la función endotelial [200]. Alternativamente, un estudio de asignación aleatoria, a doble ciego, controlado con placebo para evaluar los efectos de la fluvastatina sobre los resultados cardiovasculares en receptores de trasplante renal con LES se observó que la administración de fluvastatina durante una media de 7,3 años redujo el riesgo de episodios cardiacos mayores [202]. Finalmente, en un estudio preliminar sobre el potencial terapéutico de las estatinas en pacientes con LES que eran refractarios a la terapia agresiva convencional, el tratamiento con simvastatina (80 mg/día durante 8 días) indujo una reducción rápida y significativa de la proteinuria en 3 pacientes [188].

1.4.6 Vasculitis

En un modelo experimental con ratas, sobre la enfermedad de Kawasaki (EK), la atorvastatina inhibió la proliferación de linfocitos de una manera dependiente de la dosis y

moduló los procesos patógenos críticos que conducen a la formación de aneurismas en esta enfermedad. Además, se observó también la inhibición de la producción de MMP-9 inducida por IL-2, TNF-a. El efecto inhibitorio fue rescatado completamente por ácido mevalónico [203].

La remodelación vascular postinflamatoria induce el desarrollo de arteriosclerosis temprana en la EK [204]. En un estudio con 11 pacientes con EK (rango de edad de 7 a 25 años), los efectos de la fluvastatina en la remodelación vascular se evaluaron clínicamente observándose una mejoría estadísticamente significativa en los resultados finales de la enfermedad atribuidos al efecto de las estatinas sobre el endotelio vascular y a sus efectos inmunomoduladores [205].

1.4.7 Espondilitis anquilosante

Las propiedades antiinflamatorias de las estatinas y la eficacia clínica en la AR indujeron a los investigadores a llevar a cabo un estudio piloto abierto sobre el efecto de las estatinas (rosuvastatina) sobre la actividad de la enfermedad en pacientes con espondilitis anquilosante (EA). Quince pacientes consecutivos con EA se trataron con rosuvastatina (20 mg / día) durante 12 semanas. Los pacientes fueron incluidos si tenían enfermedad activa con al menos 4 puntos en el índice de actividad de la enfermedad de la espondilitis anquilosante (BASDAI, 0-10) y una puntuación de dolor de al menos 4 en la escala analógica visual (VAS 0-10). Se determinaron parámetros clínicos tales como BASDAI, Índice funcional de la EA (BASFI, 0-10), índice de metrología de la espondilitis anquilosante (BASMI, 0-10), escala del bienestar general según el médico/paciente y puntuación del dolor. El BASDAI, BASMI, la escala numérica de dolor, y el bienestar general presento mejoría significativa durante el período de tratamiento [206].

1.4.8 Esclerodermia

La esclerodermia o esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad en la que se han utilizado numerosos tratamientos, en general con escaso éxito. También las estatinas. En un estudio experimental, pudo apreciarse que la simvastatina inhibió la expresión génica del colágeno tipo

1 en fibroblastos de pacientes con ES [207]. Asimismo, en un ensayo piloto que incluyó 18 pacientes con ES, sin hiperlipidemia, se investigó el efecto de la pravastatina, a dosis bajas, sobre la coagulación, en los marcadores de activación plaquetar y de lesión endotelial vascular. Después del tratamiento con pravastatina (10 mg/día durante 8 semanas), se observó un aumento de la actividad plasmática del factor de von Willebrand (FVW) e inhibición del complejo trombina-antitrombina (CAT) en el grupo tratado con estatinas [208]. En un ensayo de asignación aleatoria, se dividieron 40 pacientes con ES para recibir tratamiento con atorvastatina (n = 20; dosis, 40 mg/día) o placebo (n = 20) como adyuvante del tratamiento habitual que comprendía colchicina, metrotrexato, D-Penicilamina, con una duración total de 6 meses. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de la terapia con estatinas en la mejora de la disfunción endotelial en ES mediante la investigación del efecto de las estatinas sobre los marcadores que reflejan la activación endotelial en ES. Los marcadores de disfunción endotelial incluyeron ET-1, valores plasmáticos de nitrato y trombomodulina. También se evaluaron el fibrinógeno, hs-CRP, ESR, peróxido de lípido y malondialdehído. Después de 6 meses de tratamiento, los valores de ICAM-1, sE-selectina, FVW, fibrinógeno, ESR, hs-CRP, así como LP y MDA disminuyeron y el óxido nítrico aumentó significativamente en el grupo tratado con estatinas cuando se comparó con el grupo placebo. Este estudio demostró que las estatinas podrían mejorar la función endotelial en pacientes con ES probablemente en relación a los efectos pleiotrópicos atribuidos a estos fármacos [209].

Además de los estudios mencionados, las estatinas también se han utilizado para tratar el fenómeno de Raynaud (FR) y las ulceras digitales (UD) asociadas a ES. Ochenta y cuatro pacientes con ES y FR secundario, a pesar del tratamiento con vasodilatadores fueron asignados al azar en 2 grupos; el primer grupo (n = 56) recibió 40 mg/día de atorvastatina durante 4 meses; el segundo grupo (n = 28) recibió placebo. Setenta y cinco voluntarios sanos fueron incluidos

como controles. La evaluación de FR y UD se realizó mensualmente. La primera variable valorada fue el número de UD. Para medir otros resultados se usaron como criterios el Índice de Discapacidad de Salud de Esclerodermia modificado (SHAQ-DI), la seguridad y la tolerabilidad. Y como parámetros de laboratorio los valores medios de los marcadores inflamatorios IL-6, TNF-a, ESR y hs-CRP, los marcadores de activación endotelial ICAM, selectina sE, ET-1 y MCP y los marcadores oxidativos de peróxido lipídico (PL) y MDA. La actividad del FVW y el fibrinógeno se midieron antes y después del tratamiento. El número total de UD se redujo significativamente en el grupo de estatinas. Los pacientes bajo tratamiento con estatinas tuvieron una incidencia media de 1,6 nuevas úlceras por paciente frente a 2,5 nuevas úlceras por paciente en el grupo placebo. Hubo una mejoría estadísticamente significativa en la puntuación SHAQ-DI en los pacientes que recibieron estatinas versus los que recibieron placebo. Los marcadores de activación endotelial ICAM, selectina sE, ET-1 y MCP, y los marcadores oxidativos LP y MDA, así como la actividad de FVW y fibrinógeno disminuyeron significativamente en el grupo tratados con atorvastatina [210,211].

1.4.9 Corolario

Así pues del estudio de la bibliografía médica se desprende un rol de las estatinas como grupo farmacológico relevante no solo en aspectos centrados en la etiopatogenia de las

enfermedades sistémicas autoinmunes, sino también como opción terapéutica a tener en cuenta en estos pacientes, tanto por su disminución de riesgo vascular como por los posible efectos pleiotrópicos contemplados en la bibliografía médica. Es por tanto de extrema utilidad e interés explorar la presencia de anticuerpos anti-HMGCR en estos pacientes, no sólo con la idea de detectar cuadros de MNIM asociados, sino también con el fin de identificar, en el caso de estos anticuerpos anti-HMGCR fueran positivos, un mayor riesgo de desarrollar manifestaciones musculares inmunomediadas. Ello podría poner en cuestión el uso de estatinas en este grupo de pacientes, que aún en ausencia de una contrastada evidencia científica parecen tener efectos potencialmente beneficiosos.

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las estatinas son un grupo de fármacos hipolipemiantes cuya eficacia ha sido demostrada en múltiples estudios clínicos. Se consideran indispensables en pacientes con enfermedad coronaria, arterial periférica, carotidea y cerebrovascular, así como en diabetes y entidades de alto riesgo para enfermedades cardiovasculares. El número de sujetos en tratamiento con estos fármacos se incrementa día a día, y a pesar de que son bien toleradas por la mayoría de los pacientes y de tener un perfil muy seguro, sus efectos adversos adquieren especial relevancia, destacando las alteraciones inmunológicas, hepáticas, y las mas frecuentes, las alteraciones musculares.

Entre las alteraciones musculares asociadas al tratamiento con estatinas se describen desde trastornos leves como las mialgias, a los más graves como la rabdomiolisis, afortunadamente poco frecuente. Hay que añadir, además, la recientemente descrita miopatía necrosante inmunomediada, vinculada con la presencia del anticuerpo anti-HMGCR (100-200 kDa) en suero. Los mecanismos etiopatogénicos de esta entidad no están bien establecidos todavía. Si los fenómenos de autoinmunidad implicados en la MNIM y los anticuerpos anti-HMGCR desempeñan algún papel o están asociados a otras enfermedades autoinmunes como el LES, la AR o la esclerodermia, o incluso, si se trata de un modelo que explique la hepatitis tóxica-autoinmune ocasionada por estatinas, son aspectos no conocidos y merecedores de investigación.

A la luz de lo expuesto, el objetivo global de esta tesis doctoral es profundizar en el conocimiento de las estatinas como desencadenante de procesos autoinmunes y sus asociaciones, así como en el análisis de nuevas técnicas de detección de los anti-HMGCR.

2.2 OBJETIVOS

1. Estimar la prevalencia de anticuerpos anti-HMGCR en una cohorte de pacientes atendidos en atención primaria en tratamiento con estatinas.

2. Estudiar de la prevalencia de los anticuerpos anti-HMGCR en distintas enfermedades sistémicas con énfasis en la hepatitis autoinmune y en las miopatías inflamatorias, especialmente en la MNIM, así como en población de elevado riesgo vascular tratados con altas dosis de estatinas, tales como los pacientes con ictus en prevención secundaria o pacientes con dislipemia familiar grave

3. Determinar la fiabilidad de las diferentes técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-HMGCR (comercial *versus* la desarrollada en nuestro laboratorio *in-house*).

4. Describir las características clínicas de una amplia cohorte de pacientes con MNIM y anticuerpos anti-HMGCR atendidos en nuestro centro (Hospital Vall d'Hebron) y en otros centros colaboradores, y establecer el valor de la técnica IFI en triple tejido de rata en el diagnóstico de la MNIM.

5. Finalmente establecer en base a estos resultados y nuestra experiencia un algoritmo diagnóstico-terapéutico de actuación en pacientes con sospecha de manifestaciones musculares atribuidas a estatinas.

3. PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO, MATERIAL Y MÉTODOS, Y RESULTADOS

Esta tesis doctoral comprende 4 estudios, diseñados para dar respuesta a los objetivos planteados. Estos estudios son los siguientes:

- Estudio de la prevalencia de anticuerpos anti-HMGCR en una cohorte de pacientes atendidos en atención primaria en tratamiento con estatinas.

- Estudio de la prevalencia de los anticuerpos anti-HMGCR en enfermedades autoinmunes sistémicas y en pacientes con ictus y dislipemias familiares en tratamiento con estatinas.

- Estudio comparativo entre diferentes técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-HMGCR (comercial *versus* desarrollado en nuestro laboratorio *in-house*).

- Descripción de la cohorte de pacientes con miopatía necrosante inmunomediada y anticuerpos anti-HMGCR atendidos en Hospital Vall d'Hebrón y en otros centros colaboradores; descripción de un nuevo patrón mediante la técnica IFI en triple tejido de rata y confirmación por blot y de un algoritmo de actuación.

A continuación se ofrece una descripción detallada de cada uno de los siguientes estudios. Para mejor compresión de la lectura, en cada caso se expone secuencialmente la metodología y resultados correspondientes.

Primer Estudio

Estudio de la prevalencia de anticuerpos anti-HMGCR en una cohorte de pacientes atendidos en atención primaria en tratamiento con estatinas

3.1.1 Pacientes

Estudio transversal de prevalencia, con inclusión de 99 pacientes adultos (mayores de 18 años) que recibían tratamiento con estatinas por dislipemia y para control de factores de riesgo vascular, pertenecientes a una cohorte histórica de sujetos atendidos en atención primaria en el área del Carmel en la ciudad de Barcelona. Se eligió una muestra a conveniencia.

Los pacientes fueron evaluados sistemáticamente en las consultas externas del centro de atención primaria, realizándose en cada caso una historia clínica estandarizada y una exploración física reglada buscando signos y síntomas específicos y/o asociados a miopatía (algias, debilidad muscular, test de *rolling* -dificultad a estirarse y levantarse de la camilla de forma autónoma), además de un estudio analítico que incluía la determinación de enzimas musculares (creatinfosfoquinasa, [CK]).

3.1.2 Material y Métodos

En las muestras séricas recogidas de los pacientes de esta cohorte se determinaron las siguientes variables analíticas en el Laboratorio de Bioquímica y de Inmunología del Hospital Valle d'Hebron: colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, CK, perfil tiroideo (TSH, T4 libre) y anticuerpos anti-HMGCR mediante dos técnicas de ELISA: una comercial, y otra realizada en nuestro laboratorio (*in-house*) con antígeno comercial.

3.1.2.1 ELISA Comercial

Los anticuerpos anti-HMGCR se determinaron mediante el kit QUANTA Lite HMGCR (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una muestra se consideró positiva cuando los valores detectados fueron iguales o superiores a 20 unidades

3.1.2.2 Anti-HMGCR in-house ELISA

En cada uno de los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA) se dispensaron 50 µL de una solución de tampón fosfato salino (PBS) que contenía 100 ng de HMGCR (Sigma, St. Lois, MO, USA) o disolvente solo, es decir, PBS (para determinar la unión inespecífica de cada muestra). La placa se envolvió en papel de

aluminio y se mantuvo toda la noche en la nevera a 4ºC. Tras lavar dos veces con PBS/0,05% Tween 20 (solución de lavado), se añadieron 200 µL de solución de bloqueo [PBS/0,05% Tween 20/2% albúmina bovina sérica (Sigma)]. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se efectuaron 2 lavados con la solución de lavado. Los sueros (50 µl de una solución 1:400 en tampón de bloqueo) se añadieron por duplicado (así como en el pocillo que sólo contenía PBS) y se incubaron durante 1 hora a 37ºC. Después de efectuar 6 lavados, en cada pocillo se añadieron 50 µL de una solución 1:10.000 (en solución de bloqueo) de anticuerpo anti-IgG humana (específica de cadena-γ y desarrollada en cabra) marcada con peroxidasa de rábano picante (Sigma). La placa se incubó durante 30 min. a 37ºC, se lavó 6 veces y la reacción colorimétrica se obtuvo tras añadir 50 µL de 3,3′,5,5′-tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Finalmente, la placa se incubó durante 30 minutos a 37ºC, se añadieron 50 µl de una solución 2N H_2SO_4 para parar la reacción, y se leyó la densidad óptica (D.O.) a 450 nm en un espectrofotómetro (Labsystems iEMS reader MF, Barcelona, Spain). La D.O. correspondiente a la unión inespecífica (pocillos sin el antígeno) se substrajo de la media obtenida para los dos pocillos con antígeno. Una muestra positiva de referencia (cedida amablemente por el Prof. Andrew L Mammen, Baltimore, Maryland, USA) fue incluida en cada placa. El punto de corte para positividad en ELISA se estableció en tres desviaciones estándar (0,074) sobre el valor medio obtenido (0,152) en una muestra de 50 sueros de controles sanos.

3.1.3 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los datos demográficos recogidos en la cohorte. Se utilizó la media aritmética, desviación estándar, mediana y cuartiles según las características de la variable continua, y frecuencias y porcentajes en el caso de las variables categóricas. Se estimó la prevalencia de los anticuerpos anti-HMGCR como el porcentaje de casos positivos sobre el total de casos estudiados, y se calculó el intervalo de confianza al 95%.

3.1.4 Resultados

Se analizaron un total de 97 (42 mujeres) pacientes de 99 posibles, ya que 2 muestras se extraviaron durante el proceso de recolección de las mismas. La media (DE) de edad fue 64,33 (DE 6,97) años y la estatina utilizada con mayor frecuencia fue la simvastatina (53%), seguida de la atorvastatina (23%) y de la pravastatina (22%). Entre las variables cuantitativas, los valores de CK se mantuvieron en rangos entre 32 y 559 UI/L (valores normales < 195 UI/L), con una media de 109 UI/L. El resto de resultados de las variables (perfil lipídico, CK, TSH) no presentaron ninguna asociación clínica relevante o estadísticamente significativa.

Once (11%) pacientes referían algias musculares inespecíficas, 5 (5%) presentaron un test de *rolling* indeterminado, y solamente 3 (3%) presentaron debilidad muscular leve. La prevalencia de anticuerpos anti-HMGCR fue del 0% (IC 95% 0 - 3,73), cuando se realizó este estudio con ambos test no demostró positividad en ningún paciente, no observándose pues diferencias entre ambas pruebas de ELISA (comercial vs. *in-house*).

3.1.5 Discusión y Conclusiones

Analizados los resultados de los datos extraídos de la cohorte de pacientes de atención primaria en tratamiento con estatinas en el área del Carmel de la ciudad de Barcelona, no se detecto positividad de anticuerpos anti-HMGCR con ninguno de los dos tests de ELISA. Las variables clínicas analizadas reflejaron que algunos pacientes presentaron mialgias musculares (11%), debilidad muscular (3%) y un test de *rolling* dudosamente positivo (5%) pero no fueron

lo suficientemente relevantes para el diagnóstico final de MII. Se puede concluir entonces que la determinación de anticuerpos anti-HMGCR cumple un rol fundamental a la hora de completar el estudio y diagnóstico de MNIM, al menos en lo referente a los pacientes estudiados de esta cohorte. Es recomendable realizar la determinación de los anticuerpos en sujetos con alta probabilidad pretest para valorar adecuadamente el resultado y/o alternativamente confirmar el resultado por otra técnica como la inmunoprecipitación IVTT IP (prueba de referencia). Nuestros resultados son concordantes con estudios anteriores donde la prevalencia de este anticuerpo es baja (<1%) en la población general en tratamiento con estatinas [116].

Segundo Estudio

Estudio de la prevalencia de los anticuerpos anti-HMGCR en enfermedades autoinmunes sistémicas y en pacientes con ictus y dislipemias familiares en tratamiento con estatinas.

3.2.1 Pacientes

Estudio transversal de prevalencia de anticuerpos anti-HMGCR sobre un total de 333 muestras analizadas que incluían pacientes con diagnóstico de enfermedades autoinmunes sistémicas [lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria (antes cirrosis biliar primaria), miopatías inflamatorias idiopáticas] y pacientes con otras enfermedades no autoinmunes en tratamiento con

estatinas (accidentes cerebro vasculares y dislipemia familiar grave). Todos estos pacientes realizaban seguimiento en la unidad de enfermedades autoinmunes sistémicas, unidad de lípidos y servicio de Neurología respectivamente del Hospital General Vall d'Hebron de la ciudad de Barcelona, en el periodo comprendido entre 1983-2016. Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron informados y dieron su consentimiento para la utilización de su suero en esta investigación.

En este estudio y dentro del primer grupo (enfermedades autoinmunes sistémicas) se decidió analizar de forma más especifica dos subgrupos de pacientes: las hepatitis autoinmunes y las miopatías inflamatorias. Los pacientes con hepatitis autoinmunes fueron analizados a partir de la hipótesis de que el fenómeno de toxicidad inmunomediada propio de las miopatías necrosantes asociadas a estatinas podría explicar también la toxicidad hepática y autoinmune, poco frecuente pero bien documentada en algunos casos publicados en la bibliografía médica. Por lo que parecería congruente la búsqueda de anticuerpos anti-HMGCR como expresión de ambos procesos.

Asimismo, y dado que estos anticuerpos se han descrito en pacientes con un fenotipo patológico de MNIM, fenotipo incluido y reconocido dentro de las MII, se creyó oportuno analizar la cohorte de miopatías inflamatorias de nuestro centro.

Los datos clínicos, que incluían signos y síntomas, curso clínico y tipo de estatina, así como los datos demográficos se obtuvieron a partir de la revisión sistemática del historial medico de los pacientes.

3.2.2 Material y Método

Todas las muestras detalladas anteriormente se analizaron mediante el ensayo ELISA comercial de la casa INOVA (QUANTA Lite HMGCR ELISA (Ref. Número 704760, INOVA,

San Diego) llevado a cabo en el laboratorio de inmunología del Hospital Vall d'Hebron y de forma paralela en nuestro laboratorio (*in-house*) con antígeno comercial.

3.2.2.1 ELISA comercial.

Los anticuerpos HMCGR se midieron en las mismas muestras usando el kit QUANTA Lite HMGCR (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se consideró que el resultado era positivo cuando se detectaron valores iguales o superiores a 20 unidades.

3.2.2.2 Anti-HMGCR ELISA in-house.

En cada uno de los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA) se dispensaron 50 µL de una solución de tampón fosfato salino (PBS) que contenía 100 ng de HMGCR (Sigma, St. Lois, MO, USA) o disolvente solo, es decir, PBS (para determinar la unión inespecífica de cada muestra). La placa se envolvió en papel de aluminio y se mantuvo toda la noche en la nevera a 4ºC. Tras lavar dos veces con PBS/0,05% Tween 20 (solución de lavado), se añadieron 200 µL de solución de bloqueo [PBS/0,05% Tween 20/2% albúmina bovina sérica (Sigma)]. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se efectuaron 2 lavados con la solución de lavado. Los sueros (50 µl de una solución 1:400 en tampón de bloqueo) se añadieron por duplicado (así como en el pocillo que sólo contenía PBS) y se incubaron durante 1 hora a 37ºC. Después de efectuar 6 lavados, en cada pocillo se añadieron 50 µL de una solución 1:10.000 (en solución de bloqueo) de anticuerpo anti-IgG humana (específica de cadena-γ y desarrollada en cabra) marcada con peroxidasa de rábano picante (Sigma). La placa se incubó durante 30 min. a 37ºC, se lavó 6 veces y la reacción colorimétrica se obtuvo tras añadir 50 µL de 3,3′,5,5′-tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Finalmente, la placa se incubó durante 30 minutos a 37ºC,

se añadieron 50 µl de una solución 2N H_2SO_4 para parar la reacción, y se leyó la densidad óptica (D.O.) a 450 nm en un espectrofotómetro (Labsystems iEMS reader MF, Barcelona, Spain). La D.O. correspondiente a la unión inespecífica (pocillos sin el antígeno) se substrajo de la media obtenida para los dos pocillos con antígeno. Una muestra positiva de referencia (cedida amablemente por el Prof. Andrew L Mammen, Baltimore, Maryland, USA) fue incluida en cada placa. El punto de corte para positividad en ELISA se estableció en tres desviaciones estándar (0,074) sobre el valor medio obtenido (0,152) en una muestra de 50 sueros de controles sanos.

3.2.3 Análisis Estadístico

Se estimó la prevalencia de anticuerpos anti-HMGCR en los diferentes grupos estudiados, como el porcentaje de casos con resultados positivos sobre el total de casos, y se calculó el intervalo de confianza al 95%. Las variables dicotómicas se expresaron como porcentajes y frecuencias absolutas, y las variables cuantitativas se expresaron como medias y desviaciones estándares.

3.2.4 Resultados

Se analizaron un total de 333 sueros de pacientes. Doscientas cincuenta y seis muestras correspondían a pacientes diagnosticados de enfermedades autoinmunes sistémicas (Grupo 1), 15 de cada uno de los siguientes grupos: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren primario y esclerodermia. Se analizaron 130 sueros de pacientes con miopatía inflamatoria mediante el test de ELISA comercial y con nuestro test (*in-house*). En el

subgrupo de hepatopatías autoinmunes, se incluyeron para el análisis a 33 pacientes con colangitis biliar primaria y a 33 más con hepatitis autoinmune.

Lupus eritematoso sistémico: la media (DE) de edad fue de 52 (17) años. Dentro de este subgrupo, 3 (20%) de los 15 pacientes estaban bajo tratamiento con estatinas (simvastatina 2, atorvastatina 1). No se detectó positividad para anti-HMGCR en ninguna de las muestras séricas analizadas, independientemente del test de ELISA utilizado (comercial vs. *in-house*).

Artritis reumatoide: la media (DE) de edad fue de 57 (12,25) años, solo dos pacientes recibían tratamiento con simvastatina (13%), ninguna muestra dio positivo para anti-HMGCR, siendo la concordancia entre ambos tests de ELISA del cien por cien.

Esclerodermia: la media (DE) de edad fue de 53 (14,30) años, el consumo de estatinas estuvo presente en un 33% de los 15 pacientes analizados. La presencia de anti-HMGCR fue negativa tanto en el ELISA comercial como en el test desarrollado en nuestro laboratorio.

Síndrome de Sjögren primario: la media (DE) de edad fue de 57 (16) años, no se detecto la presencia de anti-HMGCR en ningún caso mediante ninguna de las dos técnicas de ELISA. La estatina más utilizada fue la simvastatina (20%) seguido de la fluvastatina (6%) del total de sueros analizados en este subgrupo.

Hepatopatía autoinmune: se analizaron 66 muestras de sueros de pacientes con afectación hepática de origen autoinmune, 21 de estos en tratamiento con estatinas por diversos motivos, 33 con hepatitis autoinmune y 33 más con colangitis biliar primaria (CBP). La media (DE) de edad de los pacientes de este grupo fue de 61 (14,39) años, la estatina mas utilizada fue la simvastatina, y 10 mg la dosis más habitual (12 % de 66 muestras), mientras que dos tercios de los pacientes (el 66 % aproximadamente) no recibieron estatinas en ningún momento.

En el caso del subgrupo de hepatitis autoinmune, se detectaron dos muestras positivas para anti-HMGCR con el test de ELISA *in-house* mostrando una prevalencia de 3,03% (IC 95% 0,08-15,76) en este subgrupo. El resto de muestras analizadas fueron negativas para la detección de anticuerpos anti-HMGCR tanto por ELISA comercial como por el método *in-house*.

Miopatía inflamatoria idiopática: Se estudiaron 130 muestras (96 mujeres) de sueros de pacientes diagnosticados de miopatía inflamatoria mediante los dos tests de ELISA (*in- house* y comercial). Se incluyeron en el estudio: (84) dermatomiositis, (31) polimiositis, (5) miositis por cuerpos de inclusión y (10) miopatías necrosantes inmunomediadas (6 expuestos a estatinas, dos casos con anti-SRP y una muestra de 1 paciente sin anticuerpos específicos. En el caso del test comercial (INOVA) se detectaron valores altos de anticuerpos anti-HMGCR en 8 sueros [6 MNIM, 1 PM, 1 DM]; mientras que con el ELISA *in-house* fueron 9 muestras positivas [6 MNIM, 1, 2 DM] siendo en una de ellas (DM) débilmente positiva. La prevalencia en este subgrupo con el test de ELISA comercial fue 6,15 % (IC 95% 2,69 - 11,77), valor similar al obtenido con el método *in-house* que fue 6,92 % (IC 95% 3,21 – 12,74), si bien en 7 casos se recogía el antecedente de consumo de estatinas.

La prevalencia total en el grupo 1 con el test *in-house* fue de 4,3% (IC 95% 2,47 - 7,53) mientras que para el test comercial resulto ser de 3,13% (IC 95% 1,59 – 6,04), la mayoría correspondían a pacientes con MNIM tratados con estatinas

De las 77 muestras de suero correspondientes a pacientes del grupo 2 que incluye los diagnósticos de dislipemia familiar grave (36 casos) y accidentes cerebro vasculares (41 sueros); una vez analizadas todas las muestras mediante los dos tests de ELISA, soló se detectó en 2 sueros positividad para los anticuerpos anti-HMGCR con el ELISA realizado en nuestro laboratorio, ambas en el grupo de accidente cerebro vasculares, lo que representa una prevalencia

del 4,87% (IC 95% 0,59 -16,53) en este subgrupo. En las demás muestras analizadas no hubo anticuerpos positivos para anti-HMGCR.

La prevalencia total para el grupo 2 (DLP y ACV) fue de 2,60% (IC 95% 0,32-9,07) con el test *in-house,* y del 0% con el test comercial. El fármaco más usado, en el subgrupo de dislipemia fue la atorvastatina (20 mg/d) lo que representa un tercio de los casos, seguida de rusovastatina (5 mg) en un 19%. En los pacientes con diagnóstico de enfermedad cerebrovascular la atorvastatina a dosis de 80 mg/d fue la más frecuente con un 46% siendo la rosuvastatina (10 mg) la estatina menos utilizada (3%).

3.2.5 Discusión

Los resultados obtenidos en ambos grupos de pacientes estudiados (Grupo 1: enfermedades autoinmunes sistémicas, Grupo 2: paciente con ictus o dislipemia) establecen una baja prevalencia de los anticuerpos anti-HMGCR en esta población. Es decir, parece que ni la presencia de una enfermedad autoimmune, incluso en los casos en los que coexiste con la administración de estatinas, ni las dosis elevadas del fármaco predisponen al desarrollo de esta situacion de autoinmunidad. El estudio de diferentes patologías autoinmunes y de grupos

distintos (ictus o dislipemia familiar) tratados con dosis altas de estatinas, asi como la coherencia de los resultados obtenidos en todas ellas, confiere solidez a esta afirmación.

Dos situaciones merecen un comentario especifico, las hepatitis autoinmunes y las miopatías inflamatorias. En el subgrupo de hepatitis autoinmune, los pacientes con positividad para los anticuerpos anti-HMGCR mediante el test ELISA *in-house* (2 casos) no tuvieron sintomatología alguna sugestiva de miopatía inflamatoria, por lo que se consideraron falsos positivos, similar en el caso de los dos pacientes pertenecientes al subgrupo de ECV con anti-HMGCR positivo.

Los resultados negativos en referencia a los anti-HMGCR del estudio en pacientes con hepatitis autoinmunes, no parece sustentar la hipótesis de la existencia de un mecanismo toxico-inmunológico similar al establecido en pacientes con MNIM por estatinas, si bien no podemos descartar que fuera la baja frecuencia de esta presentación la responsable de los resultados negativos. Quizás estudios en una población más amplia podrían aportar resultados favorables a esta hipótesis. Alternativamente la prevalencia es algo mayor en el grupo de pacientes con miopatía inflamatoria y muy especialmente en aquellos que recibieron estatinas. Ello sin duda se debe a la inclusión de pacientes en un contexto clínico muy especifico como son los pacientes con MNIM en relación al fármaco.

En definitiva la prevalencia de anticuerpos anti-HMGCR en el Grupo 1 de enfermedades autoinmunes fue similar a la obtenida en la comunidad (Estudio 1). La hipótesis de que en algunos de los pacientes con hepatitis autoinmune, ésta se debiera a la toxicidad directa por estatinas con fenómenos inmunomediados añadidos no se pudo confirmar. Por otra parte el análisis de la cohorte de pacientes con MII de nuestro centro demostró que algunos pacientes era positivos para los anti-HMGCR, si bien en su mayoría fueron compatibles con la entidad de MNIM, dos muestras con diagnóstico previo de DM y PM (en este caso no se tuvo constancia de

uso de estatinas) también mostraron la presencia de este anticuerpo (anti-HMGCR), sugiriendo que el espectro clínico no sería exclusivamente la MNIM o su asociación directa con el uso de estatinas. Sobre la MNIM asociada a estatinas con anticuerpos anti-HMGCR positivos, clasificable en el grupo de miopatía inflamatoria, se hablara con más detalle en el cuarto estudio de esta tesis doctoral.

Otro aspecto relevante que se desprende de este segundo estudio y que va en la línea de los resultados obtenidos en el primer estudio, es la ligera tendencia a presentar resultados débilmente positivos por técnica de ELISA *in-house*, y no por la técnica ELISA comercial. Este será el objeto del siguiente trabajo, que compara la rentabilidad de ambos métodos.

Tercer Estudio

Estudio comparativo entre las diferentes técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-HMGCR. Técnica ELISA (*in-house*) versus ELISA comercial

3.3.1 Introducción

La miopatía necrosante inmunomediada es un trastorno poco frecuente que clínicamente se engloba junto a otras miopatías como la PM y la DM en el grupo de miopatías inflamatorias autoinmunes. Entre sus posibles causas se ha asociado al tratamiento con estatinas, conocida como una variante denominada miopatía necrosante inmunomediada asociada a anticuerpos anti-HMGCR.

Su diagnóstico requiere la presencia de debilidad proximal de cinturas, hallazgos histológicos característicos en la biopsia muscular, y la detección de anticuerpos contra la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, enzima específicamente inhibida por las estatinas.

El objetivo de este tercer estudio es comparar la rentabilidad de dos tests de ELISA (comercial vs *in-house*) en la determinación de los anticuerpos anti-HMGCR, fundamentales para el diagnóstico de esa entidad.

3.3.2 Pacientes y Métodos

Se estudiaron un total de 430 pacientes en los que se determinó la presencia de anticuerpos anti-HMGCR. Los pacientes fueron clasificados en diferentes grupos de la siguiente manera:

- 130 pacientes con diagnóstico de miopatías inflamatorias, que incluyeron PM, DM, pacientes con MNIM asociada estatinas y 60 sueros de pacientes con otras enfermedades sistémicas autoinmunes: LES, AR, ES, SS (15 muestras de suero por cada subgrupo) atendidos regularmente en el área de Enfermedades Sistémicas del Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH).

- 133 pacientes en tratamiento con estatinas por diferentes motivos especialmente dislipemias: 97 procedentes de una cohorte histórica de atención primaria del área del Carmel en la ciudad de Barcelona y 36 sueros de pacientes de la Unidad de lípidos del Hospital Vall d'Hebron.

- 41 pacientes que tras padecer un accidente cerebro vascular recibieron tratamiento con estatinas como prevención secundaria pertenecientes al servicio de Neurología del Hospital General Vall d' Hebron de la ciudad de Barcelona.

- 66 pacientes con enfermedad hepática de origen inmunológico, 21 de los cuales fueron tratados con estatinas de una cohorte de la Unidad de Hepatología del Hospital Vall d' Hebron.

3.3.3 Material y método

Todas las muestras se analizaron mediante dos tests de ELISA diferentes; uno realizado en el Laboratorio de investigación (VHIR) sección enfermedades autoinmunes (*in-house*) y otro comercial de la casa INOVA (QUANTA Lite HMGCR ELISA (Ref. Número 704760, INOVA, San Diego) llevado a cabo en el laboratorio de inmunología, ambos del Hospital Vall d'Hebron.

3.3.3.1 ELISA comercial

Los anticuerpos HMCGR se determinaron mediante el kit QUANTA Lite HMGCR (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Valores iguales o superiores a 20 UI se consideraron positivos según referencia del fabricante.

3.3.3.2 Anti-HMGCR in-house ELISA

En cada uno de los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA) se dispensaron 50 µL de una solución de tampón fosfato salino (PBS) que contenía 100 ng de HMGCR (Sigma, St. Lois, MO, USA) o disolvente solo, es decir, PBS (para determinar la unión inespecífica de cada muestra). La placa se envolvió en papel de aluminio y se mantuvo toda la noche en la nevera a 4ºC. Tras lavar dos veces con PBS/0,05% Tween 20 (solución de lavado), se añadieron 200 µL de solución de bloqueo [PBS/0,05% Tween 20/2% albúmina bovina sérica (Sigma)]. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se efectuaron 2 lavados con la solución de lavado. Los sueros (50 µl de una

solución 1:400 en tampón de bloqueo) se añadieron por duplicado (así como en el pocillo que sólo contenía PBS) y se incubaron durante 1 hora a 37ºC. Después de efectuar 6 lavados, en cada pocillo se añadieron 50 µL de una solución 1:10.000 (en solución de bloqueo) de anticuerpo anti-IgG humana (específica de cadena-γ y desarrollada en cabra) marcada con peroxidasa de rábano picante (Sigma). La placa se incubó durante 30 min. a 37ºC, se lavó 6 veces y la reacción colorimétrica se obtuvo tras añadir 50 µL de 3,3′,5,5′-tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Finalmente, la placa se incubó durante 30 minutos a 37ºC, se añadieron 50 µl de una solución 2N H_2SO_4 para parar la reacción, y se leyó la densidad óptica (D.O.) a 450 nm en un espectrofotómetro (Labsystems iEMS reader MF, Barcelona, Spain). La D.O. correspondiente a la unión inespecífica (pocillos sin el antígeno) se substrajo de la media obtenida para los dos pocillos con antígeno. Una muestra positiva de referencia (cedida amablemente por el Prof. Andrew L Mammen, Baltimore, Maryland, USA) fue incluida en cada placa. El punto de corte para positividad en ELISA se estableció en tres desviaciones estándar (0,074) sobre el valor medio obtenido (0,152) en una muestra de 50 sueros de controles sanos.

3.3.4 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de la concordancia entre ambos métodos se utilizó el test de correlación de rangos de Spearman (Rho, ρ) para la densidad óptica, y el coeficiente kappa (κ) de Cohen para las variables cualitativa de interpretación (positivo/negativo).

3.3.5 Resultados

El analisis de los datos obtenidos reveló que 13 de 430 pacientes (3,02% [IC95% 1,62-5,11]) fueron positivos para anticuerpos anti-HMGCR usando el test de ELISA desarrollado en el laboratorio de enfermedades autoinmunes sistémicas (*in-house*), mientras el número de resultados positivos que se obtuvo mediante el test de ELISA comercial fue de 8 (1,86%, [IC95%

0,81-3,63]). Todos los pacientes con al menos un resultado positivo en cualquiera de los dos ensayos son enumerados en la tabla 7.

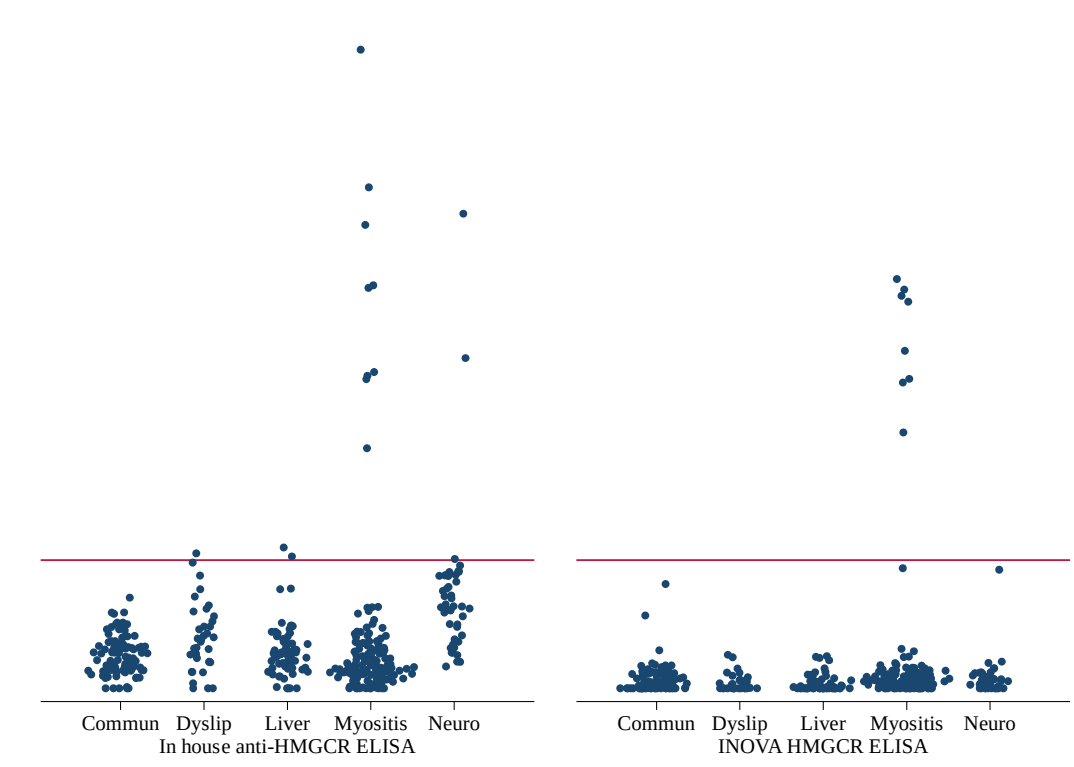
Tabla 7. Caracterización de los pacientes con resultados positivos para la detección de anti-HMGCR en los tests de ELISA.

Paciente*	Sexo	Edad	Estatinas	CK UI/L	ELISA In-House	ELISA Comercial	Necrosis	Diagnóstico
77	M	63	Si	11300	+	+	+	PM
92	M	62	Si	3020	+	+	+	MNIM
93	H	57	Si	5006	+	+	+	MNIM
123	H	82	Si	8793	+	+	+	MNIM
130	H	70	Si	4200	+	+	+	MNIM
131	H	75	Si	1680	+	+	+	MNIM
133	H	76	Si	18417	+	+	+	DM
134	H	69	Si	4531	+	+	+	MNIM
137	M	65	Si	112	+	-	-	DM/PARANEOPLÁSICO
43	M	73	Si	83	+	-	No Bx	HEPATOPATÍA AUTOINMU
62	H	79	No	98	+	-	No Bx	HEPATOPATÍA AUTOINMU
16	H	64	Si	32	+	-	No Bx	ACV
1	H	87	Si	95	+	-	No Bx	ACV

*Numero correspondiente al suero del paciente. MNIM: Miopatía necrotizante inmunomediada asociada a estatinas. DM: Dermatomiositis. ACV: Accidente cerebrovascular. M: Mujer H: Hombre .

Para la comparación de ambos tests de ELISA se utilizó la prueba (Rho, ρ) de Spearman basándose en las densidades opticas (D.O.) de los resultados de cada test, que mostró una correlación lineal significativa [R_s] entre los métodos de 0,14 (p = 0,004). La concordancia global entre los dos métodos de ELISA se calculó utilizando el coeficiente kappa de Cohen con una concordancia global de 98,7 [(κ = 0,76) IC 95% 0,55 - 0,96)] para toda la cohorte estudiada y de 99,3 [κ = 0,94] (IC 95% 0,81 - 1,00) para el subconjunto de pacientes con miositis, Figura 2.

Figura 2



Gráficos de puntos que muestran los resultados, expresados como densidad óptica (DO), para ambos kits de ELISA. Commun: sujetos de la comunidad en tratamiento con estatinas; Dyslip: pacientes con dislipemia familiar grave; Liver: pacientes con hepatitis autoinmune; Myositis: pacientes con miopatía inflamatoria idiopática; Neuro: sujetos con ictus en tratamiento con estatinas en prevención secundaria.

3.3.6 Discusión

Los sueros analizados con el test ELISA comercial y el test *in-house* que resultaron positivos, mediante ambos tests, para los anticuerpos anti-HMGCR correspondieron a pacientes con diagnóstico de MII, así que dada la congruencia entre la entidad clínica y el test de laboratorio, se considero como resultados validos para el diagnóstico MINM asociada a estatinas.

En cuanto a los pacientes que presentaron discrepancias entre ambos ensayos ELISA, los pacientes 43 y 62 con enfermedad hepática de origen autoinmune no tenían síntomas sugestivos de miositis y no estuvieron tratados con estatinas. Mientras que los pacientes tratados con estatinas después de un ictus (1 y 16) no tenían síntomas de miopatía inflamatoria inmunomediada. Estos resultados, por tanto se interpretaron como falsos positivos al utilizar la técnica *"in-house"*

No se pudo demostrar una correlación exacta entre los ensayos, aunque si una concordancia excelente entre ambos tests, específicamente en los que hace referencia al grupo de MII. Así, en el test desarrollado en nuestro laboratorio detectamos algunos sueros positivos que en el test comercial fueron negativos. Ello podría deberse fundamentalmente a la distinta naturaleza del antígeno utilizado (HMGCR) en cada uno de ellos. La proteína utilizada en el test de ELISA *in-house* fue una HMGCR recombinante fusionada con Glutatión S-Transferasa (GST) y expresada en *Escherichia coli* (*E.coli*) (Sigma, St. Lois, MO, USA). Por el contrario, el anti-HMGCR del test comercial estaba fusionada con polihistidinas y su expresión se produjo en baculovirus infectando células de insecto Sf9. Consecuentemente, cabe la posibilidad de que la reacción observada en nuestro método se debiera en realidad al reconocimiento de GST y no de HMGCR. Por otro lado, es bien sabido que los sueros humanos pueden presentar

una reactividad más o menos intensa frente a determinadas proteínas de *E. coli*. Así pues, la positividad observada en nuestro ELISA podría también ser debida a esa reactividad con otra/s proteína/s mezclada/s con la HMGCR supuestamente "purificada". Por último, también deberíamos tener en cuenta que el plegamiento o estructura terciaria de ambas proteínas recombinantes podría ser distinto; ello quizás permitiría que determinados epítopos quedaran más expuestos en la proteína utilizada en nuestro ELISA, lo cual tal vez posibilitaría su reconocimiento por algunos de los sueros examinados.

A pesar de lo expuesto anteriormente, el coeficiente Kappa de Cohen mostró un alto índice de concordancia global (k=0,76) entre los dos ensayos ELISA, lo que hace que nuestro método ELISA sea lo suficientemente válido para el análisis de anti-HMGCR en pacientes con sospecha de miositis asociada a estatinas, para posterior confirmación con otras técnicas de laboratorio como la inmunoprecipitación (IP) (prueba de referencia) o el Inmunoblot.

Cuarto Estudio

Descripción de la cohorte de pacientes con miopatía necrosante inmunomediada y anticuerpos anti-HMGCR atendidos en Hospital Vall d'Hebron y en otros centros colaboradores; descripción de un nuevo patrón mediante la técnica IFI en triple tejido de rata y confirmación por blot

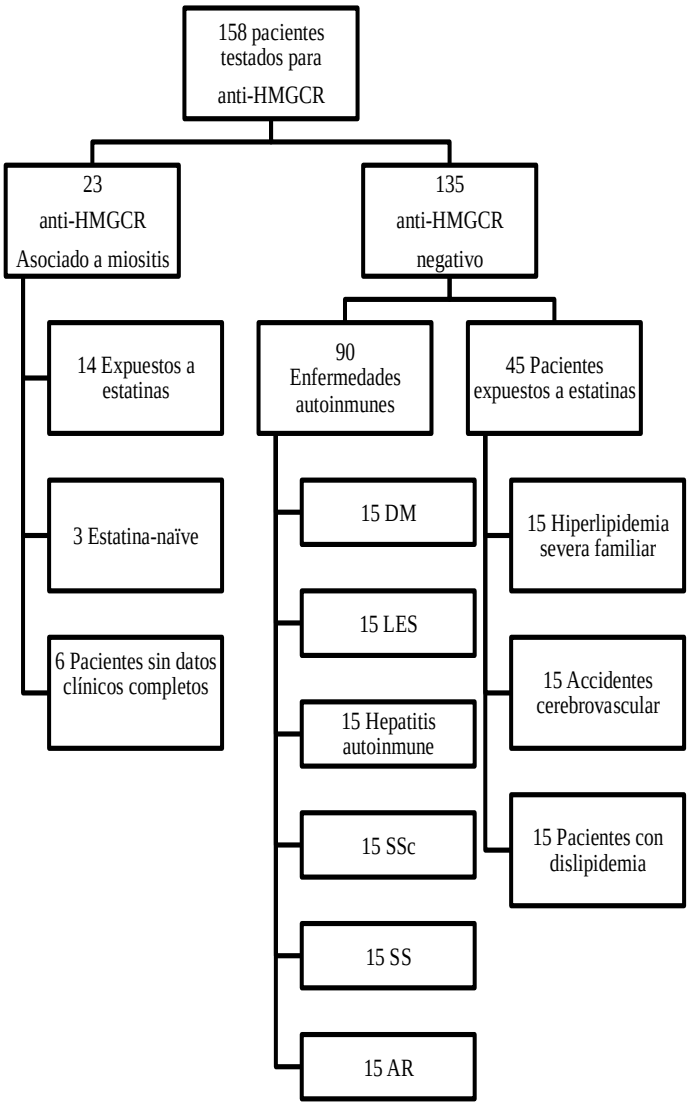
3.4.1 Pacientes

El estudio incluyó a 23 sujetos con anticuerpos anti-HMGCR positivos, 14 de ellos diagnosticados de miopatía autoinmune asociada a estatinas (1 PM, 1 DM, 12 MINM), 3 diagnosticados de miopatía autoinmune (1 PM, 2 MINM) sin exposición conocida a estatinas y 6 pacientes cuyos sueros fueron referidos desde el laboratorio de Inmunología del Hospital Valle d'Hebron y otros centros colaboradores, y de los que se carecía de información clínica fiable. Asimismo, un total de 90 pacientes diagnosticados de otras enfermedades autoinmunes (LES, HAI, ES, SS, AR y DM) y 45 pacientes tratados con estatinas sin enfermedad autoinmune asociada fueron incluidos en el estudio como controles (Figura 3).

Todos los pacientes diagnosticados de enfermedades autoinmunes sistémicas seguían control en nuestro centro (Hospital General Vall d'Hebron) entre 1983 y 2016. Todos los pacientes y los controles incluidos en el estudio dieron consentimiento informado para el uso de los sueros para fines de investigación.

Las miopatías inmunomediadas asociadas a estatinas incluyeron a pacientes con exposición a estatinas, anticuerpos positivos anti-HMGCR y biopsia muscular compatible con una de las siguientes entidades: MNIM, PM, DM. El diagnóstico para MNIM, se basó en los criterios diagnósticos y de clasificación propuestos por el grupo de estudio de miositis del Centro Neuromuscular Europeo (MSG/ENMC, del inglés *Muscle Study Group/European Neuro Muscular Center*) [(44)].

Figura 3. Diagrama de flujo de pacientes.



DM: dermatomiositis; PM: polimiositis; LES: lupus eritematoso sistémico; SSc:esclerosis sistémica; SS: síndrome Sjögren: AR: Artritis reumatoide

El diagnóstico de DM y PM, se basó en los criterios de Bohan y Peter y sólo se incluyeron pacientes con enfermedad definida o probable en este estudio [61,62].

La información clínica se obtuvo mediante un cuestionario estandarizado, examen físico completo y una revisión sistemática del historial clínico. También se registraron datos demográficos, signos y síntomas de la enfermedad, curso clínico, número y tipo de tratamientos.

La respuesta al tratamiento se definió como completa si el paciente presentaba una total recuperación clínica (incluyendo normalización de los valores de CK), y sin respuesta en los casos que no había evidencia de mejoría clínica y valores de CK persistentemente elevados. Los casos intermedios entre ambas situaciones se consideraron como respuesta parcial. Se obtuvo consentimiento escrito de los sujetos de acuerdo a la declaración de Helsinki.

3.4.2 Material y Métodos

3.4.2.1 Detección del anticuerpo anti-HMGCR

Los anticuerpos anti-HMGCR, se detectaron mediante dos pruebas de ELISA (una realizada en el laboratorio de enfermedades autoinmunes del Hospital Valle d'Hebron -*in house*-, y otra comercial). Los resultados se confirmaron posteriormente por immunoblot.

3.4.2.2 ELISA comercial

Los anticuerpos anti-HMGCR se determinaron a partir del kit QUANTA Lite HMGCR (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante. Un resultado mayor de 20 unidades se consideró positivo.

3.4.2.3 Anti-HMGCR in-house ELISA

En cada uno de los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA) se dispensaron 50 µL de una solución de tampón fosfato salino (PBS) que contenía 100 ng de HMGCR (Sigma, St. Lois, MO, USA) o disolvente solo, es decir, PBS (para determinar la unión inespecífica de cada muestra). La placa se envolvió en papel de aluminio y se mantuvo toda la noche en la nevera a 4ºC. Tras lavar dos veces con PBS/0,05% Tween 20 (solución de lavado), se añadieron 200 µL de solución de bloqueo [PBS/0,05% Tween 20/2% albúmina bovina sérica (Sigma)]. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se efectuaron 2 lavados con la solución de lavado. Los sueros (50 µl de una solución 1:400 en tampón de bloqueo) se añadieron por duplicado (así como en el pocillo que sólo contenía PBS) y se incubaron durante 1 hora a 37ºC. Después de efectuar 6 lavados, en cada pocillo se añadieron 50 µL de una solución 1:10.000 (en solución de bloqueo) de anticuerpo anti-IgG humana (específica de cadena-γ y desarrollada en cabra) marcada con peroxidasa de rábano picante (Sigma). La placa se incubó durante 30 min. a 37ºC, se lavó 6 veces y la reacción colorimétrica se obtuvo tras añadir 50 µL de 3,3′,5,5′-tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Finalmente, la placa se incubó durante 30 minutos a 37ºC, se añadieron 50 µl de una solución 2N H_2SO_4 para parar la reacción, y se leyó la densidad óptica (D.O.) a 450 nm en un espectrofotómetro (Labsystems iEMS reader MF, Barcelona, Spain). La D.O. correspondiente a la unión inespecífica (pocillos sin el antígeno) se substrajo de la media obtenida para los dos pocillos con antígeno. Una muestra positiva de referencia (cedida amablemente por el Prof. Andrew L Mammen, Baltimore, Maryland, USA) fue incluida en cada placa. El punto de corte para positividad en ELISA se estableció en tres desviaciones estándar (0,074) sobre el valor medio obtenido (0,152) en una muestra de 50 sueros de controles sanos.

3.4.2.4 Confirmación de resultados por immunoblot

A cada pocillo se le aplicaron 5 μg de la misma proteína HMGCR utilizada en los tests de ELISA. Esta proteína recombinante (expresada en *E. coli*) contiene el dominio catalítico de HMGCR y está fusionada a glutatión S-transferasa (GST). Se utilizaron minigeles de poliacrilamida (PAGE)-SDS del 4% al 12% con tampón ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS). La técnica de western se realizó en membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema de electroforesis Invitrogen NuPAGE (Carlsbad, CA). La nitrocelulosa se cortó en varias tiras (correspondientes a cada pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS que contenía un 3% de leche desnatada en polvo (tampón de bloqueo). Cada tira se incubó luego con la muestra de suero humano correspondiente diluida a 1:100 en la solución usada como tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados de 10 min. cada uno con PBS/0,05% Tween 20, se añadió anticuerpo anti-IgG humana de cabra marcado con fosfatasa alcalina (Invitrogen, Frederick, MD) a cada tira incubándose durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción colorimétrica se efectuó con reactivo de fosfatasa (BCIP/NBT, Promega, Madison, WI). En función de la intensidad de la señal, los resultados se clasificaron en negativos o positivos.

3.4.2.5 Inmunofluorescencia indirecta (IFL) en triple tejido de rata (riñón, estómago, hígado) y sobre células humanas HEp-2

Para la IFI en tejido o células, utilizamos portaobjetos multicapa comerciales ya preparados que contenían secciones de triple tejido de rata (hígado, riñón y estómago) y portaobjetos con células humanas fijadas de HEp-2, (Nova Lite, Inova Diagnostics). Utilizamos también sustratos de otros proveedores (Euroimmune, BioSystems y Aesku.Group) para descartar que las reacciones se debieran a artefactos generados

durante la preparación de los sustratos. Para llevar a cabo la reacción, utilizamos inmunoglobulinas anti-IgG humanas de cabra (INOVA) marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los portaobjetos se tiñeron usando un procesador automático (QUANTA-Lyser® INOVA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los sueros de pacientes y controles se diluyeron en PBS a 1/40 para la tinción de triple tejido de rata y a 1/80 para la tinción de células humanas HEp-2. Los diferentes portaobjetos se incubaron con 40 µl de suero diluido durante 30 min. a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS, se añadieron 40 µl del suero conjugado con FITC, se incubaron durante otros 30 min. y después de varios lavados, se montaron los portaobjetos en glicerol con tampón "anti-fade" y se examinaron al microscopio (Eclipse 50i, Nikon) utilizando luz ultravioleta.

Todos los sueros (tanto positivos como negativos para autoanticuerpos anti-HMGCR) se probaron a ciegas utilizando esta técnica en dos laboratorios diferentes, el Departamento de Inmunología de Vall d'Hebron y el Departamento de Inmunología del Hospital de Sant Pau.

3.4.2.6 Experimento de Inmunoabsorción

Se realizaron experimentos de inmunoabsorción en 5 pacientes que presentaron un patrón de IFI positivo sobre triple tejido de rata. La absorción se efectuó mediante el uso de antígeno humano HMGCR (Sigma) con un 10% de suero bovino fetal a las siguientes concentraciones crecientes de antígeno (0,33, 0,84, 1,64, 3,37, 6,74 y 10,37 µg/ml). Utilizamos como controles un suero humano sano anti-HMGCR negativo, y dos sueros positivos para anticuerpos anti-mitocondriales y anticuerpos contra células parietales gástricas, respectivamente.

3.4.3 Análisis estadístico

Las variables dicotómicas se expresaron como porcentajes y frecuencias absolutas, y las características cuantitativas como medias y desviaciones estándar (DE). El valor sérico de creatina quinasa (CK), una variable muy positivamente sesgada, se expresó como mediana, primer y tercer cuartil (Q1-Q3).

El estadístico Kappa se usó para evaluar la concordancia entre los dos métodos de ELISA utilizados para detectar anticuerpos anti-HMGCR (comercial e *in-house*) y también entre el patrón de IFL en triple tejido y los anticuerpos anti-HMGCR medidos por ELISA. Los análisis se realizaron con Stata, versión 14.0 (StataCorp).

3.4.4 Resultados

3.4.4.1 Características clínicas de los pacientes con miopatía asociada a anti-HMGCR

Los datos clínicos detallados y el seguimiento estuvieron disponibles en 17 pacientes con miopatía autoinmune asociada a anti-HMGCR. De estos 17 pacientes (41% mujeres), 14 estuvieron expuestos a estatinas al inicio de la enfermedad (82%) y un 88% (n = 15) mostraron una miositis necrotizante mediada por el sistema inmune en la biopsia muscular (los otros dos pacientes mostraron características compatibles con PM y DM). La edad media (DE) fue de 63 años (18 años) y la CK mediana fue de 6.941 UI/L (Q1-Q3 6.428-9.596 UI/L). Los datos de pacientes expuestos a estatinas cuyas características clínicas estaban disponibles se recogen en la tabla 8. La concordancia entre nuestro ELISA interno y ELISA comercial (ensayos QUANTA Lite, INOVA Diagnostics) fue muy buena (concordancia general del 97%, Kappa 0.9)

Table 8. Características clínicas de 14 pacientes con miopatía asociada a estatinas y anticuerpos anti-HMGCR

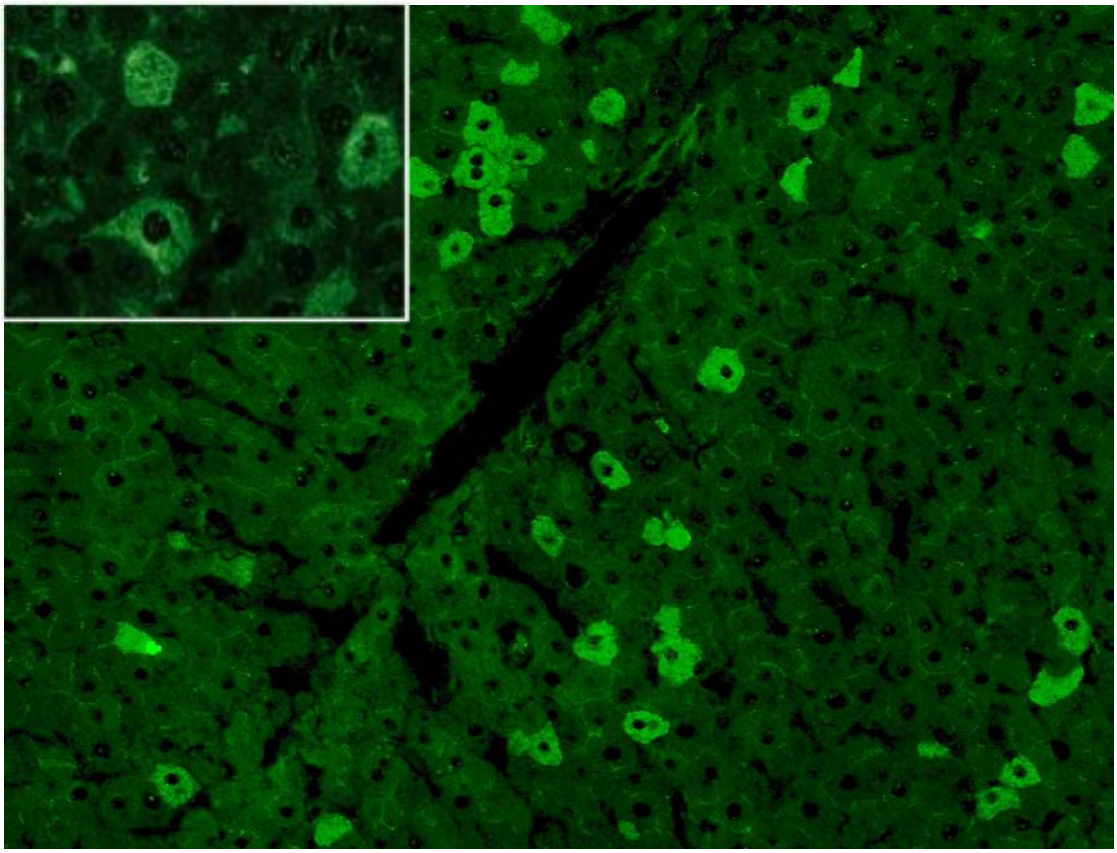
Caso	Edad al inicio en años/sexo	Estatina	Anti-HMGCR (iH / Comm)	CK (IU/L)	Biopsia Muscular	Debilidad proximal	Mialgias	DR11	HALIP	Tratamiento	Respuesta
1	76/H	Atorvastatina (80 mg/d)	906 / >200U	18.417	DM	(+++)	(++)	(+)	(+)	AZA IVIG	Completa
2	57/M	Atorvastatina (80 mg/d)	918 / 60U	2.270	MNIM	(+++)	(++)	N/D	(+)	MM IVIG	Completa
3	57/M	Atorvastatina (10 mg/d)	1.503 / >200U	3.303	MNIM	(+++)	(+)	N/D	(+)	AZA IVIG	Completa
4	52/H	Atorvastatina (20 mg/d)	1.312 / >200U	7.778	MNIM	(+)	(+++)	(-)	(+)	IVIG	Completa
5	78/M	Atorvastatina (80 mg/d)	997 / >200U	8.560	MNIM	(+++)	(+)	(+)	(+)	AZA IVIG	Completa
6†	82/H	Atorvastatina (40 mg/d)	896 / 126U	8.793	MNIM	(+++)	(-)	(+)	(+)	AZA IVIG	Parcial
7	73/M	Atorvastatina (80 mg/d)	700 / 91U	3.304	MNIM	(++)	(-)	(+)	(+)	N/D	Completa
8	67/H	Atorvastatina (20 mg/d)	844 / 4U	10.400	MNIM	(+++)	(-)	(+)	(+)	AZA MTX	Parcial
9	68/M	Atorvastatina (20 mg/d)	1.150 / 9U	7.200	MNIM	(+++)	(-)	N/D	(+)	AZA MTX	Completa
10	63/M	Simvastatina (20 mg/d)	884 / 5U	11.330	PM	(+++)	(-)	N/D	(+)	AZA MTX IVIG	Completa
11	70/H	Atorvastatina (10 mg/d)	906 / 90U	4.260	MNIM	(+++)	(-)	N/D	(+)	MTX	Completa
12	69/H	Simvastatina (20 mg/d)	1.184 / >200U	4.531	MNIM	(+++)	(++)	N/D	(+)	MTX	Completa
13&	55/H	Simvastatina (20 mg/d)	888 / 55U	5.187	MNIM	(++)	(-)	N/D	(+)	N/D	Completa
14	76/M	Simvastatina (40 mg/d)	1.217 / 47U	12.090	MNIM	(+++)	(+)	N/D	(+)	AZA IVIG	Completa

† fallecido no relacionado con MNIM (insuficiencia cardíaca); AZA: azatioprina; CK: creatina quinasa, expresada como IU / litro Valor normal <195); Comm: ELISA comercial; DM: dermatomiositis; M: mujer; H: hombre; HALIP: patrón de inmunofluorescencia en triple tejido asociado a anticuerpos HMGCR; MNIM: miopatía necrosante inmunomediada; IVIG: inmunoglobulina intravenosa; MM: Mofetil Micofenolato; MTX: metotrexato; N / D: no hecho; todos los pacientes incluidos, excepto el número 8, también fueron tratados con glucocorticoides (prednisona 1 mg / kg / d) disminuyendo la dosis 5 mg / por semana hasta la retirada. & El cambio de simvastatina a rosuvastatina, se acompañó de una recidiva de la sintomatología. El valor de corte para considerar un resultado positivo en el test de ELISA *in-house* (iH) para anticuerpos anti-HMGCR fue de 0.374 unidades (densidad óptica: DO 450 nm; 3 DE por encima de la media de 50 sujetos sanos no expuesto a estatinas); una muestra se consideró positiva cuando alcanzó más de 20 unidades en el ELISA comercial siguiendo las indicaciones del fabricante

3.4.4.2 IFL sobre triple tejido de rata (riñón/estómago/hígado) y en células humanas HEp-2

Los sueros positivos para anti-HMGCR mostraron una tinción sobre hepatocitos dispersos con una distribución centrolobulillar. La tinción se limitó al citoplasma y separó claramente a los núcleos en la célula (Figura 4). No más del 10% de los hepatocitos se tiñeron en un lóbulo hepático (zona 3 del lóbulo alrededor/cerca de las venas hepáticas centrolobulillares). El conducto biliar, el endotelio y las células en los sinusoides no se tiñeron. Este patrón fue claramente diferente de los patrones producidos por anticuerpos anti-mitocondriales, anti-LKM (del inglés, *Liver, Kidney, Microsomal*) o LC1 detectados mediante esta esta técnica. Los tejidos de rata correspondientes a estómago y riñón no mostraron ningún patrón característico. La mayoría (21 de 23 [91%]) de los sueros de pacientes con miositis asociada a anti-HMGCR fueron positivos para este patrón de IFL y, por lo tanto, se decidio denominarlo patrón de IFL de hígado asociado a anticuerpo anti-HMGR (HALIP, del inglés ***H****MGCR antibody* ***A****ssociated* ***L****iver* ***I****FL* ***P****attern).*

Figura 4

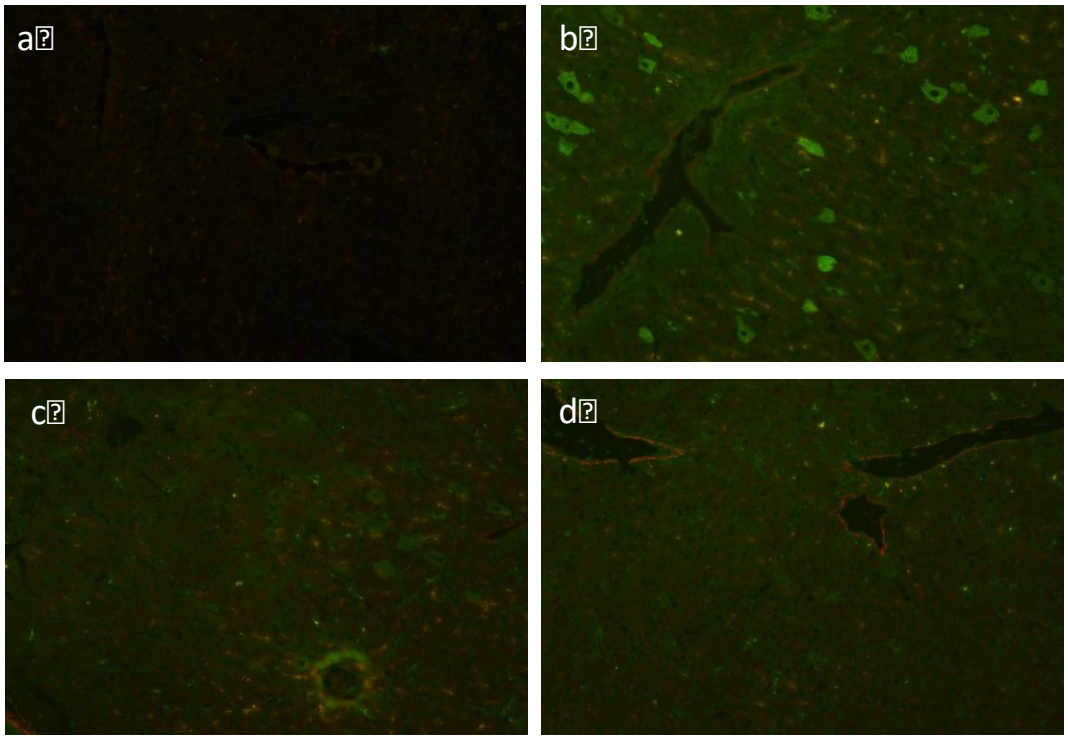


Patrón HALIP. Inmunofluorescencia indirecta en la sección de criostato de hígado de rata. El suero de los pacientes fue teñido por antisueros FITC anti-IgG (para detalles ver métodos). La imagen se obtuvo con un microscopio confocal espectral FV1000 (Olympus). Observese la clara tinción citoplásmica en los distintos hepatocitos diseminados, con un patrón granular en el recuadro (la imagen principal aumentada x200 y x1000 en el recuadro).

Los sueros testados de los 90 pacientes del grupo de enfermedades sistémicas autoinmunes y de los 45 de los pacientes no autoinmunes tratados con estatinas no produjeron este patrón IFL característico. La concordancia general entre los resultados de HALIP y ELISA confirmado por western blot fue del 99% (Kappa 0,95). El patrón HALIP fue detectado por personal experimentado e independiente en dos laboratorios de inmunología (Hospital Vall d'Hebron y Hospital Sant Pau) que mostró una concordancia perfecta (kappa 1), (21 de 23 pacientes con miopatía asociada a HMGCR con HALIP positivo).

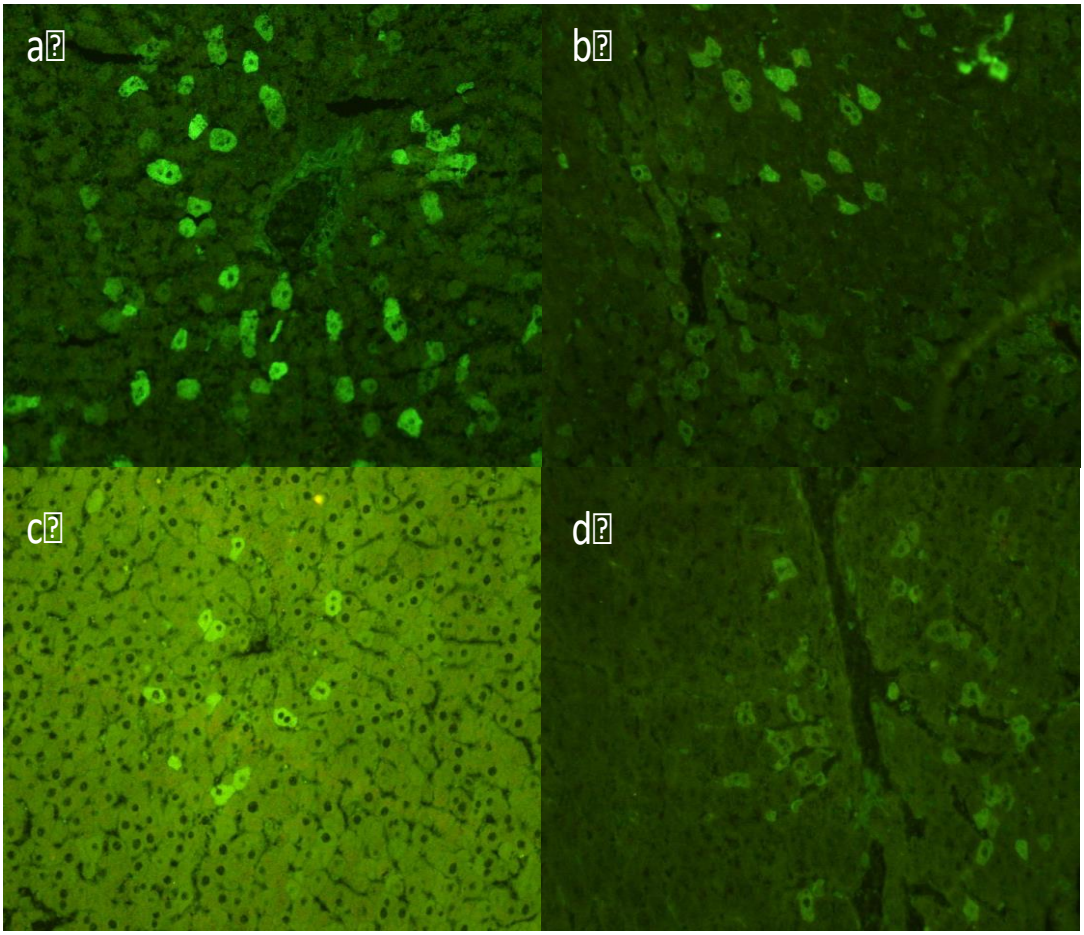
El estudio de inmunoabsorción mostró que el HALIP se eliminó específicamente mediante la incubación con el antígeno purificado humano, lo que confirma la reactividad de los autoanticuerpos contra el antígeno anti-HMGCR (ver Figura 5). Este patrón de IFL altamente específico se observó independientemente de la marca comercial utilizada de los portaobjetos (ver Figura 6).

Figura 5



Experimento de Inmunoabsorción: a) IFI de un suero control anti-HMGCR negativo. b) IFI patrón producido por suero anti-HMGCR positivo del paciente A. c) Suero del paciente A tras inmunoabsorción con antígeno humano HMGCR con concentración de 1,68 mg/m. d) Suero del paciente A tras inmunoabsorción con antígeno humano HMGCR con una concentración de 6,74mg/ml. (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego Lite @ Rat Kidney/stomach/Liver slides).

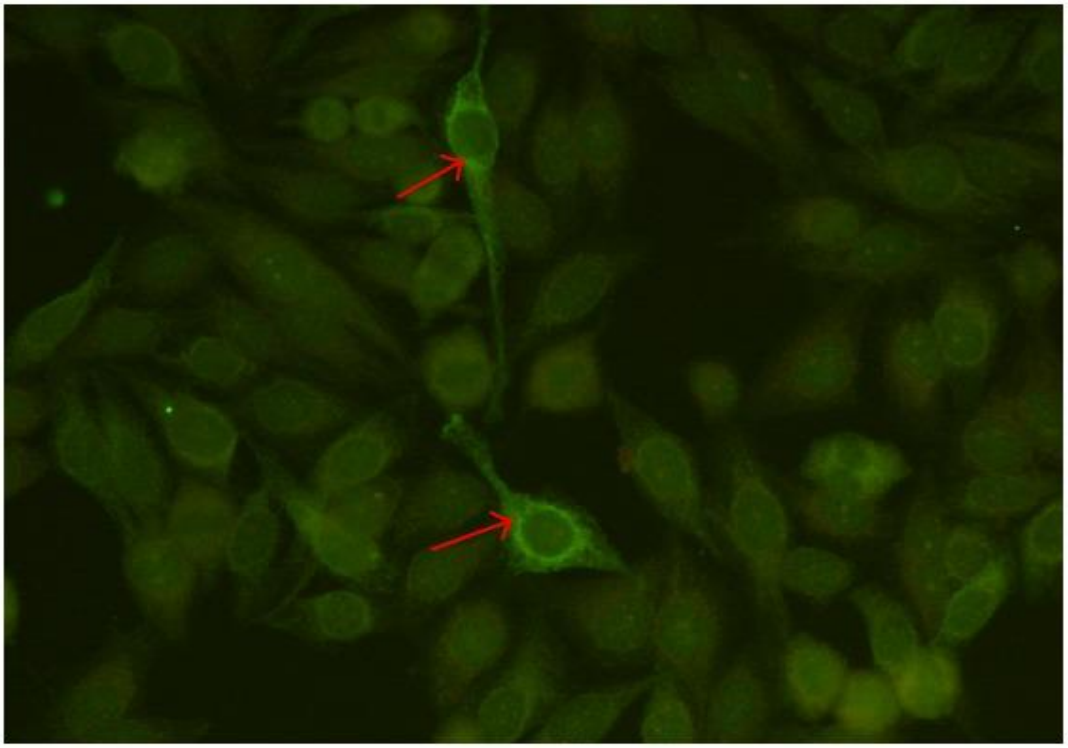
Figura 6



Patrón anti-HMGCR IFI producido en hígado de rata por un suero anti-HMGCR positivo, usando portaobjetos con sustrato de diferentes proveedores comerciales. a) Inova Slides. b) Euroinmune. c) BioSystems. d) Aeskulides Diagnostics.

Por el contrario, en las células humanas HEp-2 se observó un patrón de fluorescencia citoplásmica granular en sólo 6 de 23 (35%) pacientes, ya descrito previamente (figura 7) [212], lo que arroja una reproducibilidad bastante pobre en comparación tanto con ELISA confirmado por western blot como por IFL de rata (ambas con una concordancias menor del 35% con el patrón de IFL HEp-2).

Figura 7



Tomado de Musset L., et al., Se utilizó una muestra de suero de un paciente con anticuerpos anti-HMGCR sobre las células HEp-2. En estas células, el patrón de fluorescencia sugestivo para anti-HMGCR es una tinción citoplásmica granular fina con refuerzo perinuclear. [212]

3.4.5 Discusión

Los autoanticuerpos contra HMGCR permiten identificar un tipo específico de miositis, la miopatía conocida como miositis asociada a anti-HMGCR. En este estudio, describimos por primera vez un patrón de IFL característico y específico como marcador de esta entidad, el patrón HALIP. Este patrón se detecta y reconoce fácilmente mediante la prueba de IFL de triple tejido de rata estándar y es una prueba poco costosa y al alcance de la mayoría de laboratorios. Asimismo, la ausencia de dicho patrón en pacientes con otras enfermedades autoinmunes o en sujetos control expuestos a estatinas indica que los resultados de HALIP identifican a pacientes con miositis asociada a anti-HMGCR de una manera especifica y reproducible comparable a los autoanticuerpos anti-HMGCR

medidos por ELISA y confirmados por Western blot. El estudio de inmunoabsorción confirma que HALIP reconoce HMGCR en el tejido de rata.

Teniendo en cuenta el elevado porcentaje de pacientes que reciben estatinas, la miositis asociada a anti-HMGCR es una afección clínica rara. Su detección es importante porque la terapia inmunodepresora administrada precozmente y/o la administración de inmunoglobulinas intravenosa pueden ser eficaces para inducir una remisión duradera, tal y como puede deducirse de los datos clínicos reseñados en la tabla 8, donde se observa que la mayoría de nuestros pacientes respondieron a la inmunodepresión alcanzando la remisión completa.

En nuestra experiencia, los autoanticuerpos anti-HMGCR son el sello distintivo de una enfermedad altamente homogénea, la denominada miopatía asociada a anti-HMGCR, desencadenada por estatinas, asociada a HLA-DR11 y con características en la biopsia muscular de MNIM en pacientes preferentemente de edad avanzada. Sin embargo, ni la exposición a estatinas, ni la biopsia MNIM característica, el HLA o la edad del paciente pueden identificar con éxito a todos los pacientes con la enfermedad. Por lo tanto, consideramos que la mejor forma de identificar este grupo de pacientes se basa en una evaluación exhaustiva del estado del autoanticuerpo anti-HMGCR cuando existe evidencia suficiente de un proceso muscular inflamatorio activo.

Tanto los pacientes expuestos a estatinas como los que no recibieron estatinas (3 casos) fueron positivos a HALIP, lo que sugiere que la exposición a estatinas no influye en la detección de HALIP. Además, la clasificación de pacientes con miositis asociada a HMGCR con respecto a su exposición farmacológica a estatinas puede ser engañosa, ya que los pacientes que no han recibido estatinas pueden estar efectivamente expuestos a estatinas de fuentes no farmacológicas (como el consumo de extracto de levadura roja

"arroz rojo" o algunos tipos de hongos) cuya exposición al inicio de la enfermedad puede ser difícil de determinar.

Se sabe que la HMGCR humana y la de rata comparten un 93% de identidad (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), así como que la HMGCR está altamente expresada en tejido hepático de acuerdo con Illumina Body Map (https://www.ebi .ac.uk/gxa/experiments/E-MTAB-513), por lo que no es sorprendente que los autoanticuerpos humanos anti-HMGCR reconozcan el antígeno HMGCR de rata y, por lo tanto, puedan detectarse mediante IFI en la sección de hígado de rata. Curiosamente, la IFI que usa células HEp-2, en la que HMGCR también se expresa intensamente, parece ser menos útil que el hígado de rata. La mayoría de los laboratorios miden anticuerpos anti-HMGCR por medio de pruebas internas de ELISA usando preparaciones enzimáticas disponibles en el mercado como antígeno. Recientemente, un ELISA comercial ha hecho que esta prueba esté cada vez más disponible para todos los laboratorios. El patrón de IFI que describimos **(HALIP),** podría ser de gran ayuda en el diagnóstico de la miopatía autoinmune asociada a estatinas porque puede detectarse mediante IFL en triple tejido de rata, técnica que se usa ampliamente en la mayoría de los laboratorios de inmunología, si bien es recomendable su confirmación ulterior por ELISA comercial o *in-house*, e immunoblot, quedando las técnicas de inmunoprecipitación como último recurso para aquellos pacientes con resultados discordantes en los que sea necesaria una técnica definitiva para llegar al diagnóstico

4. DISCUSIÓN GENERAL

A partir de los casos de miositis descritos en 1863 por Wagner y años más tarde por Unverricht [38,39], que cursaban con debilidad muscular y afectación cutánea y en los que la autopsia evidenció un infiltrado inflamatorio en los músculos afectados, se acuñó el término "dermatomiositis" para describir a los pacientes con miopatía inflamatoria y manifestaciones dermatológicas asociadas [40]. Posteriormente se describió por Hepp [41] el primer caso de lo que se denominó “polimiositis” en un paciente que desarrolló una miopatía inflamatoria en ausencia de afectación cutánea. Estas entidades PM y DM fueron durante muchos años las principales formas de MII.

En la década de los 70 del siglo pasado Bohan y Peter establecieron una clasificación que permitiría catalogar a los pacientes con MII en varios grupos distintos en función de su asociación a cáncer, de la presencia de formas juveniles, de la asociación a otras enfermedades sistémicas y sobre todo en función de si existían lesiones cutáneas, hecho que establecía dos grandes grupos: las PM y las DM [61,62].

Más tarde se reconocería una nueva entidad, caracterizada por la presencia de una extensa necrosis que predominaba sobre el infiltrado inflamatorio, preferentemente macrofágico, y que expresaba en la membrana de los miocitos antígenos de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), confiriendo así una más que probable naturaleza inmune a esta entidad que se denominó: miositis autoinmune necrosante [44,213]. La presencia de debilidad muscular proximal intensa y una elevación extrema de las CK eran propias de esta miopatía. Posteriormente se describieron los anticuerpos anti-SRP considerados como anticuerpos específicos de miositis asociados a este fenotipo de MII. [213].

En el año 2011 un grupo de investigadores del Johns Hopkins Myositis Center en Baltimore, describió un nuevo anticuerpo frente a una molécula de 100-200 kDa en el

suero de pacientes con MNIM que habían sido tratados con estatinas y que en estudios ulteriores pudo ser identificado como la HMGCR, enzima sobre la que actúan las estatinas (anti-HMGCR) [78,115]. Actualmente ya se reconocen dentro de la clasificación de miositis al menos 5 principales fenotipos clínicos que incluyen la dermatomiositis (DM), polimiositis (PM), miositis con cuerpos de inclusión (MCI), miositis de superposición (*overlap*) cuyo principal exponente es el síndrome antisintetasa, y miopatía necrosante inmunomediada (MNIM) [38-45].

La MNIM con anticuerpos anti-HMGCR mayoritariamente asociada a estatinas, se caracteriza por presentar debilidad progresiva simétrica de los grupos musculares proximales con mialgias de intensidad variable. A nivel de parámetros de laboratorio presentan elevación de CK, junto con presencia del alelo HLA-DRB1*11:01 [60] y los hallazgos electrofisiológicos y de la biopsia muscular [138], hacen posible su diagnóstico. Los valores plasmáticos de anti-HMGCR se correlacionan con los de CK y con la evolución clínica, llegando a negativizarse, de ahí el interés de su determinación precoz para confirmar su positividad [75].

Al igual que el resto de entidades incluidas en el grupo de MII, la MNIM es considerada una enfermedad rara por su baja prevalencia. La incidencia de las MII (dependiendo de la series) se encuentra entre de 2,2-7,7 nuevos casos por millón de habitantes y año, y las MNIM, que se consideran una enfermedad todavía más rara, representa alrededor del 20% de estos casos [131]. Los anticuerpos anti-HMGCR se encuentran en 5-7% de los pacientes con MII [117].

Su asociación con las estatinas esta bien documentada, desde su descripción por el grupo de investigadores dirigidos por el Prof. Andrew L Mammen [115], si bien algunos estudios describen pacientes con diagnóstico de MNIM con anti-HMGCR positivos en ausencia de exposición a estatinas sintéticas (fármacos), sugiriendo otros posibles

desencadenantes para el desarrollo de esta forma de miositis [117] o bien la exposición a estatinas naturales como el ya citado arroz rojo, el té Puerh o las sopas de champiñones que podrían estar contaminadas por levaduras productoras de estatinas naturales.

La toxicidad muscular es un efecto adverso bien conocido asociado a la administración de estatinas, que en algunos estudios alcanza el 0,4/100.000 personas-año [125], generando un abanico de síndromes miopáticos (mialgias aisladas, elevación de las CK, rabdomiolisis, y MNIM) asociados a este fármaco, que actúa como desencadenante antigénico.

Los mecanismos exactos relacionados con la miopatía por estatinas no son bien conocidos, e incluyen la disminución del colesterol contenido en las membranas de las células musculares, el agotamiento de los isoprenoides o de la coenzima Q10 que favorece la disfunción mitocondrial [126], además de la toxicidad inmunomediada, cuya expresión clínica se traduce como la MNIM en donde el sistema inmunológico parece desempeñar un papel importante [128-130]. El uso masivo y creciente de las estatinas en todo el mundo esta sustentado en su probada eficacia en el tratamiento de diferentes patologías principalmente como las dislipemias y en el control de las complicaciones cardiovasculares derivadas del mismas [9-11], así como por sus conocidos efectos pleiotrópicos [13,14]. Estos efectos se describen en varios estudios así como su relación con otros procesos de carácter autoinmune, no solo por su acción antiinflamatoria e inmunomoduladora, sino además por su posible actuación como agentes proapoptóticos, que liberan antígenos nucleares al torrente sanguíneo o provocan cambios moleculares susceptibles de inducir la producción de autoanticuerpos, como sucede en la MNIM [139].

La entidad descrita como MNIM con anticuerpos anti-HMGCR en relación con la administración de estatinas es un ejemplo de toxicidad en el que se encuentra implicado el

sistema inmune, y podría ser de utilidad como modelo explicativo de algunos fenómenos autoinmunitarios relacionados con las estatinas.

Así pues, en los estudios que constituyen el cuerpo de esta Tesis Doctoral, se han analizado los posibles efectos inmunomoduladores derivados de las estatinas sintéticas y su asociación con entidades autoinmunes, teniendo como eje central la MNIM con anti-HMGCR positivos, y la elaboración de métodos de detección que permitan la identificación de este autoanticuerpo como marcador de la entidad posibilitando un tratamiento lo más precoz posible.

Para el desarrollo de estos objetivos se utilizaron cohortes de pacientes de atención primaria, en el área del Carmel en la ciudad de Barcelona bajo tratamiento hipolipemiante con estatinas, sujetos con dislipemia familiar grave y en prevención secundaria tras un ictus que recibían dosis elevadas de estatinas, y cohortes de pacientes con enfermedades autoinmunes con seguimiento en el Hospital Vall d'Hebrón en las unidades de hepatología y de enfermedades autoinmunes sistémicas.

Inicialmente se llevaron a cabo estudios de prevalencia de los anti-HMGCR en las series mencionadas *(ver apartados: estudio I-II)*; y a continuación se realizaron comparaciones entre técnicas de ELISA (comercial vs *in-house*) para determinar la fiabilidad de nuestro test frente al test comercial *(ver apartado: estudio III)*; finalmente tras la descripción de la cohorte de pacientes con MNIM y anticuerpos anti-HMGCR atendidos en Hospital Vall d'Hebrón y centros colaboradores y una minuciosa valoración de las muestras de suero positivas para anti-HMGCR por IFI sobre triple tejido de rata *(ver apartado estudio IV)*, se describió un patrón de inmunofluorescencia característico.

A continuación se brinda un análisis y consideraciones de cada uno de los estudios contenidos en esta tesis doctoral.

4.1 Estudios de prevalencia: Estudios I-II

Dado el aumento progresivo de la prescripción de los fármacos hipolipemiantes conocidos como estatinas, por su elevada efectividad como tratamiento para dislipemias, control de riesgo cardiovascular y uso en prevención secundaria en accidentes cerebro vasculares, es fundamental conocer la prevalencia de los anticuerpos anti-HMGCR en los sujetos que son tratados con estatinas.

Con este propósito, se realizó (*Estudio I)* un estudio de prevalencia en una cohorte de pacientes provenientes de atención primaria en el aérea del Carmel de la Ciudad de Barcelona que recibían estatinas por dislipemias. Los pacientes fueron evaluados en consultas externas de atención primaria, con una entrevista clínica dirigida a detección de síntomas sugestivos de enfermedad muscular y mediante exploración física que incluyó la búsqueda de signos específicos de miopatía.

Se llevó a cabo la determinación en suero de CK y estudio posterior de los anticuerpos anti-HMGCR mediante los tests de ELISA comercial e *in-house* (*ver apartado estudio I: material y métodos*).

Una vez concluido el análisis de los resultados de esta cohorte de pacientes, los resultados determinaron que ninguna muestra presentó anti-HMGCR positivo por ninguno de los dos tests de ELISA, y a pesar de que en las variables clínicas se registraron síntomas sugestivos de miopatía [mialgias musculares (11%), debilidad muscular leve (3%) y un test de *rolling* dudosamente positivo (5%)], estos se consideraron inespecíficos y sin trascendencia clínica alguna.

Estos resultados coinciden con estudios previos donde la prevalencia de este anticuerpo en pacientes tratados con estatinas en la población general es bajo [116] confiriendo margen terapéutico suficiente para continuar con el uso adecuado de estos fármacos en la población general.

El segundo estudio de prevalencia *(Estudio II)* se realizó en una población determinada de pacientes diagnosticados de enfermedades autoinmunes sistémicas [lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria (antes cirrosis biliar primaria), miopatías inflamatorias idiopáticas] y en otras enfermedades no autoinmunes en tratamiento con estatinas (como accidentes cerebro vasculares y dislipidemia familiar grave). Todos estos pacientes realizaban seguimiento en la unidad de enfermedades autoinmunes sistémicas, servicio de Hepatología, unidad de lípidos y servicio de Neurología respectivamente del Hospital General Vall d'Hebron de la ciudad de Barcelona.

Se decidió iniciar este estudio para conocer la posible coexistencia del anticuerpo anti-HMGCR con anticuerpos específicos de otras enfermedades autoinmunes sistémicas que además pudieran estar en tratamiento con estatinas.

El estudio se dividió en dos grupos, el primero incluía: lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria (antes cirrosis biliar primaria), miopatías inflamatorias idiopáticas; y el segundo: dislipidemias familiares graves y AVC. Ambos tests de ELISA (comercial e *in-house*) se utilizaron para la determinación de los anti-HMGCR en todas las muestras analizadas (*ver apartado estudio II: material y métodos*). Se han publicados varios estudios que describen posibles efectos inmonumoduladores beneficiosos y/o efectos adversos derivados del uso de estatinas en enfermedades de origen autoinmune [LES [198-201]; SS [214]; ES [209]; AR [180-181]]; HAI, CBP y MII.

Queremos hacer mención especial a los pacientes diagnosticados de de HAI y CBP donde las estatinas quizás pudieran desempeñar algún rol, como coadyuvante tal vez, en la etiopatogenia de estas entidades [141,142,147]. Los efectos atribuidos a las estatinas pueden variar desde una elevación de transaminasas séricas de origen hepático transitoria

hasta producir reacciones más graves como toxicidad hepática, quizás debido a un mecanismo directo de daño sobre los hepatocitos acompañado de una agresión autoinmune puesto en evidencia por la presencia de ANA [141,157-162] . En el mecanismo parecen estar implicadas vías de activación inmunológica que producirían una expansión de linfocitos T $CD8^+$, lo que evidencia la participación de las moléculas de clase I y II del sistema HLA en la presentación del antígeno [167-171]. El fármaco parecería actuar como desencadenante, generando toxicidad hepática con presencia de autoanticuerpos, que persistiría a pesar de la retirada del fármaco [171,174], siendo preciso, en la mayoría de los casos, administrar tratamiento inmunodepresor para resolver el proceso, escenario muy similar al propuesto en la MNIM.

Por otro lado, por la ya conocida asociación entre MII y anti-HMGCR, se procedió a la detección de este anticuerpo en una serie de pacientes con diagnóstico de MII (PM; DM; MNIM).

En el segundo grupo (AVC y dislipemias graves) partimos de la base que estas entidades llevan como parte de su tratamiento dosis altas de estatinas por lo que el análisis de la detección de anti-HMGCR en estas poblaciones parece relevante dadas sus implicaciones clínicas.

Los resultados obtenidos mostraron una prevalencia de 4,3% (IC 95% 2,47 - 7,53) total en el grupo 1 con el test ELISA *in-house*, mientras que para el test comercial resulto ser de 3,13% (IC 95% 1,59 – 6,04). En el caso de subgrupo hepatopatía autoinmune se detectaron dos muestras positivas para anti-HMGCR con el test de ELISA *in-house* mostrando una prevalencia de 3,03% (IC 95% 0,08-15,76) en este subgrupo. El resto de muestras analizadas fueron negativas para la detección de anticuerpos con ambos tests (comercial e *in-house*). El aumento de prevalencia en el grupo 1 de enfermedades

autoinmunes sistémicas fue debido con toda probabilidad a los pacientes con MNIM incluidos en el grupo de MII. En concreto los valores encontrados en este grupo mediante ambos test de ELISA fueron del 6,15 % (IC 95% 2,69 - 11,77) con el test comercial, y del 6,92 % (IC 95% 3,21 - 12,74) con el método realizado en nuestro laboratorio (*in-house*). La prevalencia global para dislipemia grave y AVC (grupo 2) fue de 2,60% (IC 95% 0,32 - 9,07) con el test *in-house*, y del 0% con el comercial.

Los resultados obtenidos en el *Estudio II*, son concordantes con el *Estudio I* donde la prevalencia de los anti-HMGCR es baja, incluso en los subgrupos que recibieron dosis elevadas de estatinas tanto en prevención secundaria de ictus o dislipemias graves, estos resultados son similares a los estudios publicados [115-117] en los que la presencia de estos autoanticuerpos en población ambulatoria es baja.

Hasta la finalización de esta tesis doctoral sólo se tiene constancia de un estudio publicado en 2016 [218] donde se investigó la presencia de anti-HMGCR en una serie de 306 pacientes afectos de esclerodermia. En este estudio se detectó positividad para estos anticuerpos en un 1,3%, aunque sin traducción clínica. En relación al resto de enfermedades autoinmunes analizadas en esta tesis doctoral, específicamente en LES, SS, AR, HAI y CBP, no se recogen en la bibliografía médica estudios dirigidos a conocer la prevalencia o significado clínico de estos anticuerpos (anti-HMGCR). Es por ello que los datos obtenidos aquí tienen una especial relevancia.

Cabe destacar que en el subgrupo de hepatopatías de origen autoinmune (HAI y CBP) se detectaron dos muestras positivas mediante ELISA *in-house* (y no por ELISA comercial) que al ser confrontadas con la clínica de los sujetos (ausencia de datos sugestivos de miopatía) se consideraron falsos positivos.

De esto se desprende, a pesar de que existen estudios que ponen de manifiesto como posible *trigger* de HAI y CBP a las estatinas, y de que hasta la fecha se ha publicado un caso clínico en el que se describe la coexistencia de HAI y una posible miositis por anti-HMGCR [(215)], que la afirmación de que comparten la misma vía de activación inmunológica, teniendo en cuenta datos disponibles, es insuficiente para la confirmación y apunta más a que sus vías de activación son diferentes.

La principal limitación de los estudios I y II, sobre todo en referencia a las HAI es el tamaño muestral, no pudiendo descartar que un incremento de la población a estudio arrojara resultados diferentes, quizás positivos.

4.2 Métodos de detección para el anticuerpo anti-HMGCR

Estudio III. Comparación entre ELISA in-house y ELISA comercial

La miopatía necrosante inmunomediada, en especial la MNIM por anti-HMGCR, es un trastorno poco frecuente en el grupo de miopatías inflamatorias autoinmunes. Su diagnóstico requiere unas manifestaciones clínicas propias, así como características histológicas compatibles en la biopsia muscular, y la detección de anticuerpos contra la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, enzima específicamente inhibida por las estatinas.

La importancia de la detección de estos anticuerpos (anti-HMGCR) es fundamental para el diagnóstico de esta entidad, y permite implementar un tratamiento adecuado que otorga al paciente afecto de esta entidad una mejoría clínica significativa en la mayoría de casos [(119)]. Es por tanto de suma importancia contar con técnicas fiables, sencillas y reproducibles, para identificar estos anticuerpos. En esta Tesis Doctoral se ha realizado un estudio comparativo entre dos técnicas de ELISA, una comercial y otra *in-*

house así como la búsqueda de otros métodos que ayuden a la precoz determinación del anticuerpo anti-HMGCR.

La comparación de ambas técnicas se llevó a cabo en un total de 430 muestras correspondientes a los 2 principales grupos estudiados: grupo 1 constituido por enfermedades autoinmunes sistémicas entre las que se encontraban las MII y las HAI, y grupo 2 en pacientes que recibían dosis elevadas del fármaco por su patología de base, dislipemia familiar grave o profilaxis secundaria en pacientes que habían padecido un ictus *(ver apartado estudio III: material y métodos).*

El test de ELISA *in-house* se realizó en el laboratorio de investigación (VHIR) sección enfermedades autoinmunes a partir del antígeno comercial HMGCR y controles positivos suministrados de forma altruista por el Prof andrew L Mammen; el test de ELISA comercial utilizado fue suministrado por la casa INOVA, ambos descritos en detalle previamente (apartado 3.3.1; 3.3.2). Los resultados positivos detectados con alguna de las técnicas se describen en la tabla 7. Posteriormente se contrastó con la clínica presentada en cada uno de los pacientes, lo que ayudó a la credibilidad de los resultados.

Las leves discordancias observadas entre el ELISA comercial e *in-house* pusieron de manifiesto sueros positivos para anti-HMGCR por el test *in-house* en pacientes con diagnóstico de hepatopatía autoinmune (pacientes 43 y 62) y pacientes con tratamiento con estatinas tras un episodio de AVC (pacientes 1 y 16). Estos resultados se dieron como falsos positivos dado que ningún paciente presentaba clínica sugestiva miopatía inflamatoria.

Esta diferencia entre los dos tests de ELISA, podría deberse fundamentalmente al origen del antígeno utilizado para la realización del test ELISA *in-house,* en

comparación con el utilizado en el test comercial; 1) la proteína utilizada en nuestro test fue una HMGCR recombinante fusionada con GST a diferencia del comercial que esta fusionada con polihistidinas lo que hace posible que la reacción observada se deba al reconocimiento de GST y no de HMGCR; 2) el antígeno frente al que se dirigen los anti-HMGCR en el caso del metodo *in-house* se expresa en *Escherichia coli* (*E.coli*) (Sigma, St. Lois, MO, USA), no así el comercial que su expresión se produjo en baculovirus infectando células de insecto Sf9, lo que al momento de la unión del suero humano con proteína del *E. Coli* produciese una intensidad mayor al momento de la reacción; 3) otro aspecto que podría influir es la conformación de la estructura terciaria de ambas proteínas recombinantes, posiblemente haciendo que determinados epítopos quedaran más expuesto en nuestro ELISA *in-house*. Todas y cada uno de estas variantes podrían ser la causa de los resultados positivos por el test de ELISA *in-house* y no en el test comercial.

El análisis estadístico mediante el coeficiente Kappa de Cohen mostró una buena concordancia global ($\kappa = 0,76$) y una excelente concordancia ($\kappa = 0,94$) entre los dos ensayos para el subconjunto de pacientes con miositis. La prueba (Rho, ρ) de Spearman basándose en las densidades ópticas (D.O.) de los resultados de cada test, que mostró una correlación lineal significativa [R_s] entre los métodos de 0,14 ($p = 0,004$). Estos resultados avalan al test de ELISA realizado en nuestro laboratorio para su utilización como método diagnóstico ante la sospecha de MNIM por anti-HMGCR.

4.3 Descripción de un nuevo patrón de IFI en una cohorte de pacientes con MNIM por anticuerpos anti-HMGCR.

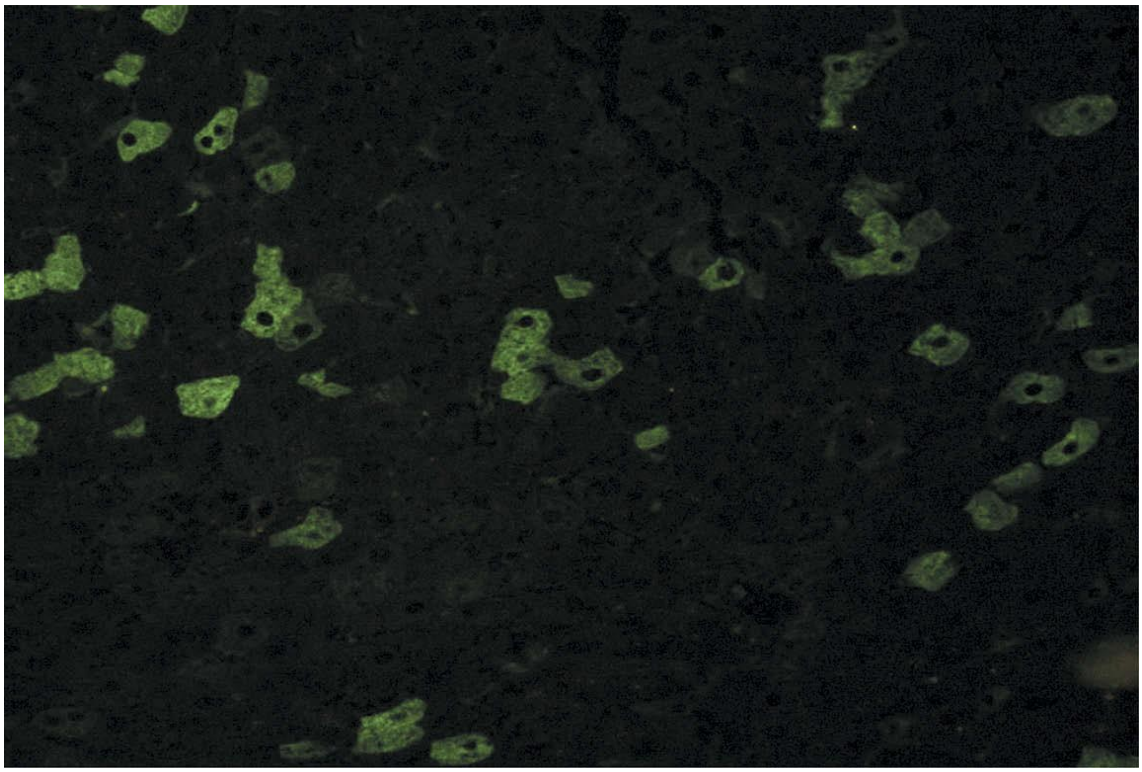
Se realizó una descripción detallada de una serie de pacientes con miositis asociada a anti-HMGCR (tabla 8), estos sueros fueron estudiados por ambas técnicas de

ELISA (comercial e *in-house*) con confirmación posterior por inmunoblot (*ver apartado estudio IV: material y métodos*).

En un estudio realizado en el 2014 por Musset et al, [212] se comparó la detección del anticuerpo anti-HMGCR por diferentes técnicas de laboratorio, en el cual se describió un patrón fino granular citoplasmático con refuerzo perinuclear en las células humanas HEp-2 mediante IFI, sin embargo este patrón soló se detectó en un 3% o menos de los casos estudiados, siendo considerado por los autores del estudio como inespecífico. Por otro lado, se sabe que la HMGCR humana y la de la rata comparten un 93% de identidad, así como que la HMGCR se encuentra expresada en el tejido hepático, por lo que nos plateamos utilizar como método de detección para el anti-HMGCR en IFI en triple tejido de rata.

En esta línea, se decidió realizar IFI en triple tejido de rata a las muestra positivas para anti-HMGCR de la serie de miositis previamente descrita, observándose una tinción sobre hepatocitos dispersos con una distribución centro-lobullillar, esta tinción se limitó al citoplasma y separó claramente a los núcleos en la célula (*ver estudio IV resultados apartado 4.2.2*). Este patrón fue claramente diferente de los patrones producidos por anticuerpos anti-mitocondriales, anti-LKM (del inglés, *Liver, Kidney, Microsomal*) o LC1 detectados mediante esta técnica. Por lo tanto, se decidió denominarlo patrón de IFL de hígado asociado a anticuerpo anti-HMGR (HALIP, del inglés ***H****MGCR antibody* ***A****ssociated* ***L****iver* ***I****FL* ***P****attern*) (Figura 8).

Figura 8



HALIP. Microscopio Confocal FV (Olympus x 200).

Para su comprobación se llevo a cabo un experimento de inmunoabsorción en 5 pacientes con suero positivo para anti-HMGCR, mostrando la desaparición progresiva de HALIP según el incremento del antígeno humano HMGCR utilizado en este experimento (Figura 5). Se reprodujo este ensayo en varios portaobjetos de diferentes marcas comerciales obteniendo el mismo resultado. Esta tinción característica en IFI no se observó en ninguna otra de las muestras utilizadas como controles, cabe destacar que otros patrones (anti-LKM y anti-célula parietal gástrica) observados en alguna de las muestras positivas para anti-HMGCR, no desaparecieron tras la aplicación del antígeno.

La ausencia de dicho patrón en pacientes con otras enfermedades autoinmunes o en sujetos control expuestos a estatinas indica que los resultados de HALIP identifican a pacientes con miositis asociada a anti-HMGCR de una manera especifica y reproducible comparable a los autoanticuerpos anti-HMGCR medidos por ELISA y confirmados por Western blot.

4.4 La importancia del patrón HALIP como método de detección de anti-HMGCR

Teniendo en cuenta la elevada prescripción de estatinas, que incluye a millones de sujetos en todo el mundo, y aunque la prevalencia de la entidad conocida como MNIM por estatinas con anticuerpos anti-HMGCR es baja, estimada de 2-3 casos nuevos en cada 100.000 [(216)], es más que probable que el diagnóstico de esta entidad aumente en los próximos años. Ello tiene interés, ya que esta afección clínica es potencialmente reversible con tratamiento, a diferencia de otros procesos miopáticos que tienen un curso insidioso y a veces refractario al tratamiento correspondiente.

Las prueba de ELISA es sencilla de realizar y reproducible, si bien su principal problema es el exceso de sensibilidad que puede dar lugar a resultados falsamente positivos, especialmente cuando hablamos de títulos bajos. Alternativamente y durante muchos años se ha utilizado con probada eficacia para la detección de anticuerpos en otras enfermedades autoinmunes la técnica de IFI sobre triple tejido de rata, que detecta patrones característicos. Esto, sumado al hecho de que ciertas pruebas diagnósticas solo se encuentran disponibles en centros hospitalarios de alta complejidad, otorga a esta prueba complementaria -la IFI, de bajo coste económico y fácil realización- una relevancia diagnóstica considerable para la detección de estos anticuerpos mediante el reconocimiento del característico patrón HALIP [(120)].

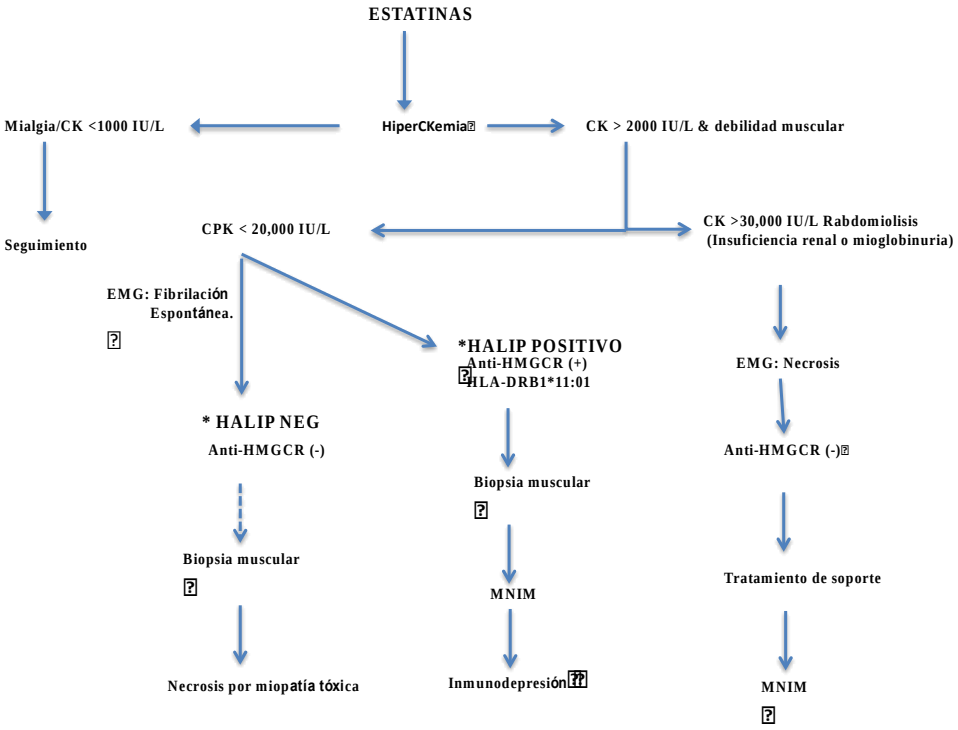
Ante la positividad del patrón HALIP, es sin embargo recomendable, siempre que sea posible, la confirmación posterior mediante ELISA o transferencia de blot. Aunque la inmunoprecipitación sigue siendo la técnica de referencia para detectar anticuerpos anti-HMGCR, solamente se utiliza con fines de confirmación en casos esporádicos en los que los resultados no son concluyentes.

La MNIM por anti-HMGCR, se describió inicialmente en adultos y con el uso de estatinas, pero recientemente se ha descrito una MNIM con anticuerpos anti-HMGCR también en niños [132-134], mal catalogados como distrofias, sin evidencia de consumo de estatinas [117]. Ocasionalmente se ha relacionado con el cáncer [217], si bien esta asociación parece ser de baja intensidad. Es este sentido el patrón HALIP fue característico con las muestras positivas para anti-HMGCR en pacientes con uso de estatinas pero también en muestras de pacientes sin evidencia de estar bajo tratamiento con estas farmacos.

Ante lo todo lo expuesto anteriormente, el reconocimiento oportuno del patrón HALIP brinda al clínico, en el contexto indicado de sospecha de miositis, una útil herramienta más a la hora de realizar el diagnóstico.

Atendiendo a la experiencia acumulada en los últimos años, y al valor preeminente del anticuerpos anti-HMGCR como marcador del síndrome, hemos diseñado el siguiente algoritmo, donde el patrón HALIP puede ser usado a manera de test de cribado, y se priorizar una u otra prueba para llegar al diagnóstico en las situaciones clínicas de manifestaciones musculares asociadas al uso de estatinas (Figura. 9).

Figura 9



Algoritmo diagnóstico propuesto en la miopatía asociada a estatinas. CK: creatine kinase (valores aproximados); EMG: electromiografía; HMGCR: 3-hidroxi-3- metilglutaril coenzima A reductasa; MNIM: miopatía necrosante inmunomediada. * La determinación del patrón de IFI sobre triple tejido de rata, muestra un patrón característico (HALIP) (del inglés, HMGCR antibody Associated Liver IFL Pattern), que puede ser de extrema utilidad para el diagnóstico en aquellos laboratorios en los que no es posible realizar la técnica de ELISA para anti-HMGCR, o bien como prueba de cribado inicial.

5. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de anticuerpos anti-HMGCR en pacientes tratados con estatinas en atención primaria es inferior al 1%, en concordancia con lo observado en otros estudios

2. La prevalencia de los anticuerpos anti-HMGCR en las enfermedades autoinmunes sistémicas y en sujetos con dislipemia familiar grave o ictus, no es diferente a la obtenida en los pacientes tratados con estatinas en atención primaria, es decir inferior al 1%. Únicamente en el grupo de pacientes con miositis, especialmente en aquellas formas de MNIM la prevalencia aumenta hasta el 80%.

3. La concordancia entre las diferentes técnicas de ELISA utilizadas para la determinación de anti-HMGCR (comercial vs *in-house*) es excelente (concordancia 98%, κ 0,76), como también lo es entre ambas técnicas de ELISA y el patrón de IFL (HALIP) descrito en estos pacientes (concordancia del 99%, κ 0,95)

4. La presencia de anticuerpos anti-HMGCR en pacientes con miopatía inflamatoria, permite definir un fenotipo característico clínico-patológico en donde los resultados de la biopsia muscular muestran con frecuencia una MNIM, pero pueden también mostrar un patrón patológico de PM o DM. El patrón de IFL tipo HALIP es característico de esta entidad y permite identificar el síndrome mediante técnicas más simples y asequibles a cualquier laboratorio.

5. En función de nuestra experiencia, y la presencia de los anti-HMGCR se describe un algoritmo de actuación en pacientes con sospecha de miopatía por estatinas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML 236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. FEBS Lett..1976; 72: 323–326.

2. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinum*. J Antibiot (Japan). 1976; 29:1346–1348.

3. Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. Proc Natl Acad Sci. 1980;77:3957-61.

4. Sirtori CR. The pharmacology of statins. Pharmacol Res. 2014;88:3-11.

5. Mabuchi H, Haba T, Tatami R, Miyamoto S, Sakai Y, Wakasugi T, et al. Effects of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on serum lipoprotein and ubiquinone-10-levels in patients with familial hypercholesterolemia. N Engl J Med. 1981; 305: 478–482.

6. Vagelos PR. Are prescribing drug prices high?. Science. 1991;252: 1080–84.

7. Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. Nat Rev Drug Discov. 2003; 2:517-26.

8. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. J Lipid Res. 1992;33:1569-82.

9. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Cholesterol

Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. Lancet. 2005;366:1267-78.

10. Shanes JG, Minadeo KN, Moret A, Groner M, Tabaie SA. Statin therapy in heart failure: prognostic effects and potential mechanisms. Am Heart J. 2007;154:617-23.

11. Wallach-Kildemoes H, Stovring H, Holme Hansen E, Howse K, Pétursson H. Statin prescribing according to gender, age and indication: what about the benefit-risk balance? J Eval Clin Pract. 2016;22:235-46.

12. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, et al. FOURIER Steering Committee and Investigators. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. N Engl J Med. 2017;376:1713-22.

13. Agencia Espanola de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad y Política Social. Utilización de medicamentos hipolipemiantes en España durante el periodo 2000-2012. INFORME DE UTILIZACIÓN DE MEDICAMENTOS. Pdf. 2014;1-4.

14. Calabrò P, Yeh ET. The pleiotropic effects of statins. Curr Opin Cardiol. 2005;20:541-6.

15. Alvarado Cárdenas M, Marín Sánchez A, Lima Ruiz J. Statins and autoimmunity. Med Clin (Barc). 2015;145:399-403.

16. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. Nat Med. 2000;6:1399-402.

17. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, et al. C-reactive

protein levels and outcomes after statin therapy. N Engl J Med. 2005;352:20-8.

18. Zhang X, Jin J, Peng X, Ramgolam VS, Markovic-Plese S. Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORC in CD4+ lymphocytes. J Immunol. 2008;180:6988-96.

19. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. Inflamm Res. 2000;49:497-505.

20. García-Rodríguez LA, Massó-González EL, Wallander MA, Johansson S. The safety of rosuvastatin in comparison with other statins in over 100,000 statin users in UK primary care. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2008;17:943-52.

21. Stroes ES, Thompson PD, Corsini A, Vladutiu GD, Raal FJ, Ray KK et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement Assessment, Aetiology and Management. Eur Heart J. 2015;36:1012-1022.

22. Jacobson TA. NLA Task Force on Statin Safety--2014 update. J Clin Lipidol. 2014;8:S1-4.

23. Parker BA, Capizzi JA, Grimaldi AS, Clarkson PM, Cole SM, et al. Effect of statins on skeletal muscle function. Circulation. 2013;127:96-103.

24. Šimić I, Reiner Ž. Adverse effects of statins - myths and reality. Curr Pharm Des. 2015;21:1220-6.

25. Cohen DE, Anania FA, Chalasani N; for the National Lipid Association Statin Safety

Task Force Liver Expert Panel. An assessment of statin safety by hepatologists. Am J Cardiol. 2006;97:77C-81C.

26. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJ, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. Lancet. 2010;375;735-42.

27. Brault M, Ray J, Gomez YH, Mantzoros CS, Daskalopoulou SS. Statin treatment and new-onset diabetes: a review of proposed mechanisms. Metabolism. 2014;63:735-45.

28. Preiss D, Seshasai SR, Welsh P, Murphy SA, Ho JE, Waters DD, et al. Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with mode- rate-dose statin therapy: a meta-analysis. JAMA. 2011;305:2556- 64.

29. Dormuth CR, Filion KB, Paterson JM, James MT, Teare GF, Raymond CB, et al. Canadian Network for Observational Drug Effect Studies Investigators. Higher potency statins and the risk of new diabetes: multicentre, observational study of administrative databases. BMJ. 2014;348:g3244.

30. Emberson JR, Kearney PM, Blackwell L, Newman C, Reith C, Bhala N, et al. Lack of effect of lowering LDL cholesterol on cancer: meta-analysis of individual data from 175,000 people in 27 randomised trials of statin therapy. PLoS One. 2012;7:e29849.

31. Vallianou NG, Kostantinou A, Kougias M, Kazazis C. Statins and cancer. Anticancer Agents Med Chem. 2014;14:706-12.

32. Strom BL, Schinnar R, Karlawish J, Hennessy S, Teal V, Bilker WB. Statin Therapy and Risk of Acute Memory Impairment. JAMA Intern Med. 2015;173:1399-405.

33. Noël B. Lupus erythematosus and other autoimmune diseases related to statin therapy: a systematic review. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2007;21:17-24.

34. Moulis G, Béné J, Sommet A, Sailler L, Lapeyre-Mestre M, Montastruc JL; French Association of PharmacoVigilance Centres. Statin-induced lupus: a case/non-case study in a nationwide pharmacovigilance database. Lupus. 2012;21:885-9.

35. Zaraa IR, Labbène I, Mrabet D, Zribi H, Chelly I, Zitouna M, et al. Simvastatin-induced dermatomyositis in a 50-year-old man. BMJ Case Rep. 2011;29;2011.

36. Alla V, Abraham J, Siddiqui J, Raina D, Wu GY, Chalasani NP, Bonkovsky HL. Autoimmune hepatitis triggered by statins. J Clin Gastroenterol. 2006;40:757-61.

37. Sen D, Rosenstein ED, Kramer N. ANCA-positive vasculitis associated with simvastatin/ezetimibe: expanding the spectrum of statin-induced autoimmunity? Int J Rheum Dis. 2010;13:e29-31.

38. Wagner E. Fall einer seltnen Muskelkrankheit. Dtsch Arch Heilk 1863; 4: 282–283.

39. Unverricht H. Polymyositis acuta progressive. Z Klin Med 1887; 12: 553.

40. Unverricht H. Dermatomyositis acuta. Dtsch Med Wochenschr 1891; 17: 41–44.

41. Hepp P. U¨ ber einen Fall von acuter parenchymatoser Myositis, welche

Geschwulste bildete und Fluctuation vortauschte. Berlin Klin Wochenschr 1887; 24:

389

42. Chou SM. Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis. Science. 1967;158:1453-5.

43. Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, Engel A, Karpati G, Mendell JR, et al. Inclusion body myositis and myopathies. Ann Neurol. 1995;38:705-13.

44. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, Choy EH, Lundberg IE, Rose MR, et al. 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. Neuromuscul Disord. 2004;14:337-45.

45. Mammen AL. Autoimmune myopathies: autoantibodies, phenotypes and pathogenesis. Nat Rev Neurol. 2011;7:343-54.

46. Fiorentino D, Chung L, Zwerner J, Rosen A, Casciola-Rosen L. The mucocutaneous and systemic phenotype of dermatomyositis patients with antibodies to MDA5 (CADM-140): a retrospective study. J Am Acad Dermatol. 2011;65:25-34.

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

48. Bernatsky S, Joseph L, Pineau CA, Bélisle P, Boivin JF, Banerjee D, et al. Estimating the prevalence of polymyositis and dermatomyositis from administrative data: age, sex and regional differences. Ann Rheum Dis. 2009 ;68:1192-6.

49. Smoyer-Tomic KE, Amato AA, Fernandes AW. Incidence and prevalence of idiopathic inflammatory myopathies among commercially insured, Medicare supplemental insured, and Medicaid enrolled populations: an administrative claims analysis. BMC Musculoskelet Disord. 2012;13:103.

50. Vargas-Leguás H, Selva-O'Callaghan A, Campins-Martí M, Hermosilla Pérez E,

Grau-Junyent JM, Martínez Gómez X, et al. [Polymyositis-dermatomyositis: incidence in Spain (1997-2004)]. Med Clin (Barc). 2007;129:721-4.

51. O'Hanlon TP, Carrick DM, Arnett FC, Reveille JD, Carrington M, Gao X, et al. Immunogenetic risk and protective factors for the idiopathic inflammatory myopathies: distinct HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 and -DQA1 allelic profiles and motifs define clinicopathologic groups in caucasians. Medicine (Baltimore) 2005 ;84:338-49.

52. Mamyrova G, O'Hanlon TP, Monroe JB, Carrick DM, Malley JD, Adams S, et al. Childhood Myositis Heterogeneity Collaborative Study Group. Immunogenetic risk and protective factors for juvenile dermatomyositis in Caucasians. Arthritis Rheum. 2006;54:3979-87.

53. O'Hanlon TP, Carrick DM, Targoff IN, Arnett FC, Reveille JD, Carrington M, et al. Immunogenetic risk and protective factors for the idiopathic inflammatory myopathies: distinct HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, and -DQA1 allelic profiles distinguish European American patients with different myositis autoantibodies. Medicine (Baltimore). 2006;85:111-27.

54. O'Hanlon TP, Rider LG, Schiffenbauer A, Targoff IN, Malley K, et al. Immunoglobulin gene polymorphisms are susceptibility factors in clinical and autoantibody subgroups of the idiopathic inflammatory myopathies. Arthritis Rheum. 2008;58:3239-46.

55. Werth VP, Callen JP, Ang G, Sullivan KE. Associations of tumor necrosis factor alpha and HLA polymorphisms with adult dermatomyositis: implications for a unique pathogenesis. J Invest Dermatol. 2002;119:617-20.

56. Garlepp MJ. Immunogenetics of inflammatory myopathies. Baillieres Clin Neurol. 1993;2:579-97.

57. Arnett FC, Targoff IN, Mimori T, Goldstein R, Warner NB, Reveille JD. Interrelationship of major histocompatibility complex class II alleles and autoantibodies in four ethnic groups with various forms of myositis. Arthritis Rheum. 1996;39:1507-18.

58. Chinoy H, Salway F, John S, Fertig N, Tait BD, Oddis CV, et al. UK Adult Onset Myositis Immunogenetic Collaboration. Interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms in Caucasian idiopathic inflammatory myopathy patients in UK. Ann Rheum Dis. 2007;66:970-3.

59. Gang Q, Bettencourt C, Machado P, Hanna MG, Houlden H. Sporadic inclusion body myositis: the genetic contributions to the pathogenesis. Orphanet J Rare Dis. 2014;9:88.

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

61. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). N Engl J Med. 1975;292:344-7.

62. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). N Engl J Med. 1975;292:403-7.

63. Dalakas MC, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. Lancet. 2003 Sep 20;362:971-82.

64. Danielsson O, Lindvall B, Gati I, Ernerudh J. Classification and diagnostic investigation in inflammatory myopathies: a study of 99 patients. J Rheumatol. 2013;40:1173-82.

65. Noguchi E, Uruha A, Suzuki S, Hamanaka K, Ohnuki Y, Tsugawa J, et al. Skeletal Muscle Involvement in Antisynthetase Syndrome. JAMA Neurol. 2017;74:992-999.

66. Linklater H, Pipitone N, Rose MR, Norwood F, Campbell R, Salvarani C, et al. Classifying idiopathic inflammatory myopathies: comparing the performance of six existing criteria. Clin Exp Rheumatol. 2013;31:767-9.

67. Lloyd TE, Mammen AL, Amato AA, Weiss MD, Needham M, Greenberg SA. Evaluation and construction of diagnostic criteria for inclusion body myositis. Neurology. 2014;83:426-33.

68. Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, Werth VP, Pilkington C, Visser M,et al; International Myositis Classification Criteria Project consortium, The Euromyositis register and The Juvenile Dermatomyositis Cohort Biomarker Study and Repository (JDRG) (UK and Ireland). 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. Ann Rheum Dis. 2017 Dec;76:1955-1964.

69. Gan L, O'Hanlon TP, Gordon AS, Rider LG, Miller FW, Burbelo PD. Twins discordant for myositis and systemic lupus erythematosus show markedly enriched autoantibodies in the affected twin supporting environmental influences in pathogenesis. BMC Musculoskelet Disord. 2014;15:67.

70. Sarkar K, Weinberg CR, Oddis CV, Medsger TA Jr, Plotz PH, Reveille JD, et al. Seasonal influence on the onset of idiopathic inflammatory myopathies in serologically defined groups. Arthritis Rheum. 2005;52:2433-8.

71. Vegosen LJ, Weinberg CR, O'Hanlon TP, Targoff IN, Miller FW, Rider LG. Seasonal birth patterns in myositis subgroups suggest an etiologic role of early environmental exposures. Arthritis Rheum. 2007;56:2719-28.

72. Okada S, Weatherhead E, Targoff IN, Wesley R, Miller FW; International Myositis Collaborative Study Group. Global surface ultraviolet radiation intensity may modulate the clinical and immunologic expression of autoimmune muscle disease. Arthritis Rheum. 2003;48:2285-93.

73. Hengstman GJ, van Venrooij WJ, Vencovsky J, Moutsopoulos HM, van Engelen BG. The relative prevalence of dermatomyositis and polymyositis in Europe exhibits a latitudinal gradient. Ann Rheum Dis. 2000;59:141-2.

74. Shah M, Targoff IN, Rice MM, Miller FW, Rider LG; Childhood Myositis Heterogeneity Collaborative Study Group. Brief report: ultraviolet radiation exposure is associated with clinical and autoantibody phenotypes in juvenile myositis. Arthritis Rheum. 2013;65:1934-41.

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

76. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Soto MJ, Cuadrado MJ, Khamashta MA. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2008;22:847-61.

77. Hochberg MC, Feldman D, Stevens MB. Adult onset polymyositis/dermatomyositis: an analysis of clinical and laboratory features and survival in 76 patients with a review of the literature. Semin Arthritis Rheum. 1986;15:168-78.

78. Christopher-Stine L, Casciola-Rosen LA, Hong G, Chung T, Corse AM, Mammen AL. A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. Arthritis Rheum. 2010;62:2757-66.

79. Mercado U. Dermatomyositis with normal creatine kinase and elevated aldolase levels. J Rheumatol. 2002;29:2242.

80. Nozaki K, Pestronk A. High aldolase with normal creatine kinase in serum predicts a myopathy with perimysial pathology. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2009;80:904-8.

81. Casciola-Rosen L, Hall JC, Mammen AL, Christopher-Stine L, Rosen A. Isolated elevation of aldolase in the serum of myositis patients: a potential biomarker of damaged early regenerating muscle cells. Clin Exp Rheumatol. 2012;30:548-53.

82. Nishikai M, Reichlin M. Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis. Characterization of the Jo-1 antibody system. Arthritis Rheum. 1980;23:881-8.

83. Mathews MB, Bernstein RM. Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. Nature. 1983;304:177-9

84. Yoshida S, Akizuki M, Mimori T, Yamagata H, Inada S, Homma M. The precipitating antibody to an acidic nuclear protein antigen, the Jo-1, in connective tissue diseases. A

marker for a subset of polymyositis with interstitial pulmonary fibrosis. Arthritis Rheum. 1983;26:604-11.

85. Marguerie C, Bunn CC, Beynon HL, Bernstein RM, Hughes JM, So AK, Walport MJ. Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. Q J Med. 1990;77:1019-38.

86. Mathews MB, Reichlin M, Hughes GR, Bernstein RM. Anti-threonyl-tRNA synthetase, a second myositis-related autoantibody. J Exp Med 1984;160:420–34.

87. Kalluri M, Sahn SA, Oddis CV, Gharib SL, Christopher-Stine L, Danoff SK, et al. Clinical profile of anti-PL-12 autoantibody. Cohort study and review of the literature. Chest. 2009;135:1550-1556.

88. Targoff IN. Autoantibodies to aminoacyl-transfer RNA synthetases for isoleucine and glycine. Two additional synthetases are antigenic in myositis. J Immunol 1990;144:1737–43.

89. Hirakata M, Suwa A, Nagai S. et al. Anti-KS: identification of autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase associated with interstitial lung disease. J Immunol 1999;162:2315–20.

90. Betteridge Z, Gunawardena H, North J, Slinn J,. Anti-synthetase syndrome: a new autoantibody to phenylalanyl transfer RNA synthetase (anti-Zo) associated with polymyositis and interstitial pneumonia. Rheumatology 2007;46:1005–8.

91. Hashish L, Trieu EP, Sadanandan P, Targoff IN. Identification of autoantibodies to tyrosyl-tRNA synthetase in dermatomyositis with features consistent with anti-synthetase syndrome. Arthritis Rheum 2005;52:S312.

91. Reichlin M, Mattioli M. Description of a serological reaction characteristic of polymyositis. Clin Immunol Immunopathol. 1976;5:12-20.

92. Mammen AL, Casciola-Rosen LA, Hall JC, Christopher-Stine L, Corse AM, Rosen A. Expression of the dermatomyositis autoantigen Mi-2 in regenerating muscle. Arthritis Rheum. 2009;60:3784-93.

93. Kashiwagi M, Morgan BA, Georgopoulos K. The chromatin remodeler Mi-2beta is required for establishment of the basal epidermis and normal differentiation of its progeny. Development. 2007;134:1571-82.

94. Yamada T, Yang Y, Hemberg M, Yoshida T, Cho HY, Murphy JP, et al. Promoter decommissioning by the NuRD chromatin remodeling complex triggers synaptic connectivity in the mammalian brain. Neuron. 2014;83:122-34.

95. Targoff IN, Reichlin M. The association between Mi-2 antibodies and dermatomyositis. Arthritis Rheum. 1985;28:796-803.

96. Targoff IN, Mamyrova G, Trieu EP, Perurena O, Koneru B, O'Hanlon TP, et al. A novel autoantibody to a 155-kd protein is associated with dermatomyositis. Arthritis Rheum. 2006;54:3682-9.

97. Sato S, Hirakata M, Kuwana M, Suwa A, Inada S, Mimori T, et al. Autoantibodies to a 140-kd polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. Arthritis Rheum. 2005;52:1571-6.

98. Sato S, Hoshino K, Satoh T, Fujita T, Kawakami Y, Fujita T. RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: Association with rapidly progressive interstitial lung disease. Arthritis Rheum. 2009;60:2193-200.

99. Fujimoto M, Hamaguchi Y, Kaji K, Matsushita T, Ichimura Y, Kodera M, et al. Myositis-specific anti-155/140 autoantibodies target transcription intermediary factor 1 family proteins. Arthritis Rheum. 2012;64:513-22.

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

101. Mohassel P, Rosen P, Casciola-Rosen L, Pak K, Mammen AL. Expression of the dermatomyositis autoantigen transcription intermediary factor 1γ in regenerating muscle. Arthritis Rheumatol. 2015;67:266-72.

102. Targoff IN, Trieu EP, Levy-Neto M, Fertig N, Oddis CV. Sera with autoantibodies to the MJ antigen react with NXP2. Arthritis Rheum. 2007;56:S787.

103. Valenzuela A, Chung L, Casciola-Rosen L, Fiorentino D. Identification of clinical features and autoantibodies associated with calcinosis in dermatomyositis. JAMA Dermatol. 2014;150:724-9.

104.- Tansley SL, Betteridge ZE, Shaddick G, Gunawardena H, Arnold K, Wedderburn LR, et al. Juvenile Dermatomyositis Research Group. Calcinosis in juvenile dermatomyositis is influenced by both anti-NXP2 autoantibody status and age at disease onset. Rheumatology (Oxford). 2014;53:2204-8.

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

106. Fiorentino DF, Kuo K, Chung L, Zaba L, Li S, Casciola-Rosen L. Distinctive cutaneous and systemic features associated with antitranscriptional intermediary factor-1γ antibodies in adults with dermatomyositis. J Am Acad Dermatol. 2015 ;72:449-55.

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

108. Reeves WH, Nigam SK, Blobel G. Human autoantibodies reactive with the signal-recognition particle. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83:9507-11.

109. Miller T, Al-Lozi MT, Lopate G, Pestronk A. Myopathy with antibodies to the signal recognition particle: clinical and pathological features. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002;73:420-8.

110. Kao AH, Lacomis D, Lucas M, Fertig N, Oddis CV. Anti-signal recognition particle autoantibody in patients with and patients without idiopathic inflammatory myopathy. Arthritis Rheum. 2004;50:209-15.

111. Hengstman GJ, ter Laak HJ, Vree Egberts WT, Lundberg IE, Moutsopoulos HM, et al. Anti-signal recognition particle autoantibodies: marker of a necrotising myopathy. Ann Rheum Dis. 2006;65:1635-8

112. Targoff IN, Johnson AE, Miller FW. Antibody to signal recognition particle in polymyositis. Arthritis Rheum. 1990;33:1361-70.

113. Valiyil R, Casciola-Rosen L, Hong G, Mammen A, Christopher-Stine L. Rituximab therapy for myopathy associated with anti-signal recognition particle antibodies: a case

series. Arthritis Care Res. 2010;62:1328-34.

114. Watanabe Y, Suzuki S, Nishimura H, Murata KY, Kurashige T, Ikawa M, et al. Statins and myotoxic effects associated with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase autoantibodies: an observational study in Japan. Medicine (Baltimore). 2015;94:e416.

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

116. Mammen AL, Pak K, Williams EK, Brisson D, Coresh J, Selvin E, Gaudet D. Rarity of anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies in statin users, including those with self-limited musculoskeletal side effects. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012;64:269-72.

117. Allenbach Y, Drouot L, Rigolet A, Charuel JL, Jouen F, et al. French Myositis Network. Anti-HMGCR autoantibodies in European patients with autoimmune necrotizing myopathies: inconstant exposure to statin. Medicine (Baltimore).2014 ;93:150-7.

118. Musset L, Allenbach Y, Benveniste O, Boyer O, Bossuyt X, Bentow C, et al, Anti-HMGCR antibodies as a biomarker for immune-mediated necrotizing myopathies: a history of statins and experience from a large international multi-center study. Autoimmun Rev. 2016;15:983–993.

119. Mammen AL, Tiniakou E. Intravenous immune globulin for statin-triggered autoimmune myopathy. N Engl J Med. 2015;373:1680–2.

120. Alvarado-Cardenas M, Marin-Sánchez A, Martínez MA, Martínez-Martínez L, Pinal-Fernandez I, Labrador-Horrillo M, et al. Statin-associated autoimmune myopathy: A distinct new IFL pattern can increase the rate of HMGCR antibody detection by clinical laboratories. Autoimmun Rev. 2016;15:1161-66.

121. Larman HB, Salajegheh M, Nazareno R, Lam T, Sauld J, Steen H, et al. Cytosolic 5'-nucleotidase 1A autoimmunity in sporadic inclusion body myositis. Ann Neurol. 2013;73:408-18.

122. Pluk H, van Hoeve BJ, van Dooren SH, Stammen-Vogelzangs J, van der Heijden A, Schelhaas HJ, et al. Autoantibodies to cytosolic 5'-nucleotidase 1A in inclusion body myositis. Ann Neurol. 2013;73:397-407.

123. Greenberg SA. Cytoplasmic 5'-nucleotidase autoantibodies in inclusion body myositis: Isotypes and diagnostic utility. Muscle Nerve. 2014;50:488-92.

124. Amato AA, Sivakumar K, Goyal N, David WS, Salajegheh M, Praestgaard J, et al. Treatment of sporadic inclusion body myositis with bimagrumab. Neurology. 2014;83:2239-46.

125. García-Rodríguez LA, Massó-González EL, Wallander MA, Johansson S. The safety of rosuvastatin in comparison with other statins in over 100,000 statin users in UK primary care. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2008;17:943-52.

126. Joy TR, Hegele RA. Narrative review: statin-related myopathy. Ann Intern Med.

2009 ;150:858-68.

127. Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, et al.; SEARCH Collaborative Group. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy–A geno-mewide study. N Engl J Med. 2008;359:789–99.

128. Needham M, Fabian V, Knezevic W, Panegyres P, Zilko P, Mastaglia FL. Progressive myopathy with upregulation of MHC-I associated with statin therapy. Neuromuscul Disord. 2007;17:194–200.

129. Liang C, Needham M. Necrotizing autoimmune myopathy. Curr Opin Rheumatol. 2011; 23:612–619.

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

131. Mastaglia FL, Phillips BA. Idiopathic inflammatory myopathies: epidemiology, classification, and diagnostic criteria. Rheum Dis Clin North Am. 2002;28:723-41.

132. Liang WC, Uruha A, Suzuki S, Murakami N, Takeshita E, Chen WZ, et al Pediatric necrotizing myopathy associated with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies. Rheumatology (Oxford). 2017;56:287-293.

133. Kawabata T, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, et al. A pediatric patient with myopathy associated with antibodies to a signal recognition particle. Brain Dev. 2012;34:877-80.

134. Rouster-Stevens KA, Pachman LM. Autoantibody to signal recognition particle in

African American girls with juvenile polymyositis. J Rheumatol. 2008;35:927-9.

135. Alshehri A, Choksi R, Bucelli R, Pestronk A. Myopathy with anti-HMGCR antibodies: Perimysium and myofiber pathology. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2015;2:e124.

136. Drouot L, Allenbach Y, Jouen F, Charuel JL, Martinet J, Meyer A, et al. Exploring necrotizing autoimmune myopathies with a novel immunoassay for anti-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase autoantibodies. Arthritis Res Ther. 2014 Feb;16:R39.

137. Magni P, Macchi C, Morlotti B, Sirtori CR, Ruscica M. Risk identification and possible countermeasures for muscle adverse effects during statin therapy. Eur J Intern Med. 2015;26:82-8.

138. Moreno PJ, Grau JM, Milisenda JC, Selva-O'Callaghan A, Losno RA, Jerez A, et al. Clinical presentation and response to treatment of patients with the necrotizing immune-mediated myopathy associated with statins. 13th International Congress on Neuromuscular Diseases. Nice, France, 2014.

139. Mohassel P, Mammen AL. The spectrum of statin myopathy. Curr Opin Rheumatol. 2013;25:747-52.

140. Sahebjam F, Vierling JM. Autoimmune hepatitis. Front Med. 2015;9(2):187-219.

141. Liu ZX, Kaplowitz N. Immune-mediated drug-induced liver disease. Clin Liver Dis. 2002;6:755–774.

142. Russo MW, Hoofnagle JH, Gu J, Fontana RJ, Barnhart H, Kleiner DE, et al. Spectrum of statin hepatotoxicity: experience of the drug-induced liver injury network.

Hepatology. 2014;60:679-86.

143. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J Hepatol. 1999;31:929-38.

144. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. Hepatology. 2008;48:169-76.

145. Grasset L, Guy C, Ollagnier M. Cyclines and acne: pay attention to adverse drug reactions! A recent literature review. Rev Med Interne. 2003;24:305-16.

146. Watkins PB, Seeff LB. Drug-induced liver injury: summary of a single topic clinical research conference. Hepatology. 2006;43:618-31.

147. Björnsson E, Talwalkar J, Treeprasertsuk S, Kamath PS, Takahashi N, Sanderson S. Drug-induced autoimmune hepatitis: clinical characteristics and prognosis. Hepatology. 2010;51:2040–48.

148. Zapata E, Castiella A, Otazua P. Hepatitis autoinmune en Gipuzkoa, Pais Vasco: epidemiologia, indices diagnosticos e impacto de la edad en la histologia. Rev Esp Enferm Digest. 2011;103:137-38.

149. Noël B. Autoimmune disease and other potential side-effects of statins. Lancet. 2004;363:2000.

150. Noël B. Lupus erythematosus and other autoimmune diseases related to statin therapy: a systematic review. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2007;21:17–24.

151. Russo MW, Scobey M, Bonkovsky HL. Drug-induced liver injury associated with

statins. Semin Liver Dis. 2009;29:412-22.

152. Ramos-Casals M, Roberto-Perez-Alvarez, Diaz-Lagares C, Cuadrado MJ, Khamashta MA; BIOGEAS Study Group. Autoimmune diseases induced by biological agents: a double-edged sword? Autoimmun Rev. 2010;9:188-93.

153. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Soto MJ, Cuadrado MJ, Khamashta MA. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2008;22:847-61.

154. Thiéfin G, Morelet A, Heurgué A, Diebold MD, Eschard JP. Infliximab-induced hepatitis: absence of cross-toxicity with etanercept. Joint Bone Spine. 2008;75:737-9.

155. Toscano E, Cotta J, Robles M, Lucena MA, Andrade RJ. [Hepatotoxicity induced by new immunosuppressants]. Gastroenterol Hepatol. 2010;33:54-65.

156. Castiella A, Lucena MI, Zapata EM, Otazua P, Andrade RJ. Drug-induced autoimmune-like hepatitis: a diagnostic challenge. Dig Dis Sci. 2011;56:2501-2.

157. Czaja AJ. Drug-induced autoimmune-like hepatitis. Dig Dis Sci. 2011;56:958-76.

158. Clarke AT, Mills PR. Atorvastatin associated liver disease. Dig Liver Dis. 2006;38:772-7.

159. Perger L, Kohler M, Fattinger K, Flury R, Meier PJ, Pauli-Magnus C. Fatal liver failure with atorvastatin. J Hepatol. 2003;39:1095-7.

160. Desai CS, Martin SS, Blumenthal RS. Non-cardiovascular effects associated with statins. BMJ. 2014;349:g3743.

161. Sreenarasimhaiah J, Shiels P, Lisker-Melman M. Multiorgan failure induced by atorvastatin. Am J Med. 2002;113:348–9.

162. Cueto R, Valdivieso P, Lucena MI, Garcia-Arias C, Andrade RJ, Gonzalez-Santos P. Statins: hepatic disease and hepatotoxicity risk. Open Gastroenterol J. 2008;2:18–23.

163. Pelli N, Setti M, Ceppa P, Toncini C, Indiveri F. Autoimmune hepatitis revealed by atorvastatin. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003;15:921–4.

164. Wolters LM, van Buuren HR. Rosuvastatin-associated hepatitis with autoim- mune features. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005;17:589–90.

165. deLemos AS, Foureau DM, Jacobs C, Ahrens W, Russo MW, Bonkovsky HL. Drug-induced liver injury with autoimmune features. Semin Liver Dis. 2014;34:194-204.

166. Chen GL, Hsiao FY, Dong YH, Shen LJ, Wu FL. Statins and the risk of liver injury: a population-based case-control study. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2014;23:719-25.

167. Harel M, Shoenfeld Y. Predicting and preventing autoimmunity, myth or reality? Ann N Y Acad Sci. 2006;1069:322-45.

168. Goldberg AC, Bittencourt PL, Mougin B, Cançado EL, Porta G, Carrilho F, et al. Analysis of HLA haplotypes in autoimmune hepatitis type 1: identifying the major susceptibility locus. Hum Immunol. 2001;62:165-9.

169. Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Genetic predispositions for the immunological features of chronic active hepatitis. Hepatology. 1993;18:816-22.

170. Czaja AJ, Strettell MD, Thomson LJ, Santrach PJ, Moore SB, Donaldson PT, et al. Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis. Hepatology. 1997;25:317-23.

171. Seki T, Ota M, Furuta S, Fukushima H, Kondo T, Hino K, et al. HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. Gastroenterology. 1992;103:1041-7.

172. Ohmoto K, Yamamoto S. Drug-induced liver injury associated with antinuclear antibodies. Scand J Gastroenterol. 2002;37:1345-6.

173. Sugimoto K, Ito T, Yamamoto N, Shiraki K. Seven cases of autoimmune hepatitis that developed after drug-induced liver injury. Hepatology. 2011;54:1892-3.

174. Nakayama S, Murashima N. Overlap syndrome of autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis triggered by fluvastatin. Indian J Gastroenterol. 2011;30:97-9.

175. Weiler-Normann C, Schramm C. Drug induced liver injury and its relationship to autoimmune hepatitis. J Hepatol. 2011;55:747-9.

176. Lucena MI, Kaplowitz N, Hallal H, Castiella A, García-Bengoechea M, Otazua P, et al. Recurrent drug-induced liver injury (DILI) with different drugs in the Spanish Registry: the dilemma of the relationship to autoimmune hepatitis. J Hepatol. 2011;55:820-7.

177. Heurgué-Berlot A, Bernard-Chabert B, Diebold MD, Thiéfin G. Drug-induced

autoimmune-like hepatitis: a case of chronic course after drug withdrawal. Dig Dis Sci. 2011;56:2504-5.

178. Andrade RJ, Medina-Cáliz I, Stephens C. La hepatotoxicidad recurrente se asocia frecuentemente a manifestaciones de autoinmunidad. Gastroenterol Hepatol. 2013;36:84.

179. Heurgué A, Vitry F, Diebold MD, Yaziji N, Bernard-Chabert B, Pennaforte JL, et al. Overlap syndrome of primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis: a retrospective study of 115 cases of autoimmune liver disease. Gastroenterol Clin Biol. 2007;31:17-25.

180. Leung BP, Sattar N, Crilly A, Prach M, McCarey DW, Payne H, et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. J Immunol. 2003;170:1524-30.

181. Yamagata T, Kinoshita K, Nozaki Y, Sugiyama M, Ikoma S, Funauchi M. Effects of pravastatin in murine collagen-induced arthritis. Rheumatol Int. 2007;27:631-9.

182. Mäki-Petäjä KM, Booth AD, Hall FC, Wallace SM, Brown J, McEniery CM, et al. Ezetimibe and simvastatin reduce inflammation, disease activity, and aortic stiffness and improve endothelial function in rheumatoid arthritis. J Am Coll Cardiol. 2007;50:852-8.

183. Van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Atorvastatin reduces arterial stiffness in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2004;612:1571-5.

184. McCarey DW, McInnes IB, Madhok R, Hampson R, Scherbakov O, Ford I, Capell HA, Sattar N. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. Lancet. 2004;363:2015-21.

185. Chodick G, Amital H, Shalem Y, Kokia E, Heymann AD, Porath A, et al.

Persistence with statins and onset of rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. PLoS Med. 2010;7:e1000336.

186. Tang TT, Song Y, Ding YJ, Liao YH, Yu X, Du R, et al. Atorvastatin upregulates regulatory T cells and reduces clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. J Lipid Res. 2011;52:1023-32.

187. El-Barbary AM, Hussein MS, Rageh EM, Hamouda HE, Wagih AA, Ismail RG. Effect of atorvastatin on inflammation and modification of vascular risk factors in rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2011;38:229-35.

188. Abud-Mendoza C, de la Fuente H, Cuevas-Orta E, Baranda L, Cruz-Rizo J, González-Amaro R. Therapy with statins in patients with refractory rheumatic diseases: a preliminary study. Lupus. 2003;12:607-11.

189. Ferrara DE, Liu X, Espinola RG, Meroni PL, Abukhalaf I, Harris EN. Inhibition of the thrombogenic and inflammatory properties of antiphospholipid antibodies by fluvastatin in an in vivo animal model. Arthritis Rheum. 2003;48:3272-9.

190. Meroni PL, Raschi E, Testoni C, Tincani A, Balestrieri G, Molteni R, et al. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype. Arthritis Rheum. 2001;44:2870-8.

191. Ferrara DE, Swerlick R, Casper K, Meroni PL, Vega-Ostertag ME, Harris EN, et al. Fluvastatin inhibits up-regulation of tissue factor expression by antiphospholipid

antibodies on endothelial cells. J Thromb Haemost. 2004;2:1558-63.

192. Jajoria P, Murthy V, Papalardo E, Romay-Penabad Z, Gleason C, Pierangeli SS. Statins for the treatment of antiphospholipid syndrome? Ann N Y Acad Sci. 2009;1173:736-45.

193. López-Pedrera C, Ruiz-Limón P, Aguirre MÁ, Barbarroja N, Pérez-Sánchez C, Buendía P, et al. Global effects of fluvastatin on the prothrombotic status of patients with antiphospholipid syndrome. Ann Rheum Dis. 2011;70:675-82.

194. Ruiz-Irastorza G, Cuadrado MJ, Ruiz-Arruza I, Brey R, Crowther M, Derksen R, et al. Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: report of a task force at the 13th International Congress on antiphospholipid antibodies. Lupus. 2011;20:206-18.

195. Guyatt GH, Cook DJ, Jaeschke R, Pauker SG, Schünemann HJ. Grades of recommendation for antithrombotic agents: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest. 2008;133:123S-131S.

196. Scoble T, Wijetilleka S, Khamashta MA. Management of refractory anti-phospholipid syndrome. Autoimmun Rev. 2011;10:669-73.

197. Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, et al. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. N Engl J Med. 2009;360:1851-61.

198. Lawman S, Mauri C, Jury EC, Cook HT, Ehrenstein MR. Atorvastatin inhibits autoreactive B cell activation and delays lupus development in New Zealand black/white

F1 mice. J Immunol. 2004;173:7641-6.

199. Aprahamian T, Bonegio R, Rizzo J, Perlman H, Lefer DJ, Rifkin IR, et al. Simvastatin treatment ameliorates autoimmune disease associated with accelerated atherosclerosis in a murine lupus model. J Immunol. 2006;177:3028-34.

200. Ferreira GA, Navarro TP, Telles RW, Andrade LE, Sato EI. Atorvastatin therapy improves endothelial-dependent vasodilation in patients with systemic lupus erythematosus: an 8 weeks controlled trial. Rheumatology (Oxford). 2007;46:1560-5.

201. Shimazu H, Kinoshita K, Hino S, Yano T, Kishimoto K, Nagare Y, et al. Effect of combining ACE inhibitor and statin in lupus-prone mice. Clin Immunol. 2010;136:188-96.

202. Norby GE, Holme I, Fellström B, Jardine A, Cole E, Abedini S, et al. Assessment of Lescol in Renal Transplantation Study Group. Effect of fluvastatin on cardiac outcomes in kidney transplant patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled study. Arthritis Rheum. 2009;60:1060-4.

203. Blankier S, McCrindle BW, Ito S, Yeung RS. The role of atorvastatin in regulating the immune response leading to vascular damage in a model of Kawasaki disease. Clin Exp Immunol. 2011;164:193-201.

204. Naoe S, Takahashi K, Masuda H, Tanaka N. Kawasaki disease. With particular emphasis on arterial lesions. Acta Pathol Jpn. 1991;41:785-97.

205. Hamaoka A, Hamaoka K, Yahata T, Fujii M, Ozawa S, Toiyama K, et al. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on continuous post-inflammatory vascular remodeling

late after Kawasaki disease. J Cardiol. 2010;56:245-53.

206. van Denderen JC, Peters MJ, van Halm VP, van der Horst-Bruinsma IE, Dijkmans BA, et al. Statin therapy might be beneficial for patients with ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis. 2006;65:695-6.

207. Louneva N, Huaman G, Fertala J, Jiménez SA. Inhibition of systemic sclerosis dermal fibroblast type I collagen production and gene expression by simvastatin. Arthritis Rheum. 2006;54:1298-308.

208. Furukawa S, Yasuda S, Amengual O, Horita T, Atsumi T, Koike T. Protective effect of pravastatin on vascular endothelium in patients with systemic sclerosis: a pilot study. Ann Rheum Dis. 2006;65:1118-20.

209. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. Statins as immunomodulators in systemic sclerosis. Ann N Y Acad Sci. 2007;1110:670-80.

210. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. Statins: potentially useful in therapy of systemic sclerosis-related Raynaud's phenomenon and digital ulcers. J Rheumatol. 2008;35:1801-8.

211. Ciurleo R, Bramanti P, Marino S. Role of statins in the treatment of multiple sclerosis. Pharmacol Res. 2014;87:133-43.

212. Musset L, Miyara M, Benveniste O, Charuel JL, Shikhman A, Boyer O, et al. Analysis of autoantibodies to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase using different technologies. J Immunol Res. 2014;2014:405956.

213. Dalakas MC. An update on inflammatory and autoimmune myopathies. Neuropathol

Appl Neurobiol. 2011;37:226-42.

214. Reina S, Passafaro D, Sterin-Borda L, Borda E. Atorvastatin inhibits the inflammatory response caused by anti-M(3) peptide IgG in patients with primary Sjögren's syndrome. Inflammopharmacology. 2012;20:267-75.

215. Palamuthusingam D, Mantha M, Dheda S. HMG CoA reductase inhibitor associated myositis and autoimmune hepatitis. Intern Med J. 2017;47:1213-15.

216. Mammen AL. Statin-associated autoimmune myopathy. N Engl J Med. 2016;374:664–669.

217. Kadoya M, Hida A, Hashimoto Maeda M, Taira K, Ikenaga C, Uchio N, et al. Cancer association as a risk factor for anti-HMGCR antibody-positive myopathy. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2016;3:e290.

218. Hudson M, Luck Y, Stephenson M, Choi MY, Wang M, Baron M, et al. Canadian Scleroderma Research Group (CSRG). Anti-HMGCR antibodies in systemic sclerosis. Medicine (Baltimore). 2016;95:e5280.

7. ANEXO

De esta Tesis Doctoral se desprenden los siguientes estudios publicados en revistas JCR/ISI que se enumeran a continuación.

- Alvarado Cárdenas M, Marín Sánchez A, Lima Ruiz J; en representación del Grupo para estudio de Autoinmunidad y Estatinas. [Statins and autoimmunity]. Med Clin (Barc). 2015;145:399-403.

- Selva-O'Callaghan A, Alvarado-Cardenas M, Marin A, Pinal-Fernandez I. Statins and myositis: the role of anti-HMGCR antibodies. Expert Rev Clin Immunol. 2015;11:1277-9.

- Alvarado-Cardenas M, Marín-Sánchez A, Martínez MA, Martínez-Martínez L, Pinal-Fernández I, Labrador-Horrillo M, et al. Statin-associated autoimmune myopathy: A distinct new IFL pattern can increase the rate of HMGCR antibody detection by clinical laboratories. Autoinmune Rev. 2016 Dec;15(12):1161-1166.

- Selva-O'Callaghan A, Alvarado-Cárdenas M, Pinal-Fernández I, Trallero-Araguás E, Milisenda JC, Martínez MÁ, et al. Statin-induced myalgia and myositis: an update on pathogenesis and clinical recommendations. Expert Rev Clin Immunol. 2018;14:215-224.

Med Clin (Barc). 2015;145(9):399–403

MEDICINA CLINICA

www.elsevier.es/medicinaclinica

Revisión

Estatinas y autoinmunidad

Marcelo Alvarado Cárdenas [a,*], Ana Marín Sánchez [b] y Joan Lima Ruiz [a], en representación del Grupo para estudio de Autoinmunidad y Estatinas [1]

[a] Servicio de Medicina Interna, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España
[b] Servicio de Inmunología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:
Recibido el 12 de noviembre de 2014
Aceptado el 27 de noviembre de 2014
On-line el 7 de febrero de 2015

Palabras clave:
Estatinas
Pleoitrópico
Inmunodepresor
Autoinmunitario

RESUMEN

Las estatinas son los fármacos más utilizados en la prevención tanto primaria como secundaria de enfermedades cardiovasculares y asociadas a aterosclerosis. Alrededor de 25 millones de personas están en tratamiento con estatinas en el mundo. A pesar de que son bien toleradas por la mayoría de los pacientes y de tener un perfil muy seguro, algunos pacientes presentan alteraciones, especialmente a nivel muscular. Los efectos biológicos asociados a estos fármacos son conocidos como pleiotrópicos; son de tal interés y diversidad que explican, en parte, algunas de las acciones de las estatinas, especialmente en relación con la inflamación y el sistema inmunitario. Algunos pacientes presentan ciertas alteraciones inmunológicas que puede transformarse luego en expresión clínica no deseable. Estudios recientes han mostrado que pueden desencadenar fenómenos autoinmunitarios. Han sido descritas enfermedades en las que actúan como desencadenantes, como la miopatía necrosante inmunomediada, o indirectamente en dermatomiositis o hepatitis autoinmunitaria, entre otras. Es así por lo que dado el elevado número de personas en tratamiento con estatinas, creemos que se trata de un problema clínicamente relevante y, por tanto, merecedor de estudio.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Statins and autoimmunity

Keywords:
Statins
Pleiotropic
Immunosuppressive
Autoimmunity

ABSTRACT

Statins are the most widely used drugs for both primary and secondary prevention of cardiovascular diseases and those associated with atherosclerosis. About 25 million people are on statin therapy in the world. Although they are well tolerated by most patients and have a safety profile, some patients have muscle level alterations. The biological effects associated with these drugs are known as pleiotropic; they are of such interest and diversity that explains, in part, some of the actions of statins, especially in relation to inflammation and the immune system. Some patients have certain immune disorders that can turn into an undesirable clinical expression. Recent studies have shown that they can trigger autoimmune phenomena. Pathologies have been described in which these agents act as triggers such as immune-mediated necrotizing myopathy or indirectly in dermatomyositis or autoimmune hepatitis, among others. Given the high number of people being treated with statins, we believe that this is a clinically relevant problem and therefore worthy of study.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR), más comúnmente conocidos como estatinas, son los fármacos más utilizados en el tratamiento de la hipercolesterolemia y en la prevención, tanto primaria como

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: majav2@hotmail.com (M. Alvarado Cárdenas).
[1] Los nombres de los componentes del Grupo para estudio de Autoinmunidad y Estatinas están relacionados en el anexo 1.

http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2014.11.017
0025-7753/© 2015 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Tabla 1
Mecanismos propuestos de los efectos pleitrópicos

Regulación del óxido nítrico sintetasa del endotelio y la mejora de la respuesta fisiopatológica, incluyendo la vasoconstricción y la promoción de reendotelización
Efecto antioxidante a través de la inhibición de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa y su reacción oxidativa
Propiedades antiinflamatorias, incluida la reducción de la proteína C reactiva, la interleucina 6, el factor de necrosis tumoral alfa y el factor k nuclear
Disminución de citocinas y quimiocinas
Estabilización de las placas ateroscleróticas y la inhibición de la inflamación de la placa
Disminución de la activación de la cascada de coagulación
Normalización del tracto de salida simpático
Inducción de la autofagia en la inhibición de la angiogénesis en células de cáncer
Neuroprotección y apoyo de las funciones de barrera hematoencefálica

secundaria, de enfermedades cardiovasculares y asociadas a aterosclerosis. Se estima que alrededor de 50 millones de personas reciben tratamiento con estatinas en el mundo, y podrían ser muchos más en caso de aprobarse las nuevas guías terapéuticas propuestas por algunos organismos internacionales[1,2].

En general, estos fármacos suelen presentar buena tolerancia. Además, en ensayos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, se han encontrado otros efectos biológicos asociados a las estatinas que no están necesariamente relacionados con la reducción del colesterol plasmático, conocidos como efectos pleiotrópicos[3], y que se recogen en la tabla 1. El alcance de estos efectos es de tal interés y diversidad que explica, al menos en parte, algunas de las acciones beneficiosas de las estatinas, especialmente en relación con un posible efecto antiinflamatorio, inmunomodulador, o incluso antitrombótico, así como de potencial utilidad frente a algunas enfermedades crónicas, como la osteoporosis, o las demencias, incluyendo la enfermedad de Alzheimer.

Entre los efectos no esperados de las estatinas se incluyen las consecuencias inmunomoduladoras, objeto de esta revisión[4]. Estos fármacos parecen desempeñar un rol terapéutico coadyuvante en algunas enfermedades autoinmunitarias debido no solo a su posible carácter antiinflamatorio e inmunomodulador, sino también a su capacidad de minimizar el potencial aterogénico tanto de la propia enfermedad como de los fármacos utilizados para su tratamiento, entre los que se encuentran los glucocorticoides[5–7]. Se postula que la capacidad de las estatinas para inhibir la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) de clase II en las células presentadoras de antígeno puede provocar una disminución de la activación de linfocitos Th1 y la inhibición de la secreción de citocinas proinflamatorias[8]. Además, el efecto inmunomodulador de estos fármacos puede depender en parte de la disminución de la respuesta inflamatoria Th17[9] o de su capacidad para activar PPAR (del inglés, *peroxisome proliferator activated receptor*) que interfieren con la vía de activación NF-kB inhibiendo la expresión de diferentes citocinas[10]. Por otra parte, y a pesar de ser fármacos en general bien tolerados y con un perfil favorable de seguridad, algunos pacientes presentan ciertas alteraciones inmunológicas que pueden transformarse luego en expresión clínica no deseable. Estudios recientes han mostrado que pueden desencadenar *(trigger)* fenómenos autoinmunitarios[11]. Han sido descritos como posibles inductores de diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico[12], dermatomiositis (DM)[13–15], hepatitis autoinmunitaria (HAI)[16], vasculitis con *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies* (ANCA, «anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos»)[17], y alteraciones del perfil inmunológico en suero, con o sin expresión clínica acompañante. El mecanismo no está claro, y probablemente no es único; una hipótesis contempla el comportamiento de estos fármacos como agentes proapoptóticos que liberarían antígenos nucleares a la circulación, o determinados cambios moleculares induciendo la producción de autoanticuerpos. El hecho de que el tratamiento inmunodepresor sistémico haya demostrado ser eficaz en algunos de los casos publicados apoya el mecanismo inmunológico. La asociación de estatinas a una miopatía en parte mediada inmunológicamente, la denominada miopatía necrosante inmunomediada (MNIM), parece definir un nuevo modelo de toxicidad, quizás extensible a otros órganos distintos del músculo.

Fenómenos autoinmunitarios

Afectación muscular

La toxicidad muscular es un efecto adverso bien conocido asociado a la administración de estatinas, que en algunos estudios alcanza el 0,4/100.000 personas-año[18]. Sin embargo, no existe un consenso sobre su definición exacta (tabla 2). En cualquier caso, parece que la presencia de mialgias aisladas, elevaciones moderadas de la creatina fosfocinasa (CPK) o la temida y afortunadamente poco frecuente rabdomiolisis con elevación extrema de las CPK y fracaso renal parecen ser los síndromes miopáticos relacionados con la administración de estatinas, a los que hay que añadir la ya mencionada MNIM, en donde parece que el mecanismo patogénico contempla una toxicidad asociada a la presencia de trastornos autoinmunitarios, que incluye la enzima sobre la que actúa la estatina (HMGCR) como fuente antigénica.

Los mecanismos exactos que subyacen a la miopatía con estatinas no son bien conocidos, e incluyen la disminución del colesterol contenido en las membranas de las células musculares, el agotamiento de los isoprenoides (pirofosfato de farnesilo y pirofosfato de geranilo) o de la coenzima Q10 que favorece la disfunción mitocondrial[19]. Asimismo, algunos factores como el consumo de alcohol, el hipotiroidismo, o determinados polimorfismos genéticos pueden desempeñar un papel determinante en la toxicidad muscular[20]. A todos estos mecanismos hay que añadirles

Tabla 2
Definiciones propuestas para la miopatía relacionada con estatinas

Entidad clínica	ACC/AHA/NHLBI	NLA	FDA
Miopatía	Término general que se refiere a cualquier enfermedad de los músculos	Los síntomas de mialgia (dolor muscular o inflamación), debilidad o calambres, además de CPK > 10 veces el LSN	CPK > 10 × SLN
Mialgia	Dolor o debilidad muscular sin elevación de creatina fosfocinasa	Sin datos	Sin datos
Miositis	Síntomas musculares con elevación de la creatina fosfocinasa	Sin datos	Sin datos
Rabdomiolisis	Síntomas musculares con elevación significativa de la creatina fosfocinasa (típicamente > 10 × LSN), y la elevación de la creatinina (por lo general, con orina de color marrón y mioglobina urinaria)	La creatina fosfocinasa > 10.000 UI/l o creatina fosfocinasa > 10 × LSN, además de una elevación de la creatinina sérica o intervención médica con hidratación intravenosa	La creatina fosfocinasa > 50 × LSN y evidencia de daño de órgano, como compromiso renal

ACC/AHA/NHLBI: *American College of Cardiology/American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute*; FDA: *Food and Drug Administration*; LSN: límite superior de la normalidad; NLA: *National Lipid Association*.

la recientemente descrita toxicidad en parte inmunomediada, cuya expresión clínica parece ser la MNIM.

Miopatía necrosante inmunomediada

Distintos grupos de investigadores en enfermedad muscular han descrito una nueva forma de toxicidad muscular relacionada con las estatinas, en donde el sistema inmunológico parece desempeñar un papel importante[21–23]. El interés de esta entidad radica no solo en que el mecanismo patogénico implica al sistema inmunitario y puede ser un modelo a estudiar, sino que también es relevante desde un punto de vista terapéutico, ya que la retirada del fármaco en ocasiones no es suficiente para resolver el cuadro y se precisa una intervención con medicamentos inmunomoduladores sobre el componente inmunopatológico de esta toxicidad.

Needham et al.[21] primero, en Australia, y Grable-Esposito et al.[22] en Boston, posteriormente, identificaron una serie de pacientes que presentaban debilidad muscular, valores elevados de CPK y miopatía necrosante en ausencia de inflamación, y que tenían en común estar en tratamiento con estatinas; este cuadro clínico persistía en algunos pacientes a pesar de la retirada del fármaco, siendo en estos casos necesaria la administración de tratamiento inmunodepresor.

Posteriormente, investigadores del centro para miositis de la Universidad Johns Hopkins en Baltimore (EE. UU.) identificaron un nuevo anticuerpo frente a una molécula de 100-200 kDa en el suero de estos pacientes que en estudios ulteriores pudo ser identificado como la HMGCR, enzima sobre la que actúan las estatinas (anti-HMGCR)[23,24]. Este mismo grupo describió la asociación de estos anti-HMGCR a un HLA característico (DRB1*11:01)[25] y analizó la presencia de este nuevo autoanticuerpo en una muestra poblacional de cerca de 2.000 sujetos tratados con estatinas en la comunidad, y en una cohorte de 51 afectados de hipercolesterolemia familiar grave, con o sin mialgias, encontrando que la positividad para este autoanticuerpo era prácticamente inexistente[26]. Es decir, aun siendo una entidad perfectamente reconocible, su prevalencia en la población global de sujetos que reciben estatinas es baja, estimándose en 1-2 nuevos casos por millón/año[27].

Clínicamente se presenta con debilidad muscular progresiva en cinturas, que puede ser intensa y mialgias intratables, con poca o ninguna afectación sistémica. Los valores de CPK oscilan entre 950 y 45.000 UI/l y los hallazgos electrofisiológicos apoyan el diagnóstico de esta entidad que se confirma mediante la biopsia muscular[28]. La presencia de anticuerpos anti-HMGCR en suero y la asociación al alelo de HLA-DRB1*11:01 apoyan la naturaleza inmunomediada del proceso. Es imprescindible realizar estudios inmunohistoquímicos, ya que la presencia de necrosis muscular diseminada en ausencia de componente inflamatorio, junto con la expresión de antígenos de clase I del HLA en las fibras musculares necróticas y en las que no lo son, confirma el diagnóstico (fig. 1). El reconocimiento de esta MNIM es relevante, ya que en ocasiones no basta con la retirada del fármaco, sino que se debe instaurar el correspondiente tratamiento inmunodepresor, que en la mayoría de los casos es eficaz y permite resolver el cuadro pudiendo retirarse con el tiempo. En general, los valores plasmáticos de anti-HMGCR se correlacionan con los de CPK y con la evolución clínica del cuadro, llegando a negativizarse, de ahí el interés de su determinación precoz para confirmar su positividad[29].

Ante los datos disponibles, se ha planteado que la exposición a estatinas aumentaría la expresión de HMGCR y que esta se acompañaría de una proteólisis aberrante de dicha molécula, con la consiguiente liberación de péptidos proteicos que, a su vez, serían presentados por las células presentadoras de antígeno vía HLA clase II, favoreciendo una respuesta inmunitaria en un contexto de exposición continuada a estatinas. La necrosis muscular inmunomediada derivada de este proceso favorecería la aparición de fibras musculares regenerativas, que es sabido que expresan HMGCR en exceso, frente a la que actuarían los anti-HMGCR, cerrando así el círculo vicioso de lesión por autoinmunidad[27].

Hepatitis autoinmunitaria

La HAI, enfermedad necroinflamatoria crónica de etiología desconocida, caracterizada por la presencia de autoanticuerpos circulantes, globulinas séricas elevadas e infiltración linfoplasmocitaria en el tejido hepático, puede estar desencadenada por diversos factores ambientales, entre ellos, los virus (el sarampión,

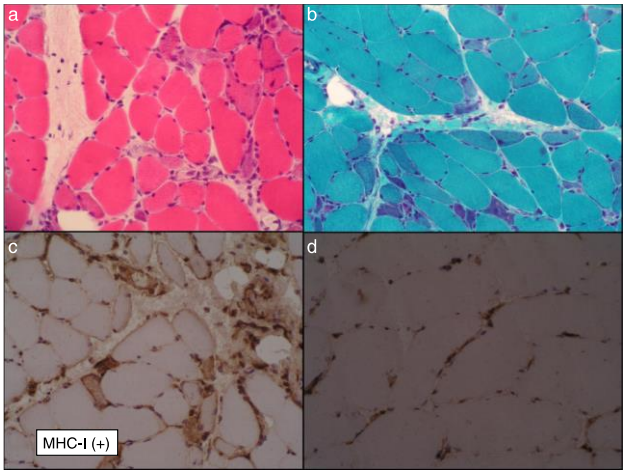


Figura 1. Miopatía necrosante inmunomediada. a) Hematoxilina-eosina. b) Tricrómico de Gomori. c) Tinción inmunohistoquímica con complejo mayor de histocompatibilidad tipo I. d) Control negativo (cortesía del profesor J.M. Grau Junyent, Unitat de Recerca Muscular, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, España).

la hepatitis C y el VHS) y los fármacos (minociclina, hidralazina, procainamida), en pacientes predispuestos genéticamente[30].

La elevación asintomáticas en suero de aminotransferasas es frecuente en pacientes tratados con estatinas, pero la toxicidad hepática grave es rara, y suele producirse a partir de un mecanismo de toxicidad directa sobre los hepatocitos. Sin embargo, se han publicado casos de HAI en relación con la exposición a las estatinas, en general, pocos meses tras su administración, si bien el tiempo de latencia puede ser mayor[31–33]. El mecanismo de producción de esta HAI es poco conocido, pero parecen estar implicadas vías de activación inmunológica que producirían una expansión de linfocitos T $CD8^{+}$, lo que evidencia la participación de las moléculas de clase I del sistema HLA en la presentación del antígeno[34]. De forma similar a lo descrito previamente, el fármaco parecería actuar como desencadenante *(trigger)*, generando toxicidad hepática con presencia de autoanticuerpos, y que persistiría a pesar de la retirada del fármaco[14], siendo preciso, en la mayoría de los casos, administrar tratamiento inmunodepresor para resolver el proceso, escenario muy similar al propuesto en la MNIM.

Otros fenómenos autoinmunitarios asociados a estatinas

Desde la década de los 90 han aparecido publicaciones que relacionan el consumo de estatinas con la aparición de enfermedades autoinmunitarias, como el lupus eritematoso[11,12,35–37], la DM[13–15], las vasculitis[38–41] o la enfermedad pulmonar intersticial.

Quizás la asociación entre el lupus y las estatinas es la que ha sido mejor estudiada, especulándose sobre el papel de determinados antígenos celulares liberados a la circulación mediante apoptosis y los efectos inmunomoduladores de los linfocitos T como mecanismos subyacentes a la aparición del lupus o de manifestaciones similares. Una revisión sistemática de la bibliografía médica durante el período 1966-2005[11] y estudios epidemiológicos amplios de farmacovigilancia[12] parecen encontrar una modesta, pero evidente, asociación entre la exposición a estatinas como desencadenante de la enfermedad.

Asimismo, se han reportado hasta un total de 11 casos de DM en relación con la administración de estatinas[13,15]. Los mecanismos patogénicos implicados son similares a los involucrados en pacientes con lupus. Hay que precisar que estos casos de DM no corresponden al cuadro clínico de MNIM comentado previamente, que está relacionado con la presencia de anticuerpos específicos anti-HMGCR.

La vasculitis inducida por fármacos constituye una entidad bien conocida[38–41]. La hipersensibilidad a ciertos medicamentos se encuentra bien documentada, y entre ellos, hidralazina y propiltiouracilo pueden inducir una vasculitis sistémica con positividad de los ANCA. La mieloperoxidasa, la elastasa y la lactoferrina son las especificidades antigénicas que más a menudo se han asociados a las vasculitis positivas para ANCA inducidas por fármacos. Se han publicado casos que evidencian una clara asociación entre el uso de estatinas y la presencia de vasculitis positiva para ANCA, con la resolución tras la retirada de estos fármacos o el uso de tratamiento inmunodepresor.

En cuanto a la presencia de neumonitis intersticial causada por estatinas, los casos aislados publicados que sustentan esta relación no han podido ser confirmados en algunos estudios de cohortes, por lo que su relación permanece en el terreno de la especulación[42–45].

Conclusiones

Las estatinas siguen siendo los fármacos más eficaces disponibles para el tratamiento de la dislipidemia y cumplen un papel importante en el tratamiento de la aterosclerosis y de sus complicaciones cardiovasculares. Algunos individuos, probablemente con una cierta predisposición genética, presentarán fenómenos y/o enfermedades autoinmunitarias en relación con la administración de estos fármacos, entre los que tiene un protagonismo propio la MNIM.

Es posible que, en individuos genéticamente predispuestos, las estatinas actúen como desencadenantes en algunos casos, actuando como agentes proapoptóticos, que liberan antígenos nucleares al torrente sanguíneo o provocan cambios moleculares susceptibles de inducir la producción de autoanticuerpos. Es frecuente que no baste con la retirada del fármaco, precisando tratamiento inmunodepresor para el control del trastorno autoinmunitario relacionado con las estatinas. La eficacia de este tratamiento es un argumento más a favor de la existencia de un conflicto inmunológico a este nivel.

La entidad descrita recientemente como MNIM con anticuerpos anti-HMGCR en relación con la administración de estatinas es un ejemplo de toxicidad en el que se encuentra implicado el sistema inmunológico, y podría servir de modelo explicativo de algunos fenómenos autoinmunitarios relacionados con las estatinas.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de interés.

Anexo. Grupo para estudio de Autoinmunidad y Estatinas

Xavier Mundet-Tuduri (Unitat de Suport a la Recerca Barcelona Ciutat, IDIAP Jordi Gol, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España); Montserrat Farrús-Palou, Manuel Iglesias-Rodal, Rosa Gimbert-Rafols (Centre d'Atenció Primària El Carmel, Institut Català de la Salut, Barcelona, España); Josep M. Grau Junyent, José Milisenda, Pedro Rodriguez Moreno (Unitat de Recerca Muscular, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, España); M. Ángeles Martínez, Cándido Juárez (Servicio de Inmunología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España); Albert Selva-O'Callaghan, Moisés Labrador Horrillo, Eva Balada, Iago Pinal Fernandez (Servicio de Medicina Interna, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España); Víctor Vargas Blasco (Servicio de Hepatología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España); Ricardo Pujol Borrell (Servicio de Inmunología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España).

Bibliografía

1. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: Prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. Lancet. 2005;366:1267–78.
2. Statins for millions more? Lancet. 2014;383:669.
3. Shovman O, Levy Y, Gilburd B, Shoenfeld Y. Antiinflammatory and immunomodulatory properties of statins. Immunol Res. 2002;25:271–85.
4. Khattri S, Zandman-Goddard G. Statins and autoimmunity. Immunol Res. 2013;56:348–57.
5. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. Nat Med. 2000;6:1399–402.
6. Van Leuven SI, Mendez-Fernandez YV, Stroes ES, Tak PP, Major AS. Statin therapy in lupus-mediated atherogenesis: Two birds with one stone. Ann Rheum Dis. 2011;70:245–8.
7. Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoinmune disease: From protein prenylation to immunomodulation. Nat Rev Immunol. 2006;6:358–70.
8. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach S. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. Nat Med. 2000;6:1399–402. DOI 10.1038/82219.
9. Zhang X, Jin J, Peng X, Ramgolam VS, Markovic-Plese S. Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORC in CD4+ lymphocytes. J Immunol. 2008;180:6988–96.
10. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. Inflamm Res. 2000;49:497–505.

11. Noël B. Lupus erythematous and other autoimmune diseases related to statin therapy: A systematic review. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2007;21:17–24.
12. Moulis G, Béne J, Sommet A, Sailler L, Lapeyre-Mestre M, Montastruc J-L, et al. Statin-induced lupus: A case/non-case study in a nationwide pharmacovigilance database. Lupus. 2012;21:885–9.
13. Zaraa IR, Labbène I, Mrabet D, Zribi H, Chelly I, Zitouna M, et al. Simvastatin-induced dermatomyositis in a 50-year-old man. BMJ Case Rep. 2011. 2011.
14. Khattak FH, Morris IM, Branford WA. Simvastatin-associated dermatomyositis. Br J Rheumatol. 1994;33:199.
15. Vasconcelos OM, Campbell WW. Dermatomyositis-like syndrome and HMG-CoA reductase inhibitor (statin) intake. Muscle Nerve. 2004;30:803–7.
16. Alla V, Abraham J, Siddiqui J, Raina D, Wu GY, Chalasani NP, et al. Autoimmune hepatitis triggered by statins. J Clin Gastroenterol. 2006;40:757–61.
17. Sen D, Rosenstein ED, Kramer N. ANCA-positive vasculitis associated with simvastatin/ezetimibe: Expanding the spectrum of statin-induced autoimmunity? Int J Rheum Dis. 2010;13:e29–31.
18. García-Rodríguez LA, Massó-González EL, Wallander MA, Johansson S. The safety of rosuvastatin in comparison with other statins in over 100,000 statins users in UK primary care. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2008;17:943–52.
19. Joy TR, Hegele RA. Narrative review: Statin-related myopathy. Ann Intern Med. 2009;150:858–68.
20. Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, et al.; SEARCH Collaborative Group. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy–A genomewide study. N Engl J Med. 2008;359:789–99.
21. Needham M, Fabian V, Knezevic W, Panegyres P, Zilko P, Mastaglia FL. Progressive myopathy with upregulation of MHC-I associated with statin therapy. Neuromuscul Disord. 2007;17:194–200.
22. Grable-Esposito P, Katzberg HD, Greenberg SA, Srinivasan J, Katz J, Amato AA. Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins. Muscle Nerve. 2010;41:185–90.
23. Christopher-Stine L, Casciola-Rosen LA, Hong G, Chung T, Corse AM, Mammen AL. A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. Arthritis Rheum. 2010;62:2757–66.
24. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, Rosen P, Rosen A, Doering KR, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. Arthritis Rheum. 2011;63:713–21.
25. Mammen AL, Gaudet D, Brisson D, Christopher-Stine L, Lloyd TE, Leffell MS, et al. Increased frequency of DRB1*11:01 in anti-hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012;64:1233–7.
26. Mammen AL, Pak K, Williams EK, Brisson D, Coresh J, Selvin E, et al. Rarity of anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies in statin users, including those with self-limited musculoskeletal side effects. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012;64:269–72.
27. Mohassel P, Mammen AL. The spectrum of statin myopathy. Curr Opin Rheumatol. 2013;25:747–52.
28. Moreno PJ, Grau JM, Milisenda JC, Selva-O'Callaghan A, Losno RA, Jerez A, et al. Clinical presentation and response to treatment of patients with the necrotizing immune-mediated myopathy associated with statins. 13th International Congress on Neuromuscular Diseases. Nice, France, July 5-10, 2014.
29. Werner JL, Christopher-Stine L, Ghazarian SR, Pak KS, Kus JE, Daya NR, et al. Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. Arthritis Rheum. 2012;64:4087–93.
30. Krawit EL. Autoimmune hepatitis. En: Schiff ER, Sorrel MF, Maddrey WC, eds. Disease of the liver. 9th ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2003. p. 1001–13.
31. Pelli N, Setti M, Ceppa P, Toncini C, Indiveri F. Autoimmune hepatitis revealed by atorvastatin. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003;15:921–4.
32. Wolters LM, van Buuren HR. Rosuvastatin-associated hepatitis with autoimmune features. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005;17:589–90.
33. Lemos AS, Foureau DM, Jacobs C, Ahrens W, Russo MW, Bonkovsky HL. Drug-induced liver injury with autoimmune features. Semin Liver Dis. 2014;34:194–204.
34. Russo MW, Scobey M, Bonkovsky HL. Drug-induced liver injury associated with statins. Semin Liver Dis. 2009;29:412–22.
35. Ahmad S. Lovastatin-induced lupus erythematous. Arch Intern Med. 1991;151:1667–8.
36. Bannwarth B, Miremont G, Papapietro PM. Lupuslike syndrome associated with simvastatin. Arch Intern Med. 1992;152:1093.
37. Khosla R, Butman AN, Hammer DF. Simvastatin-induced lupus erythematosus. South Med J. 1998;91:873–4.
38. Merkel PA. Drugs associated with vasculitis. Curr Opin Rheumatol. 1998;10:45–50.
39. Choi HK, Merkel PA, Walker AM, Niles JL. Drug-associated antineutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis. Arthritis Rheum. 2000;43:405–13.
40. Yokogawa N, Vivino FB. Hydralazine-induced autoimmune disease: Comparison to idiopathic lupus and ANCA-positive vasculitis. Mod Rheumatol. 2009;19:338–47.
41. Haroon M, Devlin J. A case of ANCA-associated systemic vasculitis induced by atorvastatin. Clin Rheumatol. 2008;27 Suppl 2:S75–6.
42. Walker T, McCaffery J, Steinfort C. Potential link between HMG-CoA reductase inhibitor (statin) use and interstitial lung disease. Med J Aust. 2007;186:91–4.
43. Veyrac G, Cellerin L, Jolliet P. A case of interstitial lung disease with atorvastatin (Tahor) and a review of the literature about these effects observed under statins. Therapie. 2006;61:57–67.
44. Fernández AB, Karas RH, Alsheikh-Ali AA, Thompson PD. Statins and interstitial lung disease: A systematic review of the literature and of food and drug administration adverse event reports. Chest. 2008;134:824–30.
45. Saad N, Camus P, Suissa S, Ernst P. Statins and the risk of interstitial lung disease: A cohort study. Thorax. 2013;68:361–4.

Statins and myositis: the role of anti-HMGCR antibodies

Expert Rev. Clin. Immunol. 11(12), 1277–1279(2015)

Albert Selva-O'Callaghan

Author for correspondence: Internal Medicine Department, Vall D'hebron General Hospital, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain
aselva@vhebron.net

Marcelo Alvarado-Cardenas

Internal Medicine Department, Vall D'hebron General Hospital, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Ana Marin

Immunology Department Vall D'hebron General Hospital, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Iago Pinal-Fernandez

Internal Medicine Department, Vall D'hebron General Hospital, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain, and National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Muscle toxicity is a recognized adverse effect of statin use. Recently, a new myositis syndrome was described in association with antibodies directed against the pharmacologic target of statins, anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (anti-HMGCR antibody). The patient's genetic background, characteristic histologic patterns (immune-mediated necrotizing myopathy), and presence of anti-HMGCR antibodies define the syndrome. In most patients, statin discontinuation is insufficient to reverse the myositis symptoms, and immunosuppressive therapy is needed. The mechanisms by which these antibodies may lead to disease are not fully elucidated. Several important questions remain unsolved and warrant further research.

Statins are extensively prescribed lipid-lowering drugs that have contributed to increase survival rates in patients with cardiovascular disease.[1] A major drawback of these useful drugs is muscle toxicity, which affects a considerable number of patients and results in treatment discontinuation in 5–20%.[2] Myalgia, mild serum CK elevation and rhabdomyolysis are well-recognized musculoskeletal manifestations related to administration of these drugs.

Recently, Mammen *et al.* [3] described a new autoantibody directed against the pharmacologic target of statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, known as anti-HMGCR antibody, whose detection enabled identification of a new type of statin-associated myopathy. This condition is characterized by a specific genetic background, recognized as HLA-DRB1*11:01,[4] and a characteristic pathology pattern of scattered muscle necrosis and regeneration, with few endomysial inflammatory infiltrates of CD4+ and CD8+ T cells and plasmacytoid dendritic cells. In addition to these distinctive features, sarcolemmal complement deposition on the surface of non-necrotic muscle fibers, and discrete macrophage infiltrates with MHC-I expression in necrotic and non-necrotic muscle fibers have been observed in these patients. This aggregation of features is described as a statin-associated immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) with anti-HMGCR antibodies. [5] Interestingly, the manifestations of the anti-HMGCR clinical syndrome mainly affect the skeletal muscle; the cutaneous or pulmonary involvement of other major types of inflammatory myopathies is lacking.

Several laboratory techniques have been developed to detect anti-HMCGR antibody, with ELISA, addressable laser bead immunoassay and in-house developed or commercial immunoblotting being the most easily accessible.[6,7] Laboratory technicians should be aware that when anti-HMCGR is determined by ELISA, the test may yield false-positive results in patients with anti-cortactin antibody, another recently described myositis-associated antibody.[8] Therefore, confirmation of positive ELISA results by immunoblotting is mandatory. Immunoprecipitation, the first technique used to detect anti-HMCGR, may have a role for confirmatory purposes, despite its complexity. Indirect immunofluorescence studies seem to show a characteristic pattern and could be used as a general screening method in clinical practice.[6]

EXPERT REVIEWS

KEYWORDS: anti-HMGCR • immune mediated necrotizing myopathy • myalgia • myositis • statins

 © 2015 Taylor & Francis

Anti-HMGCR antibodies enable identification of another type of myopathy that may require immunosuppressive therapy to improve the typical symptoms of severe proximal muscle weakness. Terminating statin administration is usually inadequate, as the muscle damage initiated in the presence of statins may be sustained even after the statin is discontinued, through persistently increased HMGCR expression associated with muscle repair.[3] The seemingly odd persistence of symptoms even after drug removal is not unique to statin-associated IMNM with anti-HMGCR antibodies. In clinical practice, noninflammatory statin myalgia and/or mildly elevated creatine kinase (CK) can also last for a lengthy period after statin discontinuation. This puzzling delay warrants further research into the intrinsic mechanisms of statin-induced muscle toxicity, muscle biology and the pathogenesis of inflammatory muscle disease.

Large epidemiologic studies have demonstrated that neither statin-associated myalgia nor moderately high CK levels (less than fivefold the normal value) without muscle weakness are associated with anti-HMGCR antibodies.[9] Therefore, as occurs with other myositis-specific autoantibodies (e.g., anti-TIF1γ in patients with cancer-associated myositis or anti-MDA5 in clinically amyopathic dermatomyositis with rapidly progressive interstitial lung disease [10]), anti-HMGCR determination delineates a subgroup of patients in which both statin withdrawal and immunosuppressive therapy may be needed to achieve a favorable clinical response.

Interestingly, several other groups around the world, from Europe to Australia, have made similar discoveries related to anti-HMGCR antibodies, although the findings differ due to differences in the study designs and methods used.[11–15] Evidence has emerged of a pathogenic role for anti-HMGCR antibodies, as high levels of these antibodies positively correlate with serum CK value and the severity of muscle weakness.[16] Nevertheless, the mechanism that links autoimmunity to statins has not been entirely clarified by the current hypothesis that statin exposure increases HMGCR expression and may be accompanied by aberrant proteolysis of this molecule. This theory suggests that the protein peptides released as a consequence would be displayed by antigen-presenting cells via HLA class II molecules, thereby promoting an immune response in the context of continuous statin exposure. Immune-mediated muscle necrosis derived from this process could enhance the growth of regenerative muscle fibers, which would consequently express HMGCR in excess; the activity of anti-HMGCR antibodies against this antigen would thus close the vicious circle of injury and autoimmunity.[5]

Most patients with statin-associated IMNM require several lines of immunosuppressive therapy, and often immunosuppression must be maintained over a prolonged period to avoid relapses. It may be possible to wean patients from immunosuppressive therapy after they show an improvement for 6 months to 1 year with treatment. In mild cases, patients occasionally improve spontaneously after statin removal, making administration of immunosuppressive agents unnecessary. Choosing the best therapy or combination of therapies at the right time is a complicated task in this group of patients, and large prospective studies defining the efficacy of available treatments are lacking.

Unexpectedly, 30–50% of patients with anti-HMGCR antibodies and IMNM have never received statins,[3,11] and these patients are reported to be more refractory to immunosuppressive treatment than statin-exposed anti-HMGCR patients. Alimentary sources of statins such as red yeast rice or oyster mushrooms may be the hidden trigger in this subset of patients, but further research is needed to fully understand the specific phenotype of this subgroup. In addition, one recent report has shown that patients with other inflammatory myopathies, such as polymyositis or dermatomyositis (exposed or not to statins), may also develop anti-HMGCR, a finding that also requires further research.[13] It may be that statins act as trigger for autoimmunity that is expressed as IMNM, polymyositis or dermatomyositis, in all cases with positive testing to anti-HMGCR antibodies. The presence of microvascular deposition of membrane–attack complex in some patients further argues for this possibility.[15]

Nevertheless, the major contribution of anti-HMGCR antibody from the clinician's viewpoint is that it enables identification of a group of patients who may benefit from immunosuppressive therapy in the appropriate clinical scenario (high pretest probability). This scenario would include subacute proximal muscle weakness in a patient treated with statins and having the typical genetic background (HLA-DRB1*11:01), with muscle biopsy showing muscle fiber necrosis, minimal inflammation and MHC-I expression in necrotic and non-necrotic fibers (features of IMNM).

Several questions remain to be solved. What triggers IMNM in anti-HMGCR-positive patients who have not been exposed to statins? Why are these patients refractory to treatment? What is the best treatment or combination of treatments for these patients? And, in patients at high cardiovascular risk (e.g., recent myocardial infarction), is it feasible to administer statins again? What would be the benefit–risk ratio?

These and other questions that will undoubtedly arise over time can only be answered through large prospective patient series from different centers and countries. Therefore, physicians devoted to the study of these fascinating rare diseases should seize the opportunity to join in an effort that will lead to a better understanding of these conditions. The time is right, so let's do it!

Acknowledgments

The authors would like to thank Cassie Parks for her critical reading and suggestions.

Financial & competing interests disclosure

This study was funded in part by a grant from the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs (PI15-02100). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

1. Statins for millions more?. Lancet. 2014;383:669.
2. Bruckert E, Hayem G, Dejager S, et al. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients—the PRIMO study. Cardiovascular Drugs Ther. 2005;19:403–414.
3. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. Arthritis Rheum. 2011;63:713–721.

** **A seminal paper that identifies for the first time the anti-HMGCR antibodies and helps to clarify the disease mechanism and facilitate diagnosis.**

4. Mammen AL, Gaudet D, Brisson D, et al. Increased frequency of DRB1*11:01 in anti-hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012;64:1233–1237.
5. Mohassel P, Mammen AL. The spectrum of statin myopathy. Curr Opin Rheumatol. 2013;25:747–752.
6. Musset L, Miyara M, Benveniste O, et al. Analysis of autoantibodies to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase using different technologies. J Immunol Res. 2014;2014:405956.
7. Drouot L, Allenbach Y, Jouen F, et al. Exploring necrotizing autoimmune myopathies with a novel immunoassay for anti-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase autoantibodies. Arthritis Res Ther. 2014;16:R39.
8. Labrador-Horrillo M, Martínez MA, Selva-O'Callaghan A, et al. Identification of a novel myositis-associated antibody directed against cortactin. Autoimmun Rev. 2014;13:1008–1012.
9. Mammen AL, Pak K, Williams EK, et al. Rarity of anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies in statin users, including those with self-limited musculoskeletal side effects. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012;64:269–272.
10. Hoshino K, Muro Y, Sugiura K, et al. Anti-MDA5 and anti-TIF1-gamma antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. Rheumatology (Oxford). 2010;49:1726–1733.
11. Allenbach Y, Drouot L, Rigolet A, et al. Anti-HMGCR autoantibodies in European patients with autoimmune necrotizing myopathies: inconstant exposure to statin. Medicine (Baltimore). 2014;93:150–157.
12. Watanabe Y, Suzuki S, Nishimura H, et al. Statins and myotoxic effects associated with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase autoantibodies: an observational study in Japan. Medicine (Baltimore). 2015;94:e416.
13. Limaye V, Bundell C, Hollingsworth P, et al. Clinical and genetic associations of autoantibodies to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase in patients with immune-mediated myositis and necrotizing myopathy. Muscle Nerve. 2015;52:196–203.
14. Ramanathan S, Langguth D, Hardy TA, et al. Clinical course and treatment of anti-HMGCR antibody-associated necrotizing autoimmune myopathy. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2015;2:e96.
15. Chung T, Christopher-Stine L, Paik JJ, et al. The composition of cellular infiltrates in anti-HMG-CoA reductase-associated myopathy. Muscle Nerve. 2015;52:189–195.

* **The authors characterized the cellular infiltrates in muscle biopsies from patients with immune-mediated necrotizing myopathy and anti-HMGCR antibodies.**

16. Werner JL, Christopher-Stine L, Ghazarian SR, et al. Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. Arthritis Rheum. 2012;64:4087–4093.

Autoimmunity Reviews 15 (2016) 1161–1166

Contents lists available at ScienceDirect

Autoimmunity Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev

Review

Statin-associated autoimmune myopathy: A distinct new IFL pattern can increase the rate of HMGCR antibody detection by clinical laboratories

M. Alvarado-Cardenas [a,1], A. Marin-Sánchez [b,1], M.A. Martínez [d], L. Martínez-Martínez [d], I. Pinal-Fernandez [a], M. Labrador-Horrillo [a], E. Balada [a], X. Mundet-Tuduri [e], L. Gonzalez-Mera [f], J. Casademont [g], E. Martínez Acebes [h], P.J. Moreno [i], C. Juarez [d], J.M. Grau-Junyent [i], R. Pujol-Borrell [b,c], A. Selva-O'Callaghan [a,*]

[a] Internal Medicine Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain
[b] Immunology Division, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona, Spain
[c] Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
[d] Immunology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB Sant Pau, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain
[e] Unitat de Suport a la Recerca Barcelona ciutat, IDIAP Jordi Gol, Universitat Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain
[f] Neurology, Hospital de Viladecans, Barcelona, Spain
[g] Internal Medicine, Sant Pau Hospital, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain
[h] Neurology, Hospital Infanta Leonor, Madrid, Spain
[i] Muscle Research Group, Internal Medicine, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Barcelona, and CIBERER, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 July 2016
Accepted 17 July 2016
Available online 15 September 2016

Keywords:
Statin-associated autoimmune myopathy
Myositis
Anti-HMGCR
Immunofluorescence pattern
HALIP pattern
ELISA
Blot

ABSTRACT

Background and objective: Statin-associated autoimmune myopathy (SAAM) with anti-HMGCR antibodies has recently been described. Several specific immunoassays are in use to detect HMGCR antibodies. In the course of systematic autoantibody screening we recognized a new distinct IFL staining pattern on rat liver sections that regularly coincided with anti-HMGCR antibodies. In this study we investigated whether this new IFL pattern is specifically associated to statin-associated autoimmune myopathy and corresponds to anti-HMGCR antibodies.
Patients and methods: Twenty-three patients positive for anti-HMGCR antibodies (14 diagnosed with SAAM) were investigated for anti-HMGCR antibodies by two ELISA assays and confirmed by immmunoblot. HMGCR associated liver IFL pattern (HALIP) was detected by indirect IFL and the reactivity against HMGCR was confirmed by immunoabsorption using purified human HMGCR antigen. 90 patients with other autoimmune diseases and 45 non-autoimmune statin treated patients were studied as controls.
Results: 21 out of 23 (91%) anti-HMGCR positive patients were HALIP positive. The staining was completely and specifically removed by immunoabsorption with human purified HMGCR. None of the control sera from autoimmune patients or non-autoimmune statin treated subjects was positive for HALIP. Statistical concordance between HALIP and anti-HMGCR antibody specific tests was 98.7%, kappa 0.95.
Conclusions: A new and distinct IFL staining pattern (HALIP) is associated to HMGCR associated myopathy. Absorption and concordance studies indicate that the antigen recognized in the liver by HALIP is HMGCR or a closely related protein. Awareness of this new pattern can help to detect HMGCR autoantibodies in statin treated patients tested for autoimmune serology.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 1162
2. Patients and methods . . . 1162
2.1. Patients . . . 1162
2.2. Methods . . . 1162
2.2.1. Anti-HMGCR antibody detection . . . 1162
2.2.2. IFL on kidney/stomach/liver and on HEp-2 substrates . . . 1163

* Corresponding author at: C/Siracusa n° 12 bis "A", Barcelona 08012, Spain.
E-mail address: aselva@vhebron.net (A. Selva-O'Callaghan).
[1] Both authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.005
1568-9972/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

2.2.3. Immunoabsorption experiment . . . 1163
2.2.4. Statistical analysis . . . 1163
3. Results . . . 1164
3.1. Clinical features of patients with anti-HMGCR associated myopathy . . . 1164
3.2. IFL on kidney/stomach/liver and on HEp-2 substrates . . . 1164
4. Discussion . . . 1164
Take-home messages . . . 1166
Contributors . . . 1166
Funding . . . 1166
Acknowledgments . . . 1166
References . . . 1166

1. Introduction

Inflammatory myopathies comprise a group of systemic autoimmune diseases affecting proximal muscles that are characterized by an inflammatory infiltrate [1]. It is generally accepted that dermatomyositis (DM), polymyositis (PM) and sporadic inclusion body myositis are members of the group. A fourth subtype with few scattered inflammatory cells and high degree of necrosis designated immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) is also included by most authors in this group [1,2].

IMNM has been associated with malignancy, connective tissue diseases and recently, with exposure to statins [2–4]. Statins seem to act as a trigger for a specific type of IMNM characterized by autoantibodies directed against 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR), the rate-limiting enzyme in cholesterol synthesis [5]. HMGCR-associated myopathy has shown a strong association with HLA-DR11 allele and can benefit from immunosuppressive therapy [4,6]. Although the immunoprecipitation assay is still considered the gold standard for the detection of these anti-HMGCR antibodies, ELISAs, addressable laser bead immunoassay and immunoblot tests have been recently developed and made commercially available [7].

Indirect immunofluorescence (IFL) is the most widely used test for autoantibody screening [8]. A combination of rat stomach, liver and kidney is the usual substrates (rat triple tissue). Antinuclear, antimitochondrial, anti-liver-kidney microsome (LKM), anti-smooth muscle and anti-gastric parietal cell autoantibodies are the main autoantibodies detected. In the course of routine autoantibody screening on rat triple tissue sections we have recognized an IFL staining pattern on rat liver that we could not ascribe to known patterns, regularly coexisted with HMGCR antibodies and all corresponded to patients with statin associated autoimmune myopathy. We report here that this IFL staining pattern on rat liver correlates very closely with HMGCR antibodies and may provide a new tool for the screening for HMGCR antibodies.

2. Patients and methods

2.1. Patients

The study included 23 patients positive for anti-HMGCR antibodies, 14 of them diagnosed with statin associated autoimmune myopathy (1 PM, 1 DM, 12 IMNM), 3 diagnosed with autoimmune myopathy (1 PM, 2 IMNM) without known exposure to statins, and 6 patients whose sera were referred the immunology laboratory but lacking clinical and anatomopathological information. A total of 90 patients diagnosed of other autoimmune diseases (systemic lupus erythematous, autoimmune hepatitis, systemic sclerosis, Sjøgren syndrome, rheumatoid arthritis and dermatomyositis), and 45 patients treated with statins and not suffering from autoimmune medical conditions were also included in the study as controls (patient flow chart is shown in Fig. 1).

All the patients diagnosed with systemic autoimmune diseases were followed at the Vall d'Hebron General Hospital in Barcelona (Spain) between 1983 and 2016. All patients and controls included in the study gave informed consent for the use of their sera for research purposes.

Statin associated myopathy included patients with exposure to statins, positive anti-HMGCR antibodies and IMNM, PM or DM. Diagnostic criteria for IMNM were based on the diagnosis of IMNM diagnostic and classification criteria proposed by the Muscle Study Group/European Neuro Muscular Centre (MSG/ENMC) [9]. The diagnosis of dermatomyositis/polymyositis was based on the criteria of Bohan and Peter [10,11] and only patients with definite or probable disease were included in this study.

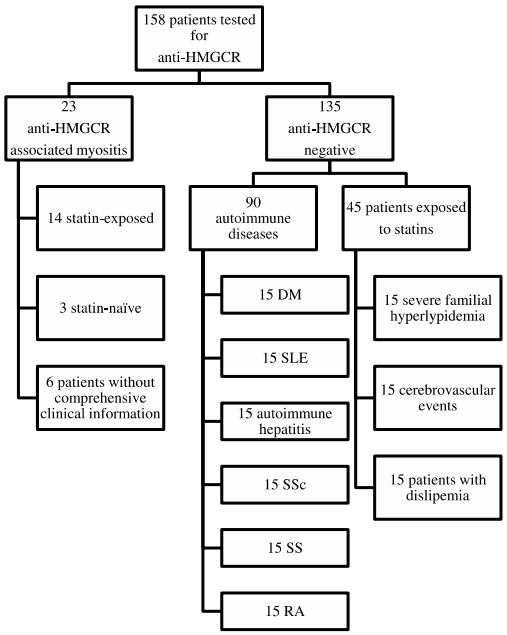
Clinical data was obtained using a standardized questionnaire, comprehensive physical examination, and a systematic chart review. Demographic data, signs and symptoms of the disease, clinical course, number and type of treatments were also recorded. Treatment response was defined as complete if the patient recovered totally without evidence of active disease (including normal CK level), no response if there was no evidence of clinical improvement and persistently high CK values and partial if partial, in the rest of the cases. Subjects' written consent was obtained in accordance to the Declaration of Helsinki [12].

2.2. Methods

2.2.1. Anti-HMGCR antibody detection

Anti-HMGCR antibodies were measured by two ELISA tests (one home-made, one commercial) and confirmed by immunoblot.

2.2.1.1. In house ELISA test. Briefly, wells of a 96-well polystyrene high binding microtiter plate (Costar, Cambridge, MA, USA) were coated with 50 μl of PBS containing 100 ng of purified HMGCR (Sigma, St. Lois, MO, USA) or with PBS alone, to measure non-specific binding for each sample. Plates were wrapped in aluminium foil and incubated overnight at 4 °C. After washing twice with PBS/0.05% Tween 20 (washing solution), blocking was performed with 200 μl of blocking buffer [PBS/0.05% Tween 20/2% bovine serum albumin (Sigma)]. Plates were incubated 1 h at room temperature; afterwards, two washes with the washing solution were performed. Sera (50 μl diluted at 1:400 in blocking buffer) were added in duplicate (as well as to the well which did not contain the antigen) and were incubated for 1 h at 37 °C. After six washes, plates were incubated for 30 min. at 37 °C with 50 μl of horseradish peroxidase-labelled goat anti-human IgG (γ-chain specific) antibody (Sigma) (1:10,000 in blocking solution). After washing six times, colour was developed with 50 μl of TMB substrate reagent (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Plates were kept for 30 min at 37 °C and then 50 μl of a solution of 2 N H_2SO_4 were added to stop the reaction. The reaction was read as Optical Density (OD) at 450 nm in a spectrophotometer (Lab systems iEMS reader MF, Barcelona, Spain). Non-specific background OD (wells without the antigen) was subtracted from the corresponding tested sample. A positive reference sample (kindly provided by Dr. Andrew Mammen) was included in each plate. The cut-off point for positivity on ELISA was established at two SD above the mean value obtained in a sample of 50 healthy control serums (blood donors).



SAAM: statin-associated autoimmune myopathy; DM: dermatomyositis; PM: polymyositis; SLE: systemic lupus erithematosus; SSc: systemic sclerosis; SS: Sjögren syndrome: RA: rheumatoid arthritis

Fig. 1. Patient flow chart.

2.2.1.2. Commercial ELISA. HMCGR antibodies were measured in the same samples using the QUANTA Lite HMGCR kit (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. A sample was considered positive when more than 20 units were detected.

2.2.1.3. Confirmation by immunoblotting. Briefly, 5 μg of HMGCR catalytic domain human, recombinant GST fusion protein expressed in *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were run on 4% to 12% polyacrylamide-SDS minigels with MOPS running buffer, and western blot was performed on a nitrocellulose membrane using the Invitrogen NuPAGE (Carlsbad, CA) electrophoresis system, as previously described [13,14]. Nitrocellulose was cut into several strips and incubated for 1 h at room temperature (RT) in PBS containing 3% non fat dry milk (blocking buffer). Each strip was then incubated with the corresponding human serum sample diluted 1:100 in blocking buffer for 1 h at RT. After washing, phosphatase alkaline-labelled goat anti-human immunoglobulin antibody (Invitrogen, Frederick, MD) was added to each strip which were incubated for 1 h at RT. Colour development was performed in phosphatase reagent (BCIP/NBT, PR omega, Madison, WI). Based on signal intensity, the results were classified into negative or positive.

2.2.2. IFL on kidney/stomach/liver and on HEp-2 substrates

For the IFL on tissue or cells we used ready-made multispot slides from commercial sources i.e., cryostat triple tissue sections (rat liver, kidney and stomach) and fixed HEp-2 cells (Nova Lite range of reagents, Inova Diagnostics). We also tested substrates from other suppliers (Euroimmune, BioSystems, and Aeskulides) in order to rule out artefacts generated during the preparation of the substrates. To develop the reaction we used a goat anti-human IgG FITC labelled serum (INOVA). Slides were stained using an automatic processor (QUANTA-Lyres® INOVA) according to the manufacturer's instructions.

Briefly, sera from patients and controls were diluted in PBS at 1/40 for the rat triple tissue staining and at 1/80 for the HEp2-human cells staining. Multispot slides were incubated with 40 μl of prediluted sera for 30 min at room temperature. After 3 washes with PBS, 40 μl of the FITC conjugated serum was added, incubated for another 30 min and after several washing steps slides were mounted in buffered glycerol with anti-fade and examined under a UV-light microscope (Nikon eclipse 50i).

All the sera (both positive and negative for anti-HMGCR autoantibodies) were tested blindly using this technique at two different laboratories, at the Vall d'Hebron Immunology Department, and at the Immunology Department of the Sant Pau Hospital.

2.2.3. Immunoabsorption experiment

Immunoabsorption experiments were performed in 5 patients with a positive IFL pattern by using HMGCR human antigen (Sigma, St. Lois, MO, USA) diluted in PBS with 10% foetal bovine serum at the following increasing antigen concentrations (0.33, 0.84, 1.64, 3.37, 6.74 and 10.37 μg/ml). We used as controls an anti-HMGCR negative healthy human sera, and two sera positive for anti-mitochondrial antibodies and anti-gastric parietal cell antibodies respectively.

2.2.4. Statistical analysis

Dichotomous variables were expressed as percentages and absolute frequencies, and quantitative features were reported as means and standard deviations (SD). Creatine kinase (CK) level, a highly positively

skewed variable, was expressed as median, first, and third quartile (Q1–Q3).

The Kappa statistic was used to assess agreement both between ELISA methods for detecting anti-HMGCR antibodies and also between HALIP and the anti-HMGCR antibodies measured by ELISA. Analyses were performed with Stata, version 14.0 (StataCorp).

3. Results

3.1. Clinical features of patients with anti-HMGCR associated myopathy

Detailed clinical data and follow-up were available for 17 patients with HMGCR-associated myopathy. Among these 17 patients (41% women), 14 were exposed to statins at the onset of the disease (82%) and 88% (n = 15) showed an immune mediated necrotizing myositis in the muscle biopsy (with the other two patients showing features compatible with an unspecified PM and DM). Mean age was 63 years-old (SD 18 years) and median CK was 6941 IU/l (Q1-Q3 6428–9596 IU/l). Data from patients exposed to statins whose clinical characteristics were available is summarized in Table 1. Concordance between our in house ELISA and the commercial ELISA (QUANTA Lite assays, INOVA Diagnostics) showed a very high reproducibility (overall agreement 97%, Kappa 0.9).

3.2. IFL on kidney/stomach/liver and on HEp-2 substrates

Anti-HMGCR positive sera stained scattered hepatocytes with a centro-lobular distribution. The staining was confined to the cytoplasm and spared clearly the nuclei (Fig. 2). No more than 10% of the hepatocytes were stained in a given liver lobule (zone 3 of the lobule around/near the centrilobular hepatic veins). The bile duct, the endothelium and the cells in the sinusoids were not stained. This pattern was clearly different from the patterns produced by anti-mitochondrial, anti-liver-kidney-microsomal or LC1 antibodies usually seen using this technique. Stomach and kidney did not show any characteristic pattern (see Fig. 3, a to d). Most (21 out of 23 [91%]) sera from patients with anti-HMGCR (14 out of 14 [100%] diagnosed with SAAM) were positive for this IFL pattern and thus we named it anti-HMGR Antibody Associated Liver IFL Pattern (HALIP). The sera from the 90 patients from the autoimmune systemic disease group or from the 45 non-autoimmune patients treated with statins did not produce this distinct IFL pattern. The overall agreement between HALIP and ELISA results confirmed by blot was 99% (Kappa 0.95). HALIP pattern was recognized independently by experienced technical staff at two immunology laboratories (Vall d'Hebron Hospital and at the Sant Pau Hospital) showing perfect agreement. Immunoabsorption study showed that HALIP was specifically removed by incubation with the human purified antigen, confirming the reactivity of the autoantibodies against anti-HMGCR antigen (see Fig. 4). This highly specific IFL pattern was observed irrespective of the commercial source of the triple tissue multispot slides (see Fig. 3). On human HEp-2 cells a granular cytoplasmic fluorescence pattern was observed in only 6 out of 23 (35%) patients, which gives a rather poor concordance with ELISA results confirmed by blot and with HALIP (overall agreement less than 35% for both).

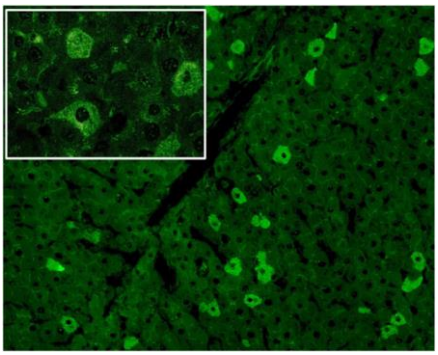


Fig. 2. The HALIP staining. Indirect immunofluorescence on rat liver cryostat section. Patient serum was followed by FITC anti-IgG antisera (for detail see methods). The image was obtained with a spectral confocal microscope FV1000 (Olympus). Notice the clear cytoplasmic staining in distinct scattered hepatocytes, with a granular texture in the inset (original magnification ×200 in the main picture and ×1000 in the inset).

4. Discussion

Autoantibodies to HMGCR are the signature of a specific type of myositis, HMGCR-associated myositis. In this article we report a new and distinctive IFL pattern, HALIP, that is easily detected on the

Table 1
Clinical features of the 14 patients with statin-associated myopathy and anti-HMGCR antibodies.

Case	Age at onset years/sex	Statin use	Anti-HMGCR (HM/Comm)	CK (IU/l)	Muscle biopsy	Proximal weakness	Myalgias	DR11	HALIP	Therapy	Response
1	76/M	Atorvastatin (80 mg/d)	906/>200 U	18,417	DM	(+++)	(++)	(+)	(+)	AZA IVIG	Complete
2	57/F	Atorvastatin (80 mg/d)	918/60 U	2270	IMNM	(+++)	(++)	N/D	(+)	MM IVIG	Complete
3	57/F	Atorvastatin (10 mg/d)	1503/>200 U	3303	IMNM	(+++)	(+)	N/D	(+)	AZA IVIG	Complete
4	52/M	Atorvastatin (20 mg/d)	1312/>200 U	7778	IMNM	(+)	(+++)	(−)	(+)	IVIG	Complete
5	78/F	Atorvastatin (80 mg/d)	997/>200 U	8560	IMNM	(+++)	(+)	(+)	(+)	AZA IVIG	Complete
6[†]	82/M	Atorvastatin (40 mg/d)	896/126 U	8793	IMNM	(+++)	(−)	(+)	(+)	AZA IVIG	Partial
7	73/F	Atorvastatin (80 mg/d)	700/91 U	3304	IMNM	(++)	(−)	(+)	(+)	N/D	Complete
8	67/M	Atorvastatin (20 mg/d)	844/4 U	10,400	IMNM	(+++)	(−)	(+)	(+)	AZA MTX	Partial
9	68/F	Atorvastatin (20 mg/d)	1150/9 U	7200	IMNM	(+++)	(−)	N/D	(+)	AZA MTX	Complete
10	63/F	Sinvastatin (20 mg/d)	884/5 U	11,330	PM	(+++)	(−)	N/D	(+)	AZA MTX IVIG	Complete
11	70/M	Atorvastatin (10 mg/d)	906/90 U	4260	IMNM	(+++)	(−)	N/D	(+)	MTX	Complete
12	69/M	Sinvastatin (20 mg/d)	1184/>200 U	4531	IMNM	(+++)	(++)	N/D	(+)	MTX	Complete
13[&]	55/M	Sinvastatin (20 mg/d)	888/55 U	5187	IMNM	(++)	(−)	N/D	(+)	N/D	Complete
14	76/F	Sinvastatin (40 mg/d)	1217/47 U	12,090	IMNM	(+++)	(+)	N/D	(+)	AZA IVIG	Complete

The cut-off value for a positive result on the home-made (HM) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) antibodies was 0.374 absorbance units (Optical Density: OD. 450 nm; 3 SD above the mean in 50 healthy subjects who had never taken statins); a sample was considered positive when it reached more than 20 units in the commercial assay following the indications of the manufacturer.

[†] Deceased not related to IMNM (heart failure); AZA: azathioprine; CK: Creatine kinase, expressed as IU/l Normal value <195); Comm: Commercial ELISA; DM: dermatomyositis; F: female; HALIP: HMGCR antibody associated liver immunofluorescence pattern; IMNM: immune-mediated necrotizing myopathy; IVIG: intravenous immunoglobulin; M: male; MM: Mofetil Mycophenolate; MTX: methotrexate; N/D: not done; all the included patients except number 8, were also treated with glucocorticoids (prednisone 1 mg/kg/d) decreasing the dose 5 mg/per week until withdrawn.

[&] This patient was rechallenged with rosuvastatin and clinical manifestations resumed.

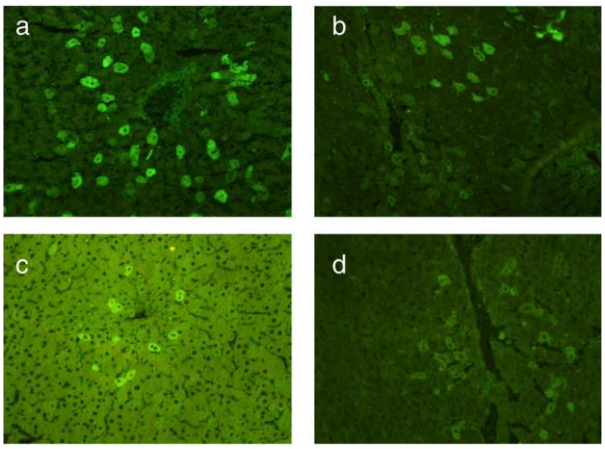


Fig. 3. Anti-HMGCR IFL pattern produced in rat liver by an anti-HMGCR positive serum, using substrate slides from different commercial suppliers. a) Inova Slides. b) Euroimmune. c) BioSystems. d) Aeskulides Diagnostics.

unexpensive standard rat triple tissue auto-immune serology test. The absence of such pattern in patients with other autoimmune diseases or statin-exposed controls indicated that HALIP results identify patients with anti-HMGCR associated myositis reliably compared with the anti-HMGCR auto-antibodies measured by ELISA and confirmed by blot. The immunoabsorption study further confirmed that HALIP recognizes HMGCR in rat tissue.

Taking into account the huge population of patients receiving statins, anti-HMGCR-associated myositis is a rare clinical condition. Its detection is important because early immunosuppressive therapy and/or intravenous immunoglobulin administration may be effective to induce a durable remission [5,15–18]. Accordingly, most of our patients responded to immunosuppression and are now in complete remission.

In our experience, anti-HMGCR autoantibodies are the hallmark of a highly homogeneous disease, the so-called anti-HMGCR associated myopathy, which is triggered by statins, associated to HLA-DR11 and with IMNM biopsy features in elderly patients. But, neither statin exposure, nor the characteristic IMNM biopsy, the HLA or the age of the patient can identify successfully all the patients with the disease. Thus, we consider that the best way to identify this group of patients is based on a thorough assessment of the anti-HMGCR autoantibody status in the presence of enough evidence of an ongoing inflammatory muscle process (using the conventional diagnostic tools suggested by Bohan and Peter [10,11]).

Both statin-exposed and statin-naïve patients were found HALIP positive, suggesting that statin exposure is not required for HALIP

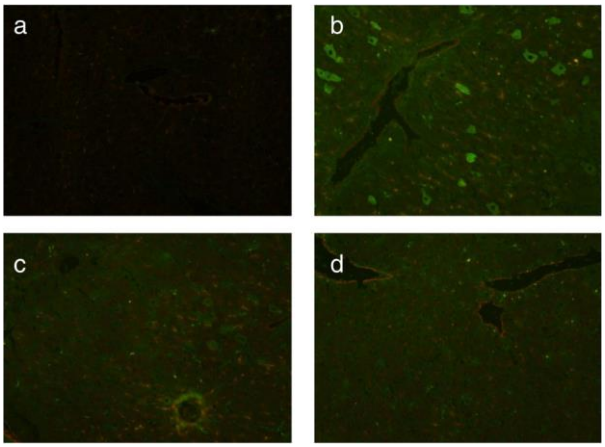


Fig. 4. Immunoabsorption experiment: a) IIF given by an anti-HMGCR negative control sera. b) IIF pattern produced by anti-HMGCR positive serum from patient A. *C. sera* from patient A after immunoabsorption with human antigen HMGCR at concentration of 1.68 μg/m. d) Sera from patient A after immunoabsorption with human antigen HMGCR at concentration of 6.74 μg/ml. (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego Lite @ rat kidney/stomach/liver slides).

induction. Besides, classifying anti-HMGCR associated myositis patients on the basis pharmacologic statin exposure may be misleading, since the so-called statin-naïve patients could have been effectively exposed to statins from non-pharmacological sources (like consumption of red yeast extract or some kinds of mushrooms) exposure to which prior to the disease may be difficult to ascertain.

Knowing that human and rat HMGCR share 93% identity (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) and HMGCR is highly expressed in liver tissue according with Illumina Body Map (https://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-MTAB-513), it is not surprising that human autoantibodies against anti-HMGCR recognize rat HMGCR antigen and thus, can be detected by liver rat IFL. Intriguingly, IFL using HEp-2 cells, in which HMGCR is also strongly expressed, were much less sensitive than rat liver. Most laboratories measure anti-HMGCR antibodies by means of in-house ELISA tests using enzymatic preparations available in the market as antigen. Recently, a commercial ELISA has made this test increasingly available to all laboratories. The IFL pattern that we report here, HALIP, could be of great help in the diagnosis of statin associated autoimmune myopathy because it can be detected by the unexpensive rat triple tissue IFL autoimmune serology which is widely used as a standard technique in most immunology laboratories. Despite this, confirmation of positive results with specific assays will still be required.

In summary, a new distinctive IFL pattern (HALIP) detectable on triple rat IFL autoimmune serology screening is associated with anti-HMGCR autoantibody positivity and statin associated autoimmune myopathy. Awareness of this pattern may help to detect statin associated autoimmune myopathy.

Take-home messages

- A characteristic and specific IFL pattern (HALIP) is herein described. It would help to identify patients with statin-associated autoimmune myopathy in a standard laboratory setting.
- Immunoabsorption and concordance studies indicate that the antigen recognized in the liver by HALIP is HMGCR or a closely related protein.

Contributors

AMS and MAC made the original observation on the HALIP pattern and together with ASOC (guarantor), designed the study. AMS, MAM, LM, and EB, performed the laboratory techniques (ELISA, immunoblot and indirect immunofluorescence). ASOC, JMGJ, PJM, JC, LGM, IPF, and EMA, are responsible for the diagnosis and treatment of the patients with myositis. RP-B contributed to the design of some laboratory tests and to the drafting and revision of the final manuscript. All authors contributed to, and approved, the final manuscript.

Funding

This study was funded in part by a grant from the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs (PI15-02100).

RP-B work is funded by grant PI14/00848 from Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Healt and Social Services of Spain.

Acknowledgments

We are grateful to the Education and and Research in Family Practice Chair (UAB-Novartis) for its support to the study.

References

[1] Dalakas MC. Inflammatory muscle diseases. N Engl J Med 2015;372:1734–47.
[2] Basharat P, Christopher-Stine L. Immune-mediated necrotizing myopathy: update on diagnosis and management. Curr Rheumatol Rep 2015;17:72.
[3] Selva-O'Callaghan A, Alvarado-Cardenas M, Marin A, Pinal-Fernandez I. Statins and myositis: the role of anti-HMGCR antibodies. Expert Rev Clin Immunol 2015;11:1277–9.
[4] Mammen AL. Statin-associated autoimmune myopathy. N Engl J Med 2016;374:664–9.
[5] Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. Arthritis Rheum 2011;63:713–21.
[6] Mohassel P, Mammen AL. Statin-associated autoimmune myopathy and anti-HMGCR autoantibodies. Muscle Nerve 2013;48:477–83.
[7] Musset L, Miyara M, Benveniste O, et al. Analysis of autoantibodies to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase using different technologies. J Immunol Res 2014;405956.
[8] Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol 1989;44:93–151.
[9] Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, et al. 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10–12 October 2003, Naarden, The Netherlands. Neuromuscul Disord 2004;14:337–45.
[10] Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). N Engl J Med 1975;292:344–7.
[11] Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). N Engl J Med 1975;292:403–7.
[12] Vollmann J, Winau R. Informed consent in human experimentation before the Nuremberg code. BMJ 1996;313:1445–9.
[13] Labrador-Horrillo M, Martínez MA, Selva-O'Callaghan A, et al. Anti-TIF1γ antibodies (anti-p155) in adult patients with dermatomyositis: comparison of different diagnostic assays. Ann Rheum Dis 2012;71:993–6.
[14] Labrador-Horrillo M, Martínez MA, Selva-O'Callaghan A, et al. Anti-MDA5 antibodies in a large mediterranean population of adults with dermatomyositis. J Immunol Res 2014;2014:290797.
[15] Limaye V, Bundell C, Hollingsworth P, et al. Clinical and genetic associations of autoantibodies to 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase in patients with immune-mediated myositis and necrotizing myopathy. Muscle Nerve 2015;52:196–203.
[16] Allenbach Y, Drouot L, Rigolet A, et al. Anti-HMGCR autoantibodies in European patients with autoimmune necrotizing myopathies: inconstant exposure to statin. Medicine (Baltimore) 2014;93:150–7.
[17] Ge Y, Lu X, Peng Q, Shu X, Wang G. Clinical characteristics of anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase antibodies in Chinese patients with idiopathic inflammatory myopathies. PLoS One 2015;10:e0141616.
[18] Watanabe Y, Suzuki S, Nishimura H, et al. Statins and myotoxic effects associated with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase autoantibodies: an observational study in Japan. Medicine (Baltimore) 2015;94:e416.

EXPERT REVIEW OF CLINICAL IMMUNOLOGY, 2018
https://doi.org/10.1080/1744666X.2018.1440206

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW

Check for updates

Statin-induced myalgia and myositis: an update on pathogenesis and clinical recommendations

Albert Selva-O'Callaghan[a], Marcelo Alvarado-Cardenas[a], Iago Pinal-Fernández[b,c], Ernesto Trallero-Araguás[d], José Cesar Milisenda[e], María Ángeles Martínez[f], Ana Marín[g], Moisés Labrador-Horrillo[a,g], Cándido Juárez[f] and Josep María Grau-Junyent[e]

[a]Systemic Autoimmune Diseases Unit, Vall d'Hebron General Hospital, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain; [b]National Institutes of Health, Muscle Diseases, NIAMS, Bethesda, MD, USA; [c]Department of Neurology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA; [d]Rheumatology Unit, Vall d'Hebron General Hospital, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain; [e]Internal Medicine Department, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, CIBERER, Barcelona, Spain; [f]Immunology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain; [g]Immunology Department, Vall d'Hebron General Hospital, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Introduction: Musculoskeletal manifestations are well-recognized side effects of treatment with statins. New advances in this field have appeared in recent years. This review focuses on the diagnosis of these conditions and their underlying pathogenesis, in particular immune-mediated necrotizing myopathy.

Areas covered: Clinical phenotypes including rhabdomyolysis, myalgia and/or mild hyperCKemia, self-limited toxin statin myopathy, and immune-mediated necrotizing myopathy are herein described. Therapeutic recommendations and a diagnostic algorithm in statin-associated myopathy are also proposed. The etiology and pathogenesis of statin-induced myopathy has mainly focused on the anti-HMGCR antibodies and the responsibility of the immune-mediated necrotizing myopathy is discussed. The fact that patients who have not been exposed to statins may develop statin-associated autoimmune myopathy with anti-HMGCR antibodies is also addressed. The literature search strategy included terms identified by searches of PubMed between 1969 and December 2017. The search terms 'myositis', 'statin-induced autoimmune myopathy', 'immune-mediate necrotizing myopathy', 'statins', 'muscular manifestations', and 'anti-HMGCR antibodies' were used.

Expert commentary: Full characterization of the known phenotypes of statin toxicity and the specific role of the anti-HMGCR in those exposed and not exposed (i.e. juvenile forms) to statins and in some types of neoplasms is of paramount relevance.

ARTICLE HISTORY
Received 19 December 2017
Accepted 9 February 2018

KEYWORDS
Myositis; statin-induced autoimmune myopathy: immune-mediate necrotizing myopathy; statins; muscular manifestations; anti-HMGCR antibodies

1. Introduction

Drugs that inhibit the enzyme, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), known as statins, are one of the most widely used medications [1]. Statin use is associated with reductions in cardiovascular risk and mortality due to cardiovascular disease [2,3]. However, a well-recognized adverse effect of these drugs is muscle toxicity. Although data from randomized clinical trials suggest that this would not be a significant reason for discontinuing these drugs, patients may show poor adherence to statin regimens because of myalgia and other muscle complaints [4,5].

Currently there is no consensus regarding the terminology physicians should use for the muscle involvement occurring in patients receiving statins. Hence, *myalgia, myositis*, and *myopathy* are used interchangeably, and this adds some confusion to the topic [6–8]. There is some epidemiological evidence that adverse effects of statins on muscle are more common in patients with predisposing factors, such as a history of increased creatine kinase (CK) levels, a family history of myopathy, or a previous diagnosis of neuromuscular diseases or hypothyroidism [8]. Moreover, certain genetic factors may increase the risk of experiencing statin-induced muscle toxicity. One of these is a common single-nucleotide polymorphism in the *SLCO1B1* gene, which is associated with a higher risk of myopathy in patients taking simvastatin, although it is uncertain whether the risk also applies to other statins (e.g. rosuvastatin or atorvastatin) [9].

Several scoring systems have been designed to quantitate the risk of developing statin-associated muscle symptoms and to manage goal-inhibiting statin intolerance [6,10], but in clinical practice, it seems reasonable to work with four separate clinical scenarios that have different diagnostic or treatment implications: rhabdomyolysis, myalgia and mild hyperCKemia, self-limited toxic statin myopathy, and the recently described immune-mediated necrotizing myopathy. This review describes these conditions, the challenges of their diagnosis, and their

CONTACT Albert Selva-O'Callaghan aselva@vhebron.net
© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

pathogenesis, with a particular focus on immune-mediated necrotizing myopathy. Recommendations for clinicians and suggested approaches for managing these patients are discussed.

2. Defining clinical phenotypes

From the clinical viewpoint, patients with statin-associated myopathy can be divided into four groups [11,12]: those with rhabdomyolysis, those with myalgia or mild hyperCKemia (<5.0 times the upper limit of normal), those having self-limited toxic statin myopathy, and those with myositis (i.e. the recently described immune-mediated necrotizing myopathy with anti-HMGCR antibodies).

2.1. Rhabdomyolysis

Rhabdomyolysis, the most severe form of acute muscle disease associated with statins, is fortunately, very rare, affecting less than 1 patient per 100,000 treated per year with these drugs [13]. High CK concentrations (>100-fold the upper limit of normality) are characteristic of rhabdomyolysis, but what defines the syndrome is evidence of myoglobinuria and renal impairment, due to acute tubular necrosis caused by myoglobin precipitation in the renal tubules [14]. Rhabdomyolysis is a life-threatening condition; statins must be discontinued and in most cases, avoided in the future for safety reasons. Dark urine with a positive dipstick test may be mistaken for hematuria. The absence of red cells in the urine sediment supports the diagnosis of myoglobinuria. In severe cases of rhabdomyolysis, muscle weakness may be a cardinal manifestation, but it is usually transitory, disappearing a few days after stopping the drug. Muscle biopsy is not generally indicated, and when it is necessary for diagnostic purposes, it should be performed several weeks or months after the clinical event.

2.2. Myalgia and/or mild hyperCKemia

This mild form of statin-induced muscle toxicity is often seen in clinical practice. Myalgia or muscle pain is the most common symptom and a frequent cause of statin discontinuation. However, in a Cochrane Foundation analysis of 37,939 patients receiving statins in 9 clinical trials [15], only 9.4% (3551 patients) developed symptoms of myalgia, a rate similar to that found in patients receiving a placebo. It has been argued that these studies may be biased, as patients who had developed some type of muscle disease in the past were excluded. Supporting this concept, the prevalence of myalgia in observational studies is higher, close to 20% [8,16–18]. On the other hand, clinicians have to take into account the nocebo effect, meaning the negative expectations of the patient and their doctors regarding muscular manifestations attributed to statins. This nocebo effect may partially explain the muscle aching in absence of biochemical substrate that is detected in observational studies and not in randomized double-blind placebo-controlled trials [19].

Clinically, the pain experienced is usually in the calves and thighs, but it is sometimes diffuse, affecting all muscles. Although myalgia is a cause of statin discontinuation, it is not a life-threatening situation. It can be accompanied by a mild CK elevation, usually reaching less than 1000 IU/L (<5-fold the upper limit of normal), which in itself, is not a mandatory reason for discontinuing statin treatment. Moreover, the outcome of this clinical syndrome is highly variable; it can improve or not after withdrawing the offending drug. Some patients continue experiencing myalgia and/or mild CK elevations even after statins have been stopped, and others improve despite continuation of the drug [20,21].

2.3. Self-limited toxic statin myopathy

Some patients develop toxic myopathy during treatment with statins, a condition that is not immune-mediated. The severity of the presentation varies, with proximal muscle weakness preventing the basic activities of daily living in more severe forms and high CK levels, usually between 10 and 100 times the upper limit of normality (2000–20,000 IU/L). Myalgia is also a common symptom.

Muscle biopsy is usually performed in these patients, although it can be deferred for 4–6 weeks after statin discontinuation while monitoring the patients' clinical evolution. If the clinical complaints progressively improve, muscle biopsy is not necessary. Pathological study shows necrosis and regenerating muscle fibers, but none of the other characteristic immune-mediated features. Nevertheless, it is well-recognized that regenerating muscle fibers can express major histocompatibility complex (MHC) class I, and this may make it difficult to establish whether the pathological findings indicate an immune-mediated phenomenon. Determination of antibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (anti-HMGCR antibodies) [22] is essential to confirm an immune-mediated condition and promptly start immunosuppressive therapy, as patients with self-limited statin toxic myopathy generally test negative to these antibodies [23].

2.4. Immune-mediated necrotizing myopathy and anti-HMGCR antibodies

The last of the four muscle conditions associated with statin treatment, immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM), should be considered a true autoimmune myopathy. Affected patients show progressive proximal muscle weakness involving both limb girdles, CK values between 10 and 100 times the upper limit (2000 and 20,000 IU/L), myopathic electromyography findings, and muscle biopsy usually showing necrosis with regeneration of muscle fibers and scarce inflammation, mainly composed of macrophages [24,25]. Certain immune-mediated features, such as endothelial membrane attack complex (MAC) deposition in non-necrotic fibers and MHC class I expression are additional pathologic features of this condition (Figure 1). One differential characteristic is that statin withdrawal does not usually improve the patient's symptoms.

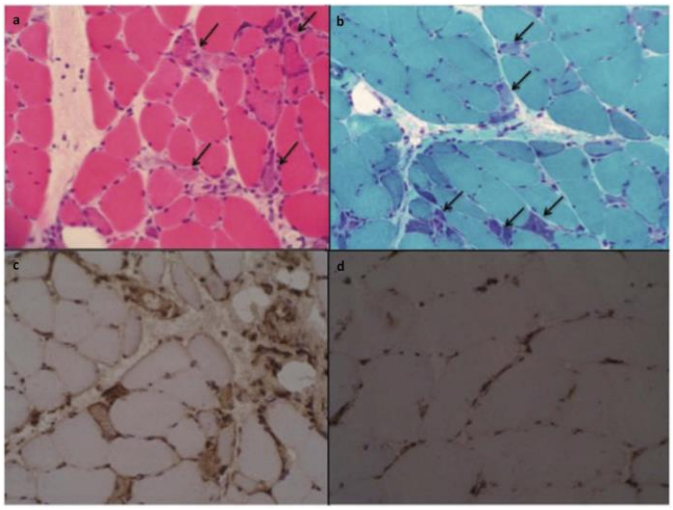


Figure 1. Immune-mediated necrotizing myopathy. Necrotic muscle fiber cells (arrows). (a) Hematoxylin-eosin, (b) Numerous regenerating fibers are seen (arrows). Masson Trichrome. (c) Universal sarcolemmal MHC class I positive (stronger in regenerating cells). (d) MHC class I negative control (positivity only in endothelial cells). All samples are frozen tissue. Published with permission of Elsevier. Original source: Alvarado Cárdenas et al. Med Clin (Barc) [63]. Copyright © 2015 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Immunosuppressive treatment is required to obtain a clinical response.

IMNM was first described by a group of researchers from the Johns Hopkins Myositis Center in Baltimore. The clinical picture was associated with a new autoantibody against a protein doublet of 100–200 kDa detected by immunoprecipitation techniques [24]. Later, the same group identified the protein, HMGCR, as the rate-limiting enzyme in cholesterol synthesis [26]. This form of autoimmune myopathy is now recognized worldwide, with authors from several countries, from Asia to Europe and from the United States to New Zealand, reporting their experience [27–32].

This autoimmune myopathy is rare, with an estimated incidence of 2–3 new cases in every 100,000 patients exposed to statins [33]. In addition, it is associated with a specific immunogenetic background, in which adults often show the human leukocyte antigen (HLA) DRB1*11:01 and children DRB1*07:01 [34,35]. Most patients from the population exposed to statins, and even those with familial hypercholesterolemia receiving high doses of the drug do not develop this clinical picture, and test negative to anti-HMGCR antibodies when screened [36].

Over the years, new and more efficient techniques to detect anti-HMGCR autoantibodies have been developed to replace the expensive and time-consuming immunoprecipitation method [37]. Commercial ELISA or blot tests are easy to perform and work acceptably well. A complementary and even less expensive test to screen for these antibodies is the detection of a characteristic HALIP (**H**MGCR-**A**ssociated **L**iver **I**ndirect immunofluorescence **P**attern), using cryostat triple tissue sections (rat liver, kidney, and stomach), which is subsequently confirmed by ELISA or blotting (Figure 2) [28]. Although immunoprecipitation remains the gold standard technique for detecting anti-HMGCR antibodies, it is now used only for confirmation purposes in rare cases with inconclusive results on other tests.

IMNM has a heterogeneous clinical picture with widely varying degrees of muscle involvement. Occasionally patients may improve after statin withdrawal, but usually they require immunosuppressive treatment. The standard therapy includes various immunosuppressants. Azathioprine and methotrexate are the most common, but other drugs such as calcineurin antagonists (cyclosporine or tacrolimus) and mycophenolate mofetil are being used increasingly more often. A recent study has reported that intravenous immunoglobulin, the only agent with proven effectiveness for treating inflammatory myopathies in a randomized controlled clinical trial [38], seems to be the best option for treating statin-associated immune-mediated necrotizing myopathy [33,39].

Clinicians sometimes encounter patients with aggressive forms of the disease (Figure 3), in which glucocorticoids, intravenous immunoglobulins, and a single immunosuppressive drug do not suffice to improve the condition. In this situation, other drugs such as rituximab or even plasmapheresis may be required for treatment. Patients who do

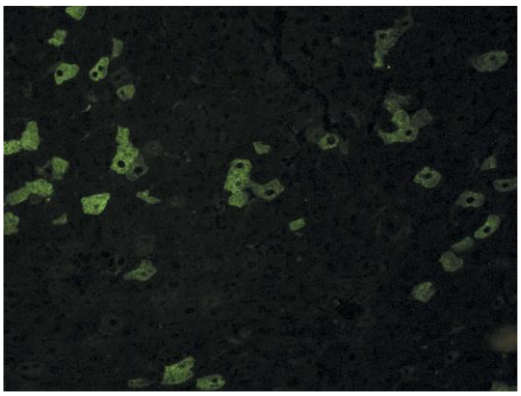


Figure 2. HALIP indirect immunofluorescence pattern on rat liver cryostat section. Confocal microscope FV (Olympus x 200)[27].

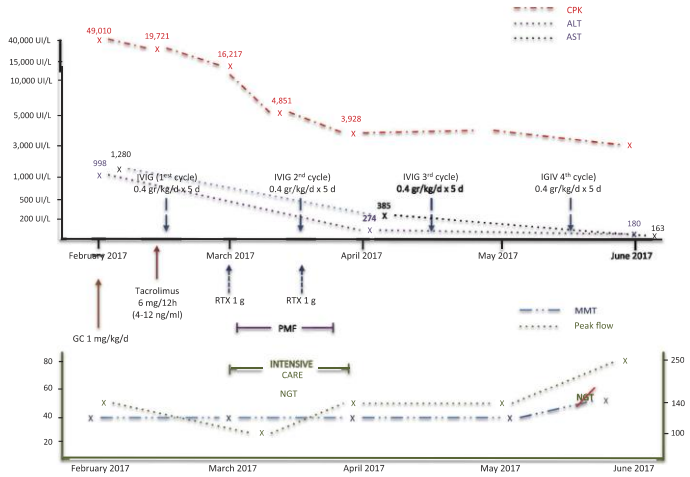


Figure 3. Clinical, functional, and biological evolution of a severe form of IMNM (see description in the text). GC: glucocorticoids, IVIG: intravenous immunoglobulin, MMT: manual muscle test, NGT: nasogastric tube, PMF: plasmapheresis, RTX: rituximab.

not respond well to conventional therapy may develop extremely severe muscle manifestations, which can include severe dysphagia requiring nasogastric tube feeding and dyspnea resulting from diaphragmatic muscle involvement that can lead to respiratory failure.

In muscle biopsy specimens of patients with anti-HMGCR-induced myopathy, the pathological findings predominantly show necrosis with scarce inflammatory infiltrate, as in other immune-mediated necrotizing myopathies. However, in some rare cases, there is a pathological picture of marked inflammation [29,31,40–43]. Furthermore, an unknown myopathy of genetic or metabolic origin is seen in some muscle biopsy analyses of patients with suspected statin-related myopathy, suggesting that the drug may act as a 'trigger' for the condition (unpublished personal observations).

There is a well-known association between cancer and some types of idiopathic inflammatory myositis, including immune-mediated necrotizing myopathy. In some studies, the presence of anti-HMGCR autoantibodies was marginally associated with a higher risk of developing cancer, although the risk was lower than in patients with autoantibody-negative immune-mediated necrotizing myopathy [44]. The risk doubles with anti-HMGCR antibodies, but in

seronegative patients, it is more than eightfold higher than in the general population. Although studies in Japan seem to confirm the association between cancer and anti-HMGCR [45], it is not supported in all publications [31,46].

In the original report describing anti-HMGCR antibodies, most, but not all patients with anti-HMGCR-associated myopathy had been exposed to statins (72.7% of the total) [24]. The percentage of unexposed patients is even higher in other series, such as the largest cohort of European patients, in which 45.6% of patients with anti-HMGCR-associated myopathy were statin-naïve [32]. Furthermore, in recent reports including children with inflammatory myopathy, some of them misdiagnosed as having dystrophy, none of the children had received statins [34,47,48]. Therefore, a relevant question remains: Is the clinical management of anti-HMGCR-associated myopathy the same in patients who have been exposed to statins and those who have not?

3. Etiology and pathogenesis

Statin-induced myopathy encompasses a heterogeneous group of muscle manifestations that have not yet been well characterized. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and several mechanisms derived from impaired mevalonate metabolism, such as isoprenylation of small G-proteins, have been implicated in the mechanism of statin toxicity [49–51].

Genetic susceptibility related to the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the drug is also of paramount relevance in statin-related myopathy. Polymorphisms of the *SLCO1B1* gene are the best-known pharmacokinetic-related alteration, although polymorphisms of other genes have also been described [9]. Regarding pharmacodynamics, certain genetic factors can increase the risk of statin-induced myopathy. Some examples are those associated with plasma membrane calcium transporting ATPase or with mitochondrial energy production regulated by the CoQ2 gene. This gene codes for the coenzyme Q10, known as ubiquinone, which is located in the phospholipid bilayer of mitochondria and is essential for obtaining energy, especially in muscle tissue [8,52].

Recently, a new etiopathogenetic mechanism has been proposed, in which the immune system also plays a role. This is the case of immune-mediated necrotizing myopathy and antibodies against HMGCR, the enzyme that is usually upregulated by statins. Statins upregulate HMGCR and overexpression of this enzyme likely facilitates presentation of highly immunogenic HMGCR peptides by the HLA DRB1*11:01, thus triggering the autoimmune disease [35,53].

In other words, a new paradigm of disease mechanism is elicited. In susceptible patients who have a characteristic HLA or an appropriate genetic background, HMGCR, the molecular target of statins, may trigger the autoimmune phenomenon after some type of interaction with the drug. Once the autoimmune process is started, HMGCR overexpression by statins is not needed to maintain the disease, as regenerating cells naturally express HMGCR [54,55] and will maintain the feed-forward loop of autoimmunity. This pathogenetic model is shown in Figure 4. Anti-HMGCR can be found in muscle cells, and some authors have reported

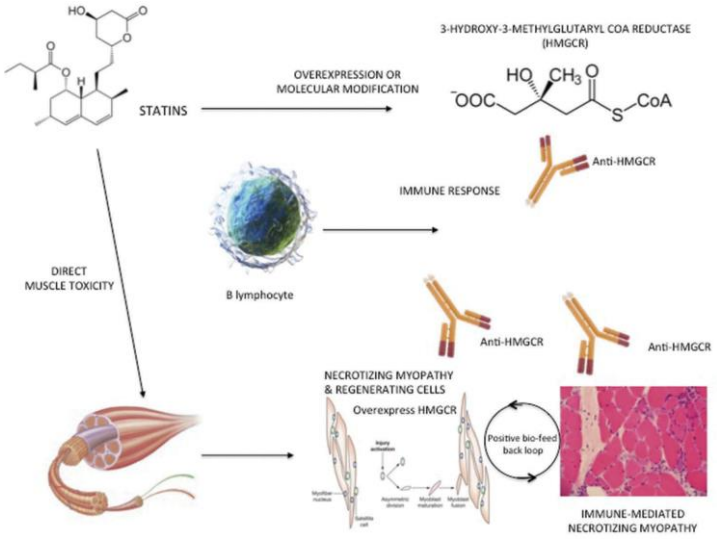


Figure 4. Etiopathogenesis of statin-induced immune-mediated necrotizing myopathy.

that levels of this antibody correlate with the CK concentration and clinical disease activity, thus suggesting a possible role of these antibodies in the pathogenesis of the disease [26,56]. In addition, experimental studies in muscle biopsies of patients with anti-HMGCR have shown that these autoantibodies may impair muscle regeneration and induce muscle atrophy [57].

A challenging scenario is one in which patients who have not been exposed to statins show a full-blown clinical syndrome of immune-mediated necrotizing myopathy and anti-HMGCR antibodies. These patients are usually younger and more difficult to treat [46]. Some authors have proposed that consumption of red yeast rice, *Pu-erh* tea, or food containing certain types of oyster mushrooms, all natural sources of statins, may explain this association. *Monascus purpureus*, a mold traditionally used in East Asia to dye and conserve food, participates in the fermentation of red yeast rice, and gives it the characteristic red color. This mold produces lovastatin in its natural form, the so-called monacolin K, its pharmacologic active compound, and a well-known type of statin [58]. After long-term storage, *Pu-erh tea* is rich in *Aspergillus terreus*, which plays a role in its maturation and specific flavor and is also a source of lovastatin [59]. Of note, the first statin synthesized in 1976 by Akira Endo, a Japanese biochemist, was derived from the fungus species *Penicillium citrinum* [60]. Hence, it is reasonable to suggest that statin-naive patients with anti-HMGCR-associated myositis have somehow been inadvertently exposed to natural sources of statins. The fact that Asian cohorts, where the diet is rich in statin-containing food, show a higher prevalence of statin-naïve anti-HMGCR patients [29,30] also supports this theory, although this could be due in part to the pharmacokinetics differences observed in distinct ethnicities. Epidemiologic studies focused on clarifying this issue would undoubtedly be of great interest.

Also of interest, an indirect immunofluorescence study reported that the characteristic HMGCR-associated immunofluorescence pattern, HALIP, was recognized in rat liver tissue and confirmed by immunoabsorption with human purified HMGCR antigen [28]. This finding prompted us to speculate that the same mechanism of toxicity and immunity could also be the cause of autoimmune hepatitis associated with statin-induced liver toxicity, a rare but well-described condition. This disorder occasionally courses as a self-sustained autoimmune hepatitis that persists even after statins have been stopped, in the same manner as immune-mediated necrotizing myopathy [61–64]. However, on analysis of 30 patients with autoimmune hepatitis and 30 others with primary biliary cholangitis in our center, as well as 1 patient with autoimmune hepatitis showing a tight temporal relationship with initiation of statins (personal observation), anti-HMGCR antibodies tested negative in all cases. To the best of our knowledge only one such a case, which combine IMNM and autoimmune hepatitis, positive to anti-HMGCR, has been published until now [65].

4. Clinical recommendations

A practical approach to establish clinical recommendations regarding the muscle complaints related to statin use takes into account which of the abovementioned phenotypes best fits a given patient. Nevertheless, as a set of general rules, it is recommended to first review the indication for statin use in terms of cardiovascular risk, exclude secondary causes of myopathy such as hypothyroidism or the presence of any well-defined myopathy (e.g. McArdle disease or Steinert myotonic dystrophy), and explore whether a high level of physical activity was related with the patient's signs and symptoms.

In a patient with myalgia, serum CK below 1000 IU/L (<5 times the upper limit of normal), and no muscle weakness on physical examination, it is probably safe to maintain the drug and monitor CK levels, which should be stable or have normalized at the next follow-up visit. If CK values rise to more than 10 times the upper limit, the clinician should assess the risk/benefits of drug withdrawal, although it is probably warranted. As a general rule, in a high-risk patient (e.g. previous myocardial infarction) who has myalgia with normal serum CK values and no muscle weakness, we do not recommend withdrawing statin treatment.

When statin administration is associated with rhabdomyolysis, a severe condition, the advice is clear: withdraw the statin and do not administer it in the future. If such as patient is at high cardiovascular risk, we suggest the use of other, recently approved effective drugs, such as PCSK9 inhibitors [66]. These monoclonal antibodies (e.g. evolocumab, alirocumab, and bococizumab), which act against the proprotein convertase, have proven effective in reducing cardiovascular events and could be an alternative to statin therapy in severe cases of drug toxicity, such as rhabdomyolysis.

It is more difficult to establish clinical recommendations in the other two phenotypes: self-limited toxic myopathy and statin-induced autoimmune myopathy. In the first case, drug withdrawal usually suffices. Muscle biopsy can sometimes be misleading in these patients, and it is important to test for anti-HMGCR autoantibodies to differentiate between the two conditions. If the patient does not improve within 2 weeks after discontinuing the drug and anti-HMGCR antibodies test positive, the diagnosis of immune-mediated necrotizing myopathy is supported and immunosuppressive therapy should be considered. If such a patient is at high cardiovascular risk, clinicians may try to rechallenge the drug, using another statin, a lower dose, or an every-other-day schedule, with strict monitoring of the patient's CK levels and muscle strength. PCSK9 inhibitors may be an alternative option, as their mechanism of action is radically different from that of statins, but there is no experience yet in this clinical scenario. Most of the related recommendations are included in Table 1 and the diagnostic algorithm (Figure 5).

No guidelines are available for the management of statin-induced muscle disorders. The recommendations reported here are based on our personal experience and are fundamentally in accordance with guidelines on statin use endorsed by scientific societies or working groups [6,8].

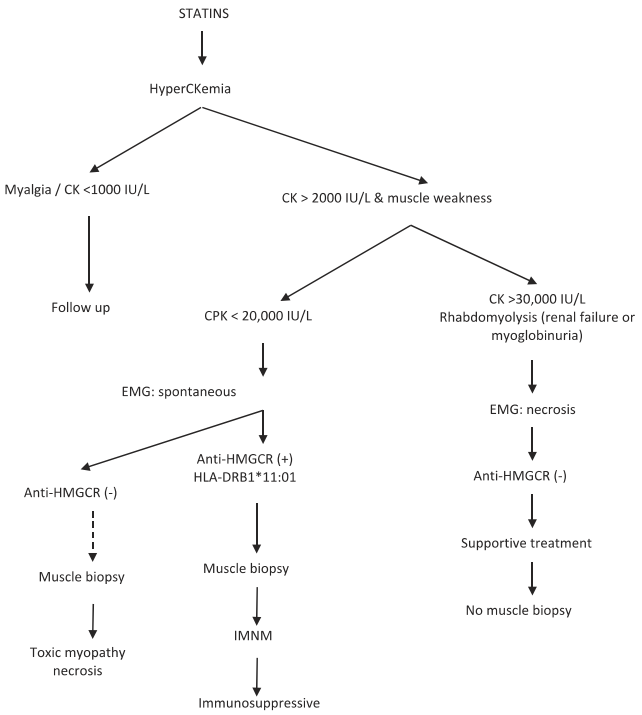


Figure 5. Diagnostic algorithm in statin-associated myopathy. CK: creatine kinase (values are intended to be approximate); EMG: electromyography; HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; IMNM: immune-mediated necrotizing myopathy. Dotted line indicates that muscle biopsy is not always mandatory (see text).

5. Expert commentary

Statin-induced muscle disorders are not rare. It is important to fully characterize the known phenotypes of statin toxicity as well as any new ones that may appear to delineate proper management of each type.

Several questions that are now unanswered will be resolved over the next few years. Epidemiologic studies investigating the role of other sources of statins in patients with anti-HMGCR associated myopathy who have not been exposed to medical statins will help to elucidate the pathophysiologic mechanisms causing this condition. Research will also be done in juvenile and pediatric forms of anti-HMGCR myopathy for this same purpose. The hypothetical relationship with cancer and the appropriate genetic background that contributes to explain why some patients and not others develop the syndrome will be clarified in the near future, perhaps with genome-wide association studies, next-generation sequencing studies, or even epigenetic studies.

Data on the novel toxic-immune disease-causing mechanism will contribute to our understanding of statin-induced muscle disorders and may be applicable to other clinical phenomena and diseases, such as a drug-related liver toxicity and autoimmune hepatitis, and other immune-mediated diseases in which the trigger can be a drug or toxic agent.

Therapeutic guidelines based on evidence-based medicine are lacking for this condition. Randomized, controlled clinical trials are needed to establish appropriate recommendations. Given the rarity of some of these diseases, international initiatives are advocated to join efforts. In the interim, observational studies reporting the experience with different therapeutic strategies are also endorsed.

We should remember that new drugs such as PCSK9 inhibitors have shown great potential in the treatment of high LDL-cholesterol levels and may be a good option for reducing cardiovascular events in patients formerly receiving statins. Time will tell whether statins can be easily substituted by these drugs, and whether both types of treatment can be safely used together to improve the prognosis of patients at high cardiovascular risk.

6. Five-year view

Over the next 5 years, research will help to unravel the epidemiology and the mechanisms that underline those patients

Table 1. A comparison of different statin-induced muscle manifestations.

	Myalgia and/or mild elevated CK	Self-limited toxic myopathy	IMNM	Rhabdomyolysis
Symptoms	Myalgia (++) Muscle weakness (-)	Proximal muscle weakness (++) Myalgia (+)	Proximal muscle weakness (+++) Myalgia (++) Dysphagia (+/++) Ventilatory failure (+/-)	Myoglobinuria Renal failure Muscle weakness (++) Myalgia (++)
Maximum CK (IU/L)	<5 × UNL [<1000 IU/L]	<100 × UNL [<20,000 IU/L]	>10 < 100 × UNL [>2000 < 20,000 IU/L]	>100 × UNL [>20,000 IU/L]
Muscle biopsy	Not mandatory[a]	Myofiber necrosis with no immune findings	Myofiber necrosis MHC class I upregulation MAC deposition on non-necrotic fibers	Massive necrosis[b]
Genetic Background		SNP in *SLCO1B1* gene	HLA-DRB1*11:01	SNP in *SLCO1B1* gene
Anti-HMGCR antibody	Negative	Negative	Positive	Negative
Clinical course after withdrawal	Unpredictable (but good outcome)	Improvement spontaneously	Persistent/progressive weakness	Total recovery[c]
Recommended therapy	None	Statin withdrawal (or dose reduction)	Statin withdrawal Immunosuppression	Support and avoid statins in the future

[a]Minimal changes include cytochrome oxidase (COX) negative fibers, vacuolization, and type 2 fiber atrophy, which are nonspecific findings.
[b]For diagnostic purposes, muscle biopsy should be performed several weeks or months after the clinical event.
[c]Damage could remain.
IMNM: immune-mediated necrotizing myopathy; MAC: membrane attack complex; MHC: major histocompatibility complex; SNP: single-nucleotide polymorphism (for simvastatin); UNL: upper normal limit.

with statin-induced autoimmune myopathies not apparently exposed to statins, and the case of children with autoimmune myopathy with anti-HMGCR antibodies. Analysis of the feasibility of different serological test or provocation test to ascertain the role of *Aspergillum sp*. or others yeast that could be involved in theses disease may be useful ways to address this issue. Whether these autoantibodies are pathogenic or not will be established over the next years. The new paradigm that considers the disease as the conjoint of toxicity and autoimmunity could be applied to other autoimmune disorders.

Key issues

- Patients with autoimmune myopathy associated with statin use and anti-HMGCR antibodies show a pathological picture on muscle biopsy that fits with immune-mediated necrotizing myopathy. Occasionally, a typical inflammatory infiltrate can also be seen. The term *statin-induced autoimmune myopathy* encompasses this clinical spectrum.
- Statin-naïve patients with anti-HMGCR antibodies and autoimmune myopathy have been described, including children. Other sources of possible statin exposure produced by *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., and other molds should be investigated.
- The clinical presentation of *statin-induced autoimmune myopathy* is heterogeneous. There are mild forms that do not need immunosuppressants and severe forms that are refractory to intense immunosuppression. Clinicians should be aware of this heterogeneity.
- Intravenous immunoglobulin seems to be the best treatment for patients diagnosed with immune-mediated necrotizing myopathy and anti-HMGCR antibodies, and should be included in all therapeutic schemes.
- Immune-mediated conditions such as statin-associated myopathy establish a new paradigm in which drug-related muscle toxicity may modify the HMGCR molecule and trigger an autonomous, autoimmune phenomenon.

Funding

This work was funded by the Instituto de Salud Carlos III, grants PI12-01320 and PI15-02100, co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF).

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

1. Statins for millions more? Lancet. 2014;383:669.
2. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al. American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines, 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines. J Am Coll Cardiol. 2014;63:2889–2934.
3. Collins R, Reith C, Emberson J, et al. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. Lancet. 2016;388:2532–2561.
4. Fernandez G, Spatz ES, Jablecki C, et al. Statin myopathy: a common dilemma not reflected in clinical trials. Cleve Clin J Med. 2011;78:393–403.
5. Ganga HV, Slim HB, Thompson PD. A systematic review of statin-induced muscle problems in clinical trials. Am Heart J. 2014;168:6–15.
6. Mancini GB, Baker S, Bergeron J, et al. Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: Canadian Consensus Working Group update. Can J Cardiol. 2016;32(7 Suppl):S35–65.

7. Pasternak RC, Smith SC Jr., Bairey Merz CN, et al. American College of Cardiology; American Heart Association; National Heart, Lung and Blood Institute, ACC/AHA/NHLBI clinical advisory on the use and safety of statins. J Am Coll Cardiol. 2002;40:56.
8. Stroes ES, Thompson PD, Corsini A, et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel statement on assessment, aetiology and management. Eur Heart J. 2015;36:1012–1022.
9. Link E, Parish S, Armitage J, et al.; SEARCH Collaborative Group. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy genome wide study. N Engl J Med. 2008;359:789–799.
• **In this genomewide association study (GWAS), the authors found a strong association between rs4363657 single-nucleotide polymorphism located in SLCO1B1 and the risk of simvastatin-induced myopathy.**
10. Rosenson RS, Baker SK, Jacobson TA, et al. An assessment by the Statin Muscle Safety Task Force: 2014 update. J Clin Lipidol. 2014;8:S58–71.
11. Mohassel P, Mammen AL. The spectrum of statin myopathy. Curr Opin Rheumatol. 2013;25:747–752.
12. Alfirevic A, Neely D, Armitage J, et al. Phenotype standardization for statin-induced myotoxicity. Clin Pharmacol Ther. 2014;96:470–476.
13. Law M, Rudnicka AR. Statin safety: a systematic review. Am J Cardiol. 2006;97:52C–60C.
14. Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. N Engl JmMed. 2009;361:62–72.
• **A comprehensive review focused in rhabdomyolysis and one of its main complications, that is, the renal failure.**
15. Taylor F, Huffman MD, Macedo AF, et al. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. Cochrane Database Syst Rev. 2013;CD004816.
16. Bruckert E, Hayem G, Dejager S, et al. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients - the PRIMO study. Cardiovasc Drugs Ther. 2005;19:403–414.
17. El-Salem K, Ababneh B, Rudnicki S, et al. Prevalence and risk factors of muscle complications secondary to statins. Muscle Nerve. 2011;44:877–881.
18. Parker BA, Capizzi JA, Grimaldi AS, et al. Effect of statins on skeletal muscle function. Circulation. 2013;127:96–103.
19. Gupta A, Thompson D, Whitehouse A, et al.; ASCOT Investigators. Adverse events associated with unblinded, but not with blinded, statin therapy in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid-Lowering Arm (ASCOT-LLA): a randomised double-blind placebo-controlled trial and its non-randomised non-blind extension phase. Lancet. 2017 Jun;24(389):2473–2481.
20. Hansen KE, Hildebrand JP, Ferguson EE, et al. Outcomes in 45 patients with statin-associated myopathy. Arch Intern Med. 2005;165:2671–2676.
21. Armour R, Zhou L. Outcomes of statin myopathy after statin withdrawal. J Clin Neuromuscul Dis. 2013;14:103–109.
22. Selva-O'Callaghan A, Alvarado-Cardenas M, Marin A, et al. Statins and myositis: the role of anti-HMGCR antibodies. Expert Rev Clin Immunol. 2015;11:1277–1279.
23. Floyd JS, Brody JA, Tiniakou E, et al. Absence of anti-HMG-CoA reductase autoantibodies in severe self-limited statin-related myopathy. Muscle Nerve. 2016;54:142–144.
24. Christopher-Stine L, Casciola-Rosen LA, Hong G, et al. A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. Arthritis Rheum. 2010;62:2757–2766.
25. Nazir S, Lohani S, Tachamo N, et al. Statin-associated autoimmune myopathy: a systematic review of 100 cases. J Clin Rheumatol. 2017;23:149–154.
26. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. Arthritis Rheum. 2011;63:713–721.
•• **This is a seminal research that first identifies the anti-HMGCR antibodies as a cause of immune-mediated necrotizing myopathy in patients treated with statins.**
27. Kennedy N, Keating P, O'Donnell J. HMGCR-associated myositis: a New Zealand case series and estimate of incidence. Intern Med J. 2016;46:622–625.
28. Alvarado-Cardenas M, Marin-Sánchez A, Martínez MA, et al. Statin-associated autoimmune myopathy: a distinct new IFL pattern can increase the rate of HMGCR antibody detection by clinical laboratories. Autoimmun Rev. 2016;15:1161–1166.
• **A characteristic and specific immunofluorescence pattern (HALIP) that would help to identify patients with statin-associated autoimmune myopathy in a standard laboratory setting is described.**
29. Ge Y, Lu X, Peng Q, et al. Clinical characteristics of anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase antibodies in Chinese patients with idiopathic inflammatory myopathies. PLoS One. 2015;10:e0141616.
30. Watanabe Y, Suzuki S, Nishimura H, et al. Statins and myotoxic effects associated with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase autoantibodies: an observational study in Japan. Medicine (Baltimore). 2015;94:e416.
31. Limaye V, Bundell C, Hollingsworth P, et al. Clinical and genetic associations of autoantibodies to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase in patients with immune-mediated myositis and necrotizing myopathy. Muscle Nerve. 2015;52:196–203.
32. Allenbach Y, Drouot L, Rigolet A, et al. French Myositis Network. Anti-HMGCR autoantibodies in European patients with autoimmune necrotizing myopathies: inconstant exposure to statin. Medicine (Baltimore). 2014;93:150–157.
33. Mammen AL. Statin-associated autoimmune myopathy. N Engl J Med. 2016;374:664–669.
34. Kishi T, Rider LG, Pak K, et al.; Childhood Myositis Heterogeneity Study Group. Association of anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase autoantibodies with DRB1*07:01 and severe myositis in juvenile myositis patients. Arthritis Care Res (Hoboken). 2017;69:1088–1094.
35. Mammen AL, Gaudet D, Brisson D, et al. Increased frequency of DRB1*11:01 in anti-hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012;64:1233–1237.
36. Mammen AL, Pak K, Williams EK, et al. Rarity of anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies in statin users, including those with self-limited musculoskeletal side effects. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012;64:269–272.
• **This epidemiologic research study addresses the prevalence of anti-HMGCR in patients being treated with statins. The authors demonstrate that most patients receiving statin will not develop anti-HMGCR antibodies.**
37. Musset L, Miyara M, Benveniste O, et al. Analysis of autoantibodies to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase using different technologies. J Immunol Res. 2014;2014:405956.
38. Dalakas MC, Illa I, Dambrosia JM, et al. A controlled trial of high-dose intravenous immune globulin infusions as treatment for dermatomyositis. N Engl J Med. 1993;329:1993–2000.
39. Mammen AL, Tiniakou E. Intravenous immune globulin for statin-triggered autoimmune myopathy. N Engl J Med. 2015 Oct;373:1680–1682.
40. Komai E, Takemoto M, Yokote K. Atorvastatin-induced dermatomyositis in a 47-year-old woman with Sjogren's syndrome. Acta Cardiol. 2015;70:373.
41. Giordano N, Senesi M, Mattii G, et al. Polymyositis associated with simvastatin. Lancet. 1997;349:1600–1601.
42. Noel B, Cerottini JP, Panizzon RG. Atorvastatin-induced dermatomyositis. Am J Med. 2001;110:670–671.
43. Wu Y, Lach B, Provias JP, et al. Statin-associated autoimmune myopathies: a pathophysiologic spectrum. Can J Neurol Sci. 2014;41:638–647.
44. Allenbach Y, Keraen J, Bouvier AM, et al. High risk of cancer in autoimmune necrotizing myopathies: usefulness of myositis specific antibody. Brain. 2016;139:2131–2135.
• **An increased incidence of cancer was observed in patients with immune-mediated necrotizing myopathy. Risk of patients with**

anti-HMGCR persisted but was minor than those without these autoantibodies.

45. Kadoya M, Hida A, Hashimoto Maeda M, et al. Cancer association as a risk factor for anti-HMGCR antibody-positive myopathy. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2016;3:e290.
46. Tiniakou E, Pinal-Fernandez I, Lloyd TE, et al. More severe disease and slower recovery in younger patients with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. Rheumatology (Oxford). 2017;56:787–794.
47. Tansley SL, Betteridge ZE, Simou S, et al.; Juvenile Dermatomyositis Research Group. Anti-HMGCR autoantibodies in juvenile idiopathic inflammatory myopathies identify a rare but clinically important subset of patients. J Rheumatol. 2017;44:488–492.
48. Liang WC, Uruha A, Suzuki S, et al. Pediatric necrotizing myopathy associated with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies. Rheumatology (Oxford). 2017;56:287–293.
    - **Pediatric patients with undiagnosed muscular dystrophy should be tested for anti-HMGCR. Early diagnosis and immunosuppressive treatment can improve the outcome in some patients.**
49. Sakamoto K, Kimura J. Mechanism of statin-induced rhabdomyolysis. J Pharmacol Sci. 2013;123:289–294.
50. Ramachandran R, Wierzbicki AS. Statins, muscle disease and mitochondria. J Clin Med. 2017;6(8):pii: E75.
51. Backes JM, Ruisinger JF, Gibson CA, et al. Statin-associated muscle symptoms-managing the highly intolerant. J Clin Lipidol. 2017;11:24–33.
52. Taylor BA, Thompson PD. Muscle-related side-effects of statins: from mechanisms to evidence-based solutions. Curr Opin Lipidol. 2015;26:221–227.
53. Patel J, Superko HR, Martin SS, et al. Genetic and immunologic susceptibility to statin-related myopathy. Atherosclerosis. 2015;240:260–271.
54. Trapani L, Segatto M, La Rosa P, et al. 3-Hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition impairs muscle regeneration. J Cell Biochem. 2012;113:2057–2063.
55. Martini C, Trapani L, Narciso L, et al. 3-Hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase increase is essential for rat muscle differentiation. J Cell Physiol. 2009;220:524–530.
56. Werner JL, Christopher-Stine L, Ghazarian SR, et al. Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. Arthritis Rheum. 2012;64:4087–4093.
57. Arouche-Delaperche L, Allenbach Y, Amelin D, et al. Pathogenic role of antisignal recognition protein and anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase antibodies in necrotizing myopathies: myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune myopathies. Ann Neurol. 2017;81:538–548.
    - **The authors report muscle fibers atrophy induced by anti-HMGCR antibodies and associated with high levels of inflammatory cytokines. This study supports the pathogenic role of anti-HMGCR antibodies.**
58. Wang TH, Lin TF. Monascus rice products. Adv Food Nutr Res. 2007;53:123–159.
59. Zhao ZJ, Pan YZ, Liu QJ, et al. Exposure assessment of lovastatin in Pu-erh tea. Int J Food Microbiol. 2013;164:26–31.
60. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinium*. J Antibiot (Tokyo). 1976;29:1346–1348.
61. Pelli N, Setti M, Ceppa P, et al. Autoimmune hepatitis revealed by atorvastatin. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003;15:921–924.
62. Wolters LM, Van Buuren HR. Rosuvastatin-associated hepatitis with autoimmune features. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005;17:589–590.
63. Alvarado Cárdenas M, Marín Sánchez A, Lima Ruiz J. Statins and autoimmunity. Med Clin (Barc). 2015;145:399–403.
64. Russo MW, Hoofnagle JH, Gu J, et al. Spectrum of statin hepatotoxicity: experience of the drug-induced liver injury network. Hepatology. 2014;60:679–686.
65. Palamuthusingam D, Mantha M, Dheda S. HMG CoA reductase inhibitor associated myositis and autoimmune hepatitis. Intern Med J. 2017;47:1213–1215.
66. Dullaart RPF. PCSK9 inhibition to reduce cardiovascular events. N Engl J Med. 2017;376:1790–1791.