

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

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

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



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, GENÉTICA Y DE LAS VÍAS DE DEGENERACIÓN
MUSCULAR DE LA DISTROFIA MUSCULAR POR DÉFICIT DE SARCOGLICANO**

Autor: Jorge Alonso Pérez

Directores: Jordi Díaz Manera y Xavier Suárez Calvet

Tutor: Luis Antonio Querol Gutiérrez

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universidad Autònoma de Barcelona

2023

A Silvia y Gisela

A mis padres, mi hermano

A los que ya no están y a los que vendrán

*No hay obstáculos imposibles,
hay voluntades más fuertes y débiles.*

Julio Verne

*Lo maravilloso de aprender
es que nadie puede arrebatarlo*

B. B. King

AGRADECIMIENTOS

Pocas veces en la vida se te presenta una hoja en blanco donde puedas agradecer a todas esas personas que han formado una parte muy importante del camino para alcanzar un objetivo en particular como ocurre con la realización de una tesis doctoral.

Ha sido un camino muy largo y con inicio del que nunca me imaginé que acabaría de esta manera, realizando mi tesis doctoral. Durante este camino se han presentado varios obstáculos y piedras que pudieran haberme desviado de la senda correcta, pero gracias a todas estas personas, he podido continuar y finalizar esta travesía.

Todo empezó durante mi etapa de residente de Neurología, cuando comenzó de mi pasión por las enfermedades neuromusculares y donde tengo que agradecer enormemente al Dr. Fernando Montón por sus grandes enseñanzas tanto a nivel profesional como personal.

Durante mi residencia, tuve la oportunidad de realizar una rotación externa en la Unidad de Enfermedades Neuromusculares del hospital de Sant Pau, donde gracias al Dr. Jordi Díaz-Manera pude continuar mi formación en este campo apasionante de la neurología y además poder realizar mi tesis doctoral.

En este sentido, agradecer a la Dr. Isabel Illa por permitirme entrar en el grupo, así como al Dr. Luis Querol por sus enseñanzas y por tutorizar esta tesis.

En este camino tengo que agradecer especialmente a Jordi. Muchas gracias por todos los conocimientos que me has transmitido tanto en la clínica como en el laboratorio y en la investigación traslacional, y sobre todo muchas gracias por la confianza que has depositado en mí, así como el buen ambiente de trabajo que hemos compartido durante todos estos años. También tengo que agradecer enormemente a Xavi por enseñarme desde los conceptos más básicos hasta otros más sofisticados del trabajo en el laboratorio y también por enseñarme a pensar y reflexionar desde el otro punto de vista, no sólo desde el clínico. Ambos han sido dos de los pilares principales para poder realizar

AGRADECIMIENTOS

esta tesis desde el punto de vista profesional, pero también desde el punto de vista personal.

Del mismo modo muchas gracias al resto de personas que han formado parte del grupo durante estos años, todos han colaborado y participado directa o indirectamente con la transmisión del conocimiento y enseñanzas durante estos años. Gracias a Sonia, Rodrigo, Luis, Ricard, Elba, Lorena, Ana, Cinta, Esther, Patri, Alicia, David, Janina, Noemi y Elena. Muchos de ustedes además se han convertido en amigos y hemos compartidos muy buenos e inolvidables momentos tanto en el trabajo como fuera de él.

Agradecer también a los pacientes y compañeros de otros centros nacionales e internacionales con los que hemos establecido colaboraciones estos años, igualmente gracias a los ratones y su colaboración desinteresada, compañeros también de este camino.

Este camino tampoco hubiera sido posible sin el apoyo de mis padres y mi hermano, quienes han sido fundamentales en el mismo. Muchas gracias por todos esos momentos de ánimos, fuerzas y muestras de apoyo durante todos estos años. Tampoco puedo olvidarme de la pequeña Gisela por hacer que con tu sonrisa perpetua y juegos todo parezca mucho más sencillo.

Finalmente tengo que hacer un agradecimiento muy especial a Silvia por tu apoyo incondicional, tu paciencia, tus ánimos, tus palabras y tus consejos, sin duda esta tesis no hubiera sido posible sin tenerte a mi lado,

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

6-MWT: prueba de la marcha de 6 minutos

ADPFD: poliquistosis renal autosómica dominante

AME: atrofia muscular espinal

AON: oligonucleótidos antisentido

AR: artritis reumatoide

BB: bíceps braquial

BMD: distrofia muscular de Becker

BMP: proteína morfogénica del hueso

BMP-10: proteína morfogénica del hueso-10

BMP-2: proteína morfogénica del hueso-2

BMP-9: proteína morfogénica del hueso-9

CCL2: ligando-2 de quimiocina

CCL-3: ligando-3 de quimiocina

CFTR: regulador transmembrana de fibrosis quística

CK: creatina cinasa

CMT: Charcot Marie-Tooth

Col1a2: gen de colágeno-1a2

Col3a1: gen de colágeno-3a1

Col-I: colágeno-I

Col-VI: colágeno-VI

CPCNP: cáncer de pulmón de células no pequeñas

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

CS: células satélites

DGC: complejo distrofina-glicoproteína

DMD: distrofia muscular de Duchenne

DNA: *deoxyribonucleic acid*

ECA: enzima convertidora de angiotensina

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EMA: Agencia Europea del Medicamento

EMG: electromiograma

EPI-SS: enfermedad intersticial pulmonar asociada a esclerosis sistémica

ER: retículo endoplasmático

FAPs: progenitores fibro-adipogénitos

FCV: capacidad vital forzada

FDA: *Food and Drug Administration*

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

Fn: fibronectina

FRM: factores reguladores miogénicos

FSH-I: distrofia facioescapulohumeral tipo I

HT-100: halofuginona

IBM: miositis por cuerpos de inclusión

IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

IL-13: interleucina-13

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

IL-1B: interleucina-1B

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

IPF: fibrosis pulmonar idiopática

KO: *knock-out*

LGMD: distrofia muscular de cinturas

LGMD-AR: Distrofia muscular de cinturas autosómica recesiva

LGMDR3: distrofia muscular de cinturas recesiva tipo 3 o alfa-sarcoglicanopatía

LGMDR4: distrofia muscular de cinturas recesiva tipo 4 o beta-sarcoglicanopatía

LGMDR5: distrofia muscular de cinturas recesiva tipo 5 o gamma-sarcoglicanopatía

LGMDR6: distrofia muscular de cinturas recesiva tipo 6 o delta-sarcoglicanopatía

LOVD: *Leiden Open Variation Database*

MCD: miocardiopatía dilatada

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos

MEC: matriz extracelular

MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad tipo I

MIP-1a: proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa

MIP-2: proteína inflamatoria de macrófago-2

MMPs: metaloproteasas de la matriz

Mrf4: factor regulador músculo-específico

MRI: resonancia magnética (*Magnetic Resonance Imaging*)

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

MUAP: unidad motora de potencial de acción

Myf5: factor miógeno 5

MyoD: proteína determinación mioblástica

NGS: *Next Generation sequencing*

NO: óxido nítrico

PAI-I: inhibidor del activador del plasminógeno-I

Pax3: *paired box 3*

Pax7: *paired box 7*

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGF-AA: factor de crecimiento derivado de plaquetas AA

PDGF-AB: factor de crecimiento derivado de plaquetas AB

PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas BB

PDGF-CC: factor de crecimiento derivado de plaquetas CC

PDGF-DD: factor de crecimiento derivado de plaquetas DD

PDGFR α : receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa

PDGFR β : receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas beta

PM: progenitores miogénicos

rAAV: virus recombinantes adeno-asociados

RAS: sistema renina-angiotensina

RNA: ácido ribonucleico

RNA-m: RNA mensajero

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

RNA-seq: RNA sequencing

Sca-1: antígeno-1 de célula madre

SCARMD: *severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy*

SG: sarcoglicano

Smad2: *Mother Against Decapentaplegic Homolog 2*

Smad3: *Mother Against Decapentaplegic Homolog 3*

STIR: *Short Tau Inversion Recovery*

T1-w: *T1-weighted*

TA: tibial anterior

TGFB1: gen de factor de crecimiento fibroblástico-B1

TGFB2: gen de factor de crecimiento fibroblástico-B2

TGF- β : factor de crecimiento transformante-beta

TIMP: inhibidores de metaloproteasas

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

ULN: límite superior de la normalidad

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

WB: Western blot

Wt: *Wild-type*

α -SG: alfa-sarcoglicano

α -SMA: *α -smooth muscle actin*

β -SG: beta-sarcoglicano

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

γ -SG: gamma-sarcoglicano

δ -SG: delta-sarcoglicano

RESUMEN	21
ABSTRACT.....	27
1. INTRODUCCIÓN.....	33
1.1 MIOPATÍAS HEREDITARIAS.....	35
1.1.1. Distrofias musculares	36
1.2. DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS POR DÉFICIT DE PROTEÍNA DE SARCOGLICANO	40
1.2.1. Epidemiología.....	40
1.2.2. Clínica	42
1.2.3. Diagnóstico.....	44
1.2.3.1. Estudio analítico	45
1.2.3.2. Electromiografía	45
1.2.3.3. Resonancia Magnética muscular	46
1.2.3.4. Biopsia muscular	49
1.2.4. Genética	51
1.2.5. Fisiopatología	53
1.2.6. Tratamiento	56
1.2.6.1. Terapia génica en sarcoglicanopatías.....	57
1.2.6.2. Otros tratamientos en desarrollo en sarcoglicanopatías.....	59
1.3. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	61
1.3.1. Estructura del músculo esquelético	61

ÍNDICE

1.3.2. Regeneración muscular	62
1.3.2.1. Las células satélites	63
1.3.2.2. Las células del sistema inmune.	65
1.3.2.3. Las células progenitores fibro-adipogénicos.....	66
1.3.2.4. La matriz extracelular	68
1.3.3. Regeneración muscular en las distrofias musculares.....	69
1.3.3.1. Fibrosis muscular en las distrofias musculares.....	72
1.3.4. Estrategias para disminuir la fibrosis muscular en las distrofias musculares.....	76
1.3.4.1. Inhibición de la vía de señalización de TGF- β	77
1.3.4.2. Inhibición de la vía de señalización de CTGF.....	78
1.3.4.3. Inhibidores de la vía de la miostatina.....	79
1.3.4.4. Inhibición de la vía de señalización de PDGF	81
1.3.5. Nintedanib	82
1.4. MODELOS ANIMALES DE SARCOGLICANOPATÍAS.....	85
2. HIPÓTESIS.....	89
2.1. HIPÓTESIS GENERAL.....	91
2.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	91
3. OBJETIVOS	93
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	95
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	95

4.	COMPENDIO DE ARTÍCULOS.....	97
4.1.	ARTÍCULO 1	99
4.1.1.	Material suplementario	113
4.2.	ARTÍCULO 2	117
4.2.1.	Material suplementario	129
4.3.	ARTÍCULO 3	130
4.3.1.	Material suplementario	148
5.	RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS	151
6.	RESUMEN GLOBAL DE DISCUSION	165
7.	CONCLUSIONES	175
8.	LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.....	179
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	183

RESUMEN

El término sarcoglicanopatía engloba cuatro tipos de distrofias musculares de cinturas de herencia autosómica recesiva (LGMD-AR): alfa-sarcoglicanopatía (LGMDR3), beta-sarcoglicanopatía (LGMDR4), gamma-sarcoglicanopatía (LGMDR5) y delta-sarcoglicanopatía (LGMDR6), que están causadas por mutaciones en los genes *SGCA*, *SGCB*, *SGCG* y *SGCD*, respectivamente. Las sarcoglicanopatías, como grupo, son una de las causas más frecuentes de LGMD afectando entre el 10-25% de todos los casos de LGMD-AR, sobre todo afectando a la población infantil. El fenotipo clásicamente consiste en una debilidad muscular que se inicia durante la primera infancia y afecta a la musculatura proximal de las extremidades inferiores. Durante la evolución de la enfermedad la debilidad muscular va progresando y afecta a más grupos musculares llevando a una pérdida de deambulación en la segunda década de la vida. Sin embargo, se han descrito casos de pacientes con un fenotipo más leve, que presentan un inicio más tardío y una pérdida de deambulación a una edad posterior o que incluso pueden seguir manteniendo la deambulación hasta los 50-60 años de edad. En el momento actual se desconoce si existen diferencias clínicas o genéticas entre los distintos tipos de sarcoglicanopatías, o si existen factores pronósticos que influyan en la evolución de la enfermedad y puedan condicionar la heterogeneidad clínica que presentan estos pacientes.

Esta tesis se presenta como un compendio de publicaciones. A continuación, enumero las publicaciones y apporto un breve resumen de las mismas.

RESUMEN

New genotype-phenotype correlations in a large European cohort of patients with sarcoglycanopathy.

Alonso-Pérez J, González-Quereda L, Bello L, Guglieri M, Straub V, Gallano P, Semplicini C, Pegoraro E, Zangaro V, Nascimento A, Ortez C, Comi GP, Dam LT, De Visser M, van der Kooi AJ, Garrido C, Santos M, Schara U, Gangfuß A, Lækken N, Storgaard JH, Vissing J, Schoser B, Dekomien G, Udd B, Palmio J, D'Amico A, Politano L, Nigro V, Bruno C, Panicucci C, Sarkozy A, Abdel-Mannan O, Alonso-Jimenez A, Claeys KG, Gomez-Andrés D, Munell F, Costa-Comellas L, Haberlová J, Rohlenová M, Elke V, De Bleecker JL, Dominguez-González C, Tasca G, Weiss C, Deconinck N, Fernández-Torrón R, López de Munain A, Camacho-Salas A, Melegh B, Hadzsiev K, Leonardis L, Koritnik B, Garibaldi M, de Leon-Hernández JC, Malfatti E, Fraga-Bau A, Richard I, Illa I, Díaz-Manera J.

Brain. 2020 Sep 1;143(9):2696-2708. doi: 10.1093/brain/awaa228. Erratum in: Brain. 2022 Nov 03;: PMID: 32875335.

En este estudio se analizaron las características demográficas, clínicas, genéticas y anatomopatológicas en biopsia muscular de la mayor serie de pacientes con sarcoglicanopatías descrita hasta la fecha. Para ello, se realizó un estudio observacional retrospectivo y se contactó un total de 33 centros especializados en enfermedades neuromusculares procedentes de 13 países europeos. Se obtuvieron datos de un total de 439 pacientes con sarcoglicanopatías, aunque 43 pacientes no pudieron ser incluidos en el análisis por falta de información clínica. Finalmente se obtuvieron datos de 159 pacientes con LGMR3, 73 con LGMR4, 157 con LGMD5 y 7 con LGMDR6. Debido al bajo número de pacientes con LGMDR6, no se incluyeron a estos pacientes en el análisis.

En este estudio se observó que existían diferencias clínicas entre los distintos tipos de sarcoglicanopatías analizados (LGMDR3, LGMDR4 y LGMDR5). De este modo, los pacientes con LGMDR3 mostraron un inicio de la enfermedad más tardío con una progresión más leve de la enfermedad. Por el contrario, en los pacientes con LGMDR4 y LGMDR5 el inicio de la enfermedad era más temprano y la pérdida de deambulaci3n se

producía a una edad menor. Por otro lado, se observó que la afectación cardíaca era mucho más frecuente en los pacientes con LGMDR4 llegando a afectar a un 41,1% de los pacientes. Aproximadamente el 25% tenían afectación respiratoria sin diferencias entre los subtipos de sarcoglicanopatías. La afectación cardíaca y/o respiratoria no se asoció a la edad de inicio, edad de pérdida de deambulación o nivel de expresión de proteína residual.

Se identificó que un inicio de la enfermedad antes de los 10 años de edad y una expresión de proteína residual menor del 30% son factores de riesgo independientes de peor pronóstico ya que se asociaron a una pérdida de deambulación antes de los 18 años de edad en cualquiera de los diferentes tipos de sarcoglicanopatías.

Conclusión: Este estudio reporta las características clínicas, genéticas y de expresión de proteínas de una gran cohorte europea con sarcoglicanopatías. Se identificaron diferencias clínico-genéticas entre los distintos tipos de sarcoglicanopatías, así como factores de riesgo independientes de progresión y correlaciones genotipo-fenotipo que pueden ser importantes para el diseño de estudios de historia natural y ensayos clínicos en sarcoglicanopatías.

Clinical and genetic spectrum of a large cohort of patients with δ -sarcoglycan muscular dystrophy.

Alonso-Pérez J, González-Quereda L, Bruno C, Panicucci C, Alavi A, Nafissi S, Nilipour Y, Zanuteli E, Isihi LMA, Melegh B, Hadzsiev K, Muelas N, Vilchez JJ, Dourado ME, Kadem N, Kutluk G, Umair M, Younus M, Pegorano E, Bello L, Crawford TO, Suárez-Calvet X, Töpf A, Guglieri M, Marini-Bettolo C, Gallano P, Straub V, Díaz-Manera J.

Brain. 2022 Apr 18;145(2):596-606. doi: 10.1093/brain/awab301. PMID: 34515763; PMCID: PMC9014751.

RESUMEN

Dado el escaso número de pacientes con delta-sarcoglicanopatía o LGMDR6 reclutados en el estudio anterior, se decidió realizar este segundo estudio con el objetivo de describir una serie lo más amplia posible de pacientes con esta enfermedad. Para ello se contactó a 128 centros referentes de enfermedades neuromusculares en todo el mundo. Recopilamos las características clínicas, genéticas y de expresión de proteína en biopsia muscular de un total de 30 pacientes con LGMDR6, aunque finalmente sólo se pudieron analizar datos de 23 pacientes, lo que a día de hoy es la cohorte de LGMDR6 más amplia descrita. El hecho de que tan sólo identificásemos 30 pacientes entre todos los centros sugiere que LGMDR6 es una enfermedad ultra-rara.

Se observó un elevado grado de consanguinidad (87%) en los pacientes incluidos. Desde el punto de vista clínico la debilidad proximal de las extremidades inferiores o superiores fue el síntoma de inicio más frecuente, observándose debilidad distal de forma precoz en el 56,5% de los pacientes, sobre todo en los pacientes que no tenían expresión de proteína residual. El 65% de los pacientes perdía la deambulación en adolescencia temprana (edad media de 12,0 años). Se informó afectación cardíaca en cinco pacientes (21,7%) y cuatro pacientes (17,4%) requirieron ventilación no invasiva.

Los pacientes con una ausencia de expresión del complejo de sarcoglicano en la biopsia muscular tenían un fenotipo más grave de la enfermedad con un inicio significativamente más temprano y una pérdida de la deambulación precoz en comparación con los pacientes con expresión de proteína residual.

Conclusión: Este estudio confirmó que la delta-sarcoglicanopatía es una enfermedad neuromuscular ultra-rara y se describieron las características clínicas y moleculares de la mayor cohorte de pacientes recopilada hasta ahora. Nuestros resultados mostraron que se trata de una enfermedad muy grave y rápidamente progresiva caracterizada por debilidad muscular generalizada que afecta predominantemente a músculos proximales, pero también distales de las extremidades. Similar a otras formas de sarcoglicanopatías,

la gravedad y la tasa de debilidad progresiva se correlaciona inversamente con la abundancia de proteína en la biopsia muscular.

En estos dos estudios, además de conocer las características fenotípicas y de evolución de la enfermedad de cada uno de los cuatro tipos de sarcoglicanopatías, hemos identificado que la edad de inicio, así como la expresión residual de proteína son factores pronósticos independientes que condicionan la evolución de la enfermedad. Sin embargo, existen pacientes con una edad de inicio tardía o con una expresión de proteína residual mayor al 30% que tienen un fenotipo más grave, por lo que otros factores deben estar influyendo también en la evolución de la degeneración y fibrosis muscular progresiva que se observa en estos pacientes. Si bien se están desarrollando terapias con el objetivo de proporcionar una copia del gen sano a los pacientes, creemos que otras terapias encaminadas a mejorar la regeneración muscular o reducir la fibrosis o adipogénesis del músculo podrían ser de utilidad en estos pacientes.

Nintedanib Reduces Muscle Fibrosis and Improves Muscle Function of the Alpha-Sarcoglycan-Deficient Mice.

Alonso-Pérez J, Carrasco-Rozas A, Borrell-Pages M, Fernández-Simón E, Piñol-Jurado P, Badimon L, Wollin L, Lleixà C, Gallardo E, Olivé M, Díaz-Manera J, Suárez-Calvet X.

Biomedicines. 2022 Oct 19;10(10):2629. doi: 10.3390/biomedicines10102629. PMID: 36289891; PMCID: PMC9599168.

En este tercer estudio evaluamos la eficacia del fármaco nintedanib, un tratamiento antifibrótico, para aminorar la evolución de la enfermedad en el ratón *Sgca*^{-/-}, un modelo murino de alfa-sarcoglicanopatía.

Se trataron un total de 14 ratones *Sgca*^{-/-} de seis semanas de edad, con nintedanib a dosis de 50 mg/kg cada 12 horas durante 10 semanas y se comparó la función muscular y la histología con 14 ratones *Sgca*^{-/-} tratados con vehículo y seis ratones *wild-type* (Wt).

RESUMEN

La función muscular fue evaluada mediante *treadmill* y la fuerza de agarre de las patas anteriores. Se realizó una evaluación cardíaca por ecocardiografía y estudio histológico del corazón. Así mismo se realizó una amplia caracterización histológica del músculo esquelético mediante estudio morfológico, evaluando la fibrosis, regeneración e inflamación muscular, a través de tinciones convencionales y de estudios de inmunofluorescencia. Además, se realizaron estudios de proteómica y transcriptómica con los músculos obtenidos.

El tratamiento con nintedanib fue bien tolerado en los animales tratados. Los ratones *Sgca*^{-/-} tratados con nintedanib recorrieron una mayor distancia en el *treadmill*, en comparación con los ratones *Sgca*^{-/-} no tratados, y mostraron una mayor fuerza muscular en la prueba de agarre. Además, nintedanib mejoró la arquitectura muscular de los ratones tratados, reduciendo el área de degeneración y fibrosis muscular, lo que se asoció a una reversión del perfil de expresión de citoquinas y de genes relacionados con la fibrosis muscular en los músculos tratados.

Conclusión: El tratamiento con nintedanib mejora la función y la arquitectura muscular, reduciendo la fibrosis y degeneración muscular, así como revirtiendo el ambiente de inflamación crónica en el modelo murino *Sgca*^{-/-}. Estos resultados sugieren que nintedanib podría ser una terapia eficaz para pacientes con alfa-sarcoglicanopatía.

ABSTRACT

The sarcoglycanopathy encompasses four types of autosomal recessively inherited limb-girdle muscular dystrophies (LGMD-AR): alpha-sarcoglycanopathy (LGMDR3), beta-sarcoglycanopathy (LGMDR4), gamma-sarcoglycanopathy (LGMDR5) and delta-sarcoglycanopathy (LGMDR6), which they are caused by mutations in the SGCA, SGCB, SGCG, and SGCD genes, respectively. Sarcoglycanopathies are, as a group, one of the most frequent causes of LGMD, affecting between 10-25% of all LGMD-AR cases, affecting especially in childhood. The phenotype is classically a progressive muscle weakness beginning in early childhood with proximal weakness of lower limbs. During the evolution of the disease, muscle weakness progresses and affects more muscle groups, leading to a loss of ambulation in the second decade of life. However, cases of patients with a milder phenotype have been described, who present a later onset and lose ambulation at a later age or who remaining ambulating until 50-60 years of age. At present, it is not clear if there are clinical or genetic differences between the different types of sarcoglycanopathies, or whether there are prognostic factors that influence the evolution of the disease and may condition the clinical heterogeneity that these patients present.

This thesis is presented as a compendium of publications. Below, I list the publications and provide a brief summary of them.

ABSTRACT

New genotype-phenotype correlations in a large European cohort of patients with sarcoglycanopathy.

Alonso-Pérez J, González-Quereda L, Bello L, Guglieri M, Straub V, Gallano P, Semplicini C, Pegoraro E, Zangaro V, Nascimento A, Ortez C, Comi GP, Dam LT, De Visser M, van der Kooi AJ, Garrido C, Santos M, Schara U, Gangfuß A, Løkken N, Storgaard JH, Vissing J, Schoser B, Dekomien G, Udd B, Palmio J, D'Amico A, Politano L, Nigro V, Bruno C, Panicucci C, Sarkozy A, Abdel-Mannan O, Alonso-Jimenez A, Claeys KG, Gomez-Andrés D, Munell F, Costa-Comellas L, Haberlová J, Rohlenová M, Elke V, De Bleecker JL, Dominguez-González C, Tasca G, Weiss C, Deconinck N, Fernández-Torrón R, López de Munain A, Camacho-Salas A, Melegh B, Hadzsiev K, Leonardis L, Koritnik B, Garibaldi M, de Leon-Hernández JC, Malfatti E, Fraga-Bau A, Richard I, Illa I, Díaz-Manera J.

Brain. 2020 Sep 1;143(9):2696-2708. doi: 10.1093/brain/awaa228. Erratum in: Brain. 2022 Nov 03;: PMID: 32875335.

In this study, the demographic, clinical, genetic, and anatomopathological characteristics of the muscle biopsy of the largest series of patients with sarcoglycanopathies described to date were analyzed. For this, a retrospective observational study was carried out and a total of 33 centers specialized in neuromuscular diseases from 13 European countries were contacted. Data were obtained from a total of 439 patients with sarcoglycanopathies, although 43 patients could not be included in the analysis due to lack of clinical information. Finally, data were obtained from 159 patients with LGMR3, 73 with LGMR4, 157 with LGMD5 and 7 with LGMDR6. Due to the low number of patients with LGMDR6, these patients were not included in the analysis.

In this study, we observed that there were clinical differences between the different types of sarcoglycanopathies analyzed (LGMDR3, LGMDR4 and LGMDR5). Thus, LGMDR3 patients showed a later disease onset with milder disease progression. In contrast, in patients with LGMDR4 and LGMDR5 the onset of the disease was earlier, and the loss of ambulation occurred at a younger age. On the other hand, we observed that cardiac

involvement was much more frequent in patients with LGMDR4, affecting 41.1% of patients. Approximately 25% had respiratory involvement with no differences between sarcoglycanopathies subtypes. Cardiac and/or respiratory involvement was not associated with age at onset, age at loss of ambulation, or residual protein expression level.

We identified that an onset of the disease before 10 years of age and a residual protein expression of less than 30% are independent risk factors for worse prognosis since they were associated with a loss of ambulation before 18 years of age all types of sarcoglycanopathies.

Conclusion: This study reports the clinical, genetic, and protein expression characteristics of a large European cohort with sarcoglycanopathies. Clinical-genetic differences between the different types of sarcoglycanopathies were identified, as well as independent risk factors for progression and genotype-phenotype correlations that may be important for the design of natural history studies and clinical trials in sarcoglycanopathies.

Clinical and genetic spectrum of a large cohort of patients with δ -sarcoglycan muscular dystrophy.

Alonso-Pérez J, González-Quereda L, Bruno C, Panicucci C, Alavi A, Nafissi S, Nilipour Y, Zanuteli E, Isihi LMA, Melegh B, Hadzsiev K, Muelas N, Vilchez JJ, Dourado ME, Kadem N, Kutluk G, Umair M, Younus M, Pegorano E, Bello L, Crawford TO, Suárez-Calvet X, Töpf A, Guglieri M, Marini-Bettolo C, Gallano P, Straub V, Díaz-Manera J.

Brain. 2022 Apr 18;145(2):596-606. doi: 10.1093/brain/awab301. PMID: 34515763; PMCID: PMC9014751.

Given the small number of patients with delta-sarcoglycanopathy or LGMDR6, recruited in the previous study, we decided to carry out this second study with the aim of

ABSTRACT

describing the widest possible series of patients with this disease. For this purpose, 128 referral centers for neuromuscular diseases were contacted throughout the world. We collected the clinical, genetic, and protein expression characteristics in muscle biopsy of a total of 30 patients with LGMDR6, although data from only 23 patients could ultimately be analysed, which to date is the largest LGMDR6 cohort described. The fact that we only identified 30 patients across all centers suggests that LGMDR6 is an ultra-rare disease.

A high degree of consanguinity (87%) was observed in the included patients. From a clinical point of view, proximal muscle weakness of the lower or upper limbs was the most frequent symptom at onset. Early distal weakness was observed in 56.5% of patients, especially in patients who did not have residual protein expression. 65% of patients lost ambulation in early adolescence (mean age 12.0 years). Cardiac involvement was reported in five patients (21.7%) and four patients (17.4%) required non-invasive ventilation.

Patients with an absence of sarcoglycan complex expression on muscle biopsy had a more severe disease phenotype with significantly earlier onset of the disease and early loss of ambulation compared with patients with residual protein expression.

Conclusion: This study confirmed that delta-sarcoglycanopathy is an ultra-rare neuromuscular disease and described the clinical and molecular characteristics of the largest cohort of patients reported to date. Our results showed that this is a very severe and rapidly progressive disease characterized by generalized muscle weakness that predominantly affects proximal but also distal limb muscles. Similar to other forms of sarcoglycanopathies, the severity and rate of progressive muscle weakness is inversely correlated with protein abundance in muscle biopsy.

In these two studies, in addition to knowing the phenotypic characteristics and evolution of the disease of each of the four types of sarcoglycanopathies, we have identified that the age of onset, as well as the residual protein expression are independent prognostic factors that could condition the evolution of the disease. However, there are patients

with a later onset age or with residual protein expression more than 30% who have a more severe phenotype, so other factors must also be influencing the evolution of progressive muscle degeneration and muscle fibrosis. Although therapies in sarcoglycanopathies are being developed with the aim of providing a copy of the healthy gene to patients, we believe that other therapies that improving muscle regeneration or reducing muscle fibrosis or adipogenesis could be useful in these patients.

Nintedanib Reduces Muscle Fibrosis and Improves Muscle Function of the Alpha-Sarcoglycan-Deficient Mice.

Alonso-Pérez J, Carrasco-Rozas A, Borrell-Pages M, Fernández-Simón E, Piñol-Jurado P, Badimon L, Wollin L, Lleixà C, Gallardo E, Olivé M, Díaz-Manera J, Suárez-Calvet X.

Biomedicines. 2022 Oct 19;10(10):2629. doi: 10.3390/biomedicines10102629. PMID: 36289891; PMCID: PMC9599168.

In this third study, we evaluated the efficacy of the drug nintedanib, an antifibrotic treatment, in slowing the course of the disease in the *Sgca*^{-/-} mice, a murine model of alpha-sarcoglycanopathy.

A total of 14 six-week-old *Sgca*^{-/-} mice were treated with nintedanib at a dose of 50 mg/kg every 12 hours for 10 weeks and muscle function and histology were compared with 14 *Sgca*^{-/-} mice treated with vehicle and six wild-type (Wt) mice. Muscle function was evaluated using treadmill and the grip strength of the forelimbs. Cardiac evaluation by echocardiography and histological study of the heart was performed. Likewise, a broad histological characterization of skeletal muscle was carried out through a morphological study, evaluating fibrosis, regeneration and muscle inflammation, through conventional staining and immunofluorescence studies. In addition, proteomic and transcriptomic studies were performed with the muscles obtained.

ABSTRACT

Nintedanib was well tolerated in treated animals. *Sgca*^{-/-} mice treated with nintedanib covered a longer distance on the treadmill, compared with untreated *Sgca*^{-/-} mice, and showed greater muscle strength in the grip test. Furthermore, nintedanib improved the muscle architecture of the treated mice, reducing the area of muscle degeneration and fibrosis, which was associated with a reversal of the expression profile of cytokines and genes related to muscle fibrosis in the treated muscles.

Conclusion: Nintedanib improves muscle function and muscle architecture, reducing fibrosis and muscle degeneration, as well as reversing the chronic inflammatory environment in the *Sgca*^{-/-} mouse model. These results suggest that nintedanib could be an effective therapy for patients with alpha-sarcoglycanopathy.

1. *INTRODUCCIÓN*

1.1 Miopatías hereditarias

Las miopatías son un grupo heterogéneo de trastornos que afectan principalmente al músculo esquelético, ya sea por alteración de la estructura de la fibra muscular, del metabolismo muscular o de la función de los canales. El término deriva de las palabras griegas "myo", músculo, y "pátheia", sufrimiento, es decir enfermedad muscular.

Una de las clasificaciones posibles de las miopatías se basa en su etiología, existiendo miopatías adquiridas y miopatías hereditarias (1).

Las miopatías hereditarias son un grupo de miopatías de origen genético que se pueden transmitir a la descendencia de forma autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X. También existe un tipo de miopatía hereditaria secundaria a mutaciones en el DNA mitocondrial las cuales tienen un tipo de herencia distintivo, dado su herencia materna, y además estar condicionado tanto por la poliplasmia (alto número de copias del DNA mitocondrial en cada células) y por el fenómeno de segregación mitótica, dado que las mitocondrias de la una célula progenitoria se reparten durante la mitosis de forma aleatoria a las células hijas, pudiendo heredar o no la mutación del DNA mitocondrial (2). Como norma general, las miopatías hereditarias están causadas por mutaciones en genes que codifican proteínas involucradas en la estructura, funcionamiento o metabolismo del músculo. A pesar de los avances recientes en el diagnóstico genético, actualmente las miopatías hereditarias siguen clasificándose según las características clínicas y anatomopatológicas en la biopsia muscular. De este modo, las miopatías hereditarias se pueden clasificar en miopatías mitocondriales, miopatías congénitas, miopatías metabólicas, las canalopatías y las distrofias musculares (3). En esta tesis nos centraremos en las distrofias musculares y más concretamente en un tipo de distrofia de muscular, las producidas por mutaciones en los genes del sarcoglicano, también conocidas como sarcoglicanopatías.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Distrofias musculares

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de miopatías hereditarias que se caracterizan por una debilidad muscular progresiva secundaria a la degeneración del músculo esquelético derivada de una pérdida paulatina de las fibras musculares. Las distrofias musculares comparten hallazgos comunes en la biopsia muscular donde se puede observar un aumento de la variabilidad del tamaño de las fibras musculares, presencia de núcleos internalizados, fibras regenerantes y un aumento del tejido fibroso y adiposo a nivel endomisial y perimisial. El conjunto de estos hallazgos conforma lo que se conoce como patrón distrófico (4) (**Figura 1**).

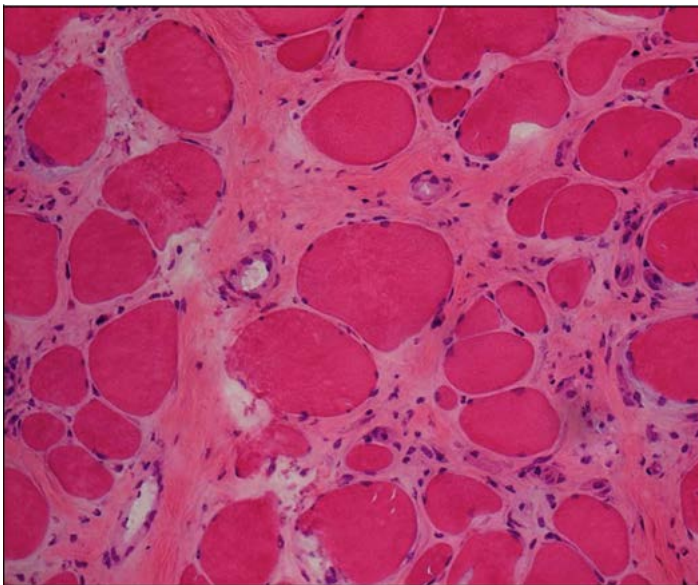


Figura 1. Imagen de tinción de hematoxilina-eosina en una muestra de biopsia muscular de un paciente con una distrofia muscular. Se observan las características típicas del patrón distrófico con aumento de la variabilidad en el tamaño de las fibras musculares y aumento del tejido conectivo endomisial.

1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, las distrofias musculares se han clasificado según la presentación clínica, la edad de inicio, la progresión y el modo de herencia. Por ejemplo, existen algunas distrofias musculares con inicio muy precoz, como es el caso de las distrofias musculares congénitas, las cuales se suelen clasificar de forma independiente del resto de distrofias musculares. Por otro lado, existen distrofias con un inicio muy tardío, como suelen ser algunos casos de distrofias de cinturas. Sin embargo, mutaciones en un mismo gen puede producir tanto un inicio precoz como tardío, como es el caso de las sarcoglicanopatías, lo cual dificulta la clasificación teniendo en cuenta sólo la edad de inicio. Existen algunas distrofias musculares con rasgos fenotípicos muy característicos, como puede ser la distrofia miotónica de Steinert, donde destaca la miotonía; la distrofia de Emery-Dreifuss, con la presencia de contracturas articulares prominentes a nivel axial, codos y tendón de Aquiles; o la distrofia facio-escapulo-humeral, con un patrón de debilidad escapulo-humero-peroneal asimétrico con afectación facial característico (5).

Actualmente se intenta clasificar cada tipo de distrofia teniendo en cuenta todas estas condiciones, los genes responsables y el mecanismo fisiopatológico de las proteínas involucradas. En este sentido, las distrofias musculares congénitas se suelen asociar a mutaciones en genes de proteínas de la matriz extracelular, de la membrana basal o del proceso de glicosilación de otras proteínas. Mutaciones en genes de la membrana nuclear típicamente se asocian a la distrofia muscular de Emery-Dreifuss. Las mutaciones en genes de proteínas sarcoméricas o sarcolémicas, como es el caso de los sarcoglicanos, se suelen asociar a distrofias musculares de cinturas (6).

Las distrofias musculares de cinturas (LGMD) son un grupo heterogéneo de distrofias musculares tanto desde el punto de vista clínico como genético. Como rasgos comunes destaca un patrón de debilidad proximal predominante al inicio de la enfermedad, con respecto de la muscular facial y orbicular, junto con cambios distróficos en la biopsia muscular. El inicio de la enfermedad, aunque se puede presentar desde la primera infancia hasta la edad avanzada, suele producirse tras la adquisición de la deambulación,

1. INTRODUCCIÓN

lo cual puede utilizarse como punto diferencial con las distrofias musculares congénitas (7).

El gran avance en el diagnóstico genético producido en los últimos años, con las técnicas de secuenciación masiva o “*Next Generation sequencing*” (NGS), ha tenido un impacto importante en el diagnóstico y en la identificación de nuevos genes causantes de las LGMD, de modo que actualmente se conocen 45 genes asociados a las distrofias musculares (8). Sin embargo, esto también ha complicado el diagnóstico de los pacientes, dado que un mismo fenotipo puede producirse por mutaciones en diferentes genes, y también mutaciones en un mismo gen puede manifestarse con distintos fenotipos. Por este motivo, el estudio genético debe confirmar el juicio diagnóstico realizado a través de la evaluación clínica del fenotipo del paciente y otras pruebas complementarias, como la biopsia muscular donde además del patrón distrófico se pueden analizar la expresión de determinadas proteínas; o la resonancia magnética (MRI) muscular, donde puede existir un patrón de afectación característico (9).

En la tabla 1 se muestra la clasificación actual, junto con la correspondencia con la nomenclatura antigua, de las LGMD.

Autosómicas dominantes		
Nomenclatura antigua	Nomenclatura nueva	Gen
LGMD1D	LGMD D1	<i>DNAJB6</i>
LGMD1F	LGMD D2	<i>TPNO3</i>
LGMD1G	LGMD D3	<i>HRNPDL</i>
LGMD1I	LGMD D4	<i>CAPN3</i>
Miopatía de Bethlem	LGMD D5	<i>COL6A1, A2, A3</i>
LGMD por KBTBD13		<i>KBTBD13</i>
LGMD por CACNA1S		<i>CACNA1S</i>

1. INTRODUCCIÓN

Autosómicas recesivas		
Nomenclatura antigua	Nomenclatura nueva	Gen
LGMD2A	LGMD R1	<i>CAPN3</i>
LGMD2B	LGMD R2	<i>DYSF</i>
LGMD2D	LGMD R3	<i>SGCA</i>
LGMD2E	LGMD R4	<i>SGCB</i>
LGMD2C	LGMD R5	<i>SGCG</i>
LGMD2F	LGMD R6	<i>SGCD</i>
LGMD2G	LGMD R7	<i>TCAP</i>
LGMD2H	LGMD R8	<i>TRIM32</i>
LGMD2I	LGMD R9	<i>FKRP</i>
LGMD2J	LGMD R10	<i>TTN</i>
LGMD2K	LGMD R11	<i>POMT1</i>
LGMD2L	LGMD R12	<i>ANO5</i>
LGMD2M	LGMD R13	<i>FKTN</i>
LGMD2N	LGMD R14	<i>POMT2</i>
LGMD2O	LGMD R15	<i>POMGnt1</i>
LGMD2P	LGMD R16	<i>DAG1</i>
LGMD2Q	LGMDR17	<i>PLEC</i>
LGMD2S	LGMD R18	<i>TRAPPC11</i>
LGMD2T	LGMD R19	<i>GMPPB</i>
LGMD2U	LGMD R20	<i>ISPD</i>
LGMD2Z	LGMD R21	<i>POGLUT1</i>
	LGMD R22	<i>COL6A2</i>
	LGMD R23	<i>LAMA2</i>
	LGMD R24	<i>POMGNT2</i>
LGMD2X	LGMD R25	<i>BVES (POPDC1)</i>
	LGMD R26	<i>POPDC2</i>

1. INTRODUCCIÓN

	LGMD R27	JAG2
LGMD por PYROXD1		PYROXD1

Tabla 1. Clasificación actual de las LGMD. Se muestra la equivalencia con la nomenclatura antigua, así como los genes relacionados a cada tipo de LGMD. *Tabla adapta de Enzo Cohen et al, 2022 (8).*

1.2. Distrofia muscular de cinturas por déficit de proteína de sarcoglicano

Las LGMD por déficit de sarcoglicano o sarcoglicanopatías comprenden cuatro subtipos de LGMD con herencia autosómicas recesivas (LGMD-AR): LGMDR3 o alfa-sarcoglicanopatía (α -SG), LGMDR4 o beta-sarcoglicanopatía (β -SG), LGMDR5 o gamma-sarcoglicanopatía (γ -SG) y LGMDR6 o delta-sarcoglicanopatía (δ -SG), que están causadas por mutaciones en los genes *SGCA*, *SGCB*, *SGCG* y *SGCD*, respectivamente. Todo el trabajo realizado en esta tesis está centrado en este tipo de LGMD. Aunque desde el punto de vista clínico y anatomopatológico pueden existir algunas diferencias entre los distintos tipos de sarcoglicanos, en la introducción de esta tesis se realizará un análisis conjunto de todas las sarcoglicanopatías, señalando rasgos distintivos de cada subtipo en los diferentes apartados.

1.2.1. Epidemiología

Las sarcoglicanopatías, en conjunto, son uno de los tipos de LGMD-AR más frecuente englobando entre el 10 y el 25% de todos los casos de LGMD-AR (10,11), siendo además la tercera LGMD-AR frecuente, después de las calpainopatías y las disferlinopatías (12). Sin embargo, la frecuencia es variable según las poblaciones siendo más frecuente en poblaciones con alto grado de endogamia o en determinadas áreas geográficas. Por

1. INTRODUCCIÓN

ejemplo, de forma global se estima que el 15% de los pacientes con LGMD en Estados Unidos tiene una sarcoglicanopatía frente al 32% en población brasileña. La frecuencia de sarcoglicanopatía es mayor cuando se analiza a los pacientes con distrofia muscular un fenotipo grave y de inicio precoz, elevándose la prevalencia hasta el 22-60% de los casos, frente a cuando se analizan formas leves de distrofia muscular con un inicio en el adulto que se obtiene una prevalencia entre el 4-8% (12-14).

No existen datos claros de la prevalencia de cada tipo de sarcoglicanopatía, aunque generalmente la LGMD-R3 o α -SG, seguida de la LGMD-R5 o γ -SG suelen ser los tipos más frecuentes en las diferentes series publicadas. La LGMD-R3 o α -SG suele ser el tipo más frecuente en Estados Unidos y en algunas zonas de Europa, como Italia. La LGMD-R5 o γ -SG es la distrofia muscular más frecuente en las poblaciones del Magreb y en la población Judía Romaniote, ambas poblaciones con un alto grado de consanguinidad, existiendo mutaciones fundadoras en el gen SGCG en cada una de estas poblaciones: la c.525delT conocida como mutación fundadora Magrebí y la c.848G>A conocida como la mutación fundadora Judía Romaniote. En la población Magrebí se estima una frecuencia de portadores de la mutación c.525delT en el gen SGCG de 1:250 siendo la LGMD-R5 el 65% de todas las LGMD-AR; mientras que por ejemplo en Bulgaria el 14% de la población es portadora de la mutación fundadora Romaniote (15,16). La LGMD-R4 o β -SG, suele tener una frecuencia media en las distintas series publicadas aunque es la forma más frecuente de sarcoglicanopatía en la población Iraní, siendo la delección completa del exón 2 la mutación más frecuente y considerada como una posible mutación fundadora en esta población (17). La LGMD-R6 o δ -SG, es la forma de sarcoglicanopatía menos frecuente y, salvo en la población Brasileña donde conforma en torno al 14% de los casos de sarcoglicanopatía, sobre todo en pacientes con ascendencia Africana, es una enfermedad muy poco frecuente y casi inexistente en la mayoría de países (18). Este hecho confiere que la LGMD-R6 sea el tipo de sarcoglicanopatía de la que menos información se dispone actualmente.

1. INTRODUCCIÓN

1.2.2. Clínica

Los cuatro tipos de sarcoglicanopatías, como ocurre en otras LGMD, se caracterizan por una debilidad muscular progresiva de predominio en la cintura pelviana que, como normal general, suele iniciarse durante la primera infancia. De este modo, los pacientes van a comenzar presentando dificultad para levantarse del suelo o asientos bajos presentando un signo de Gowers positivo en la exploración física. Además, van a presentar dificultades para correr y deambular, así como dificultad para peinarse o manipular objetos en alto por la debilidad proximal de la cintura escapular.

La mayoría de los pacientes con sarcoglicanopatías presentan un fenotipo grave con un inicio precoz asemejándose a la distrofia muscular de Duchenne (DMD), por este motivo originariamente a este tipo de pacientes con un fenotipo *Duchenne-like* pero con un estudio de distrofina normal en la biopsia muscular y un patrón de herencia recesiva se les conocía como "*severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy*" o SCARMD. Sin embargo, actualmente se sabe que el espectro clínico de las sarcoglicanopatías es mucho más amplio que la DMD y la enfermedad puede presentarse también en la edad adulta y con un fenotipo más leve (19). No se conocen exactamente las diferencias fenotípicas que existen entre los distintos tipos de sarcoglicanopatías, aunque se ha estipulado que los pacientes con α -SG suelen tener un inicio más tardío y un fenotipo más leve, dado que incluso se han descrito casos en los que sólo existen mialgias e hiperckemia de forma aislada (20–23). Por otro lado, los pacientes con γ -SG es más frecuente que se presenten con un fenotipo *DMD-like* o SCARMD (24). Esta variabilidad fenotípica entre individuos afectados con un mismo tipo de sarcoglicanopatía, también puede ocurrir incluso en individuos dentro de la misma familia (25), lo que convierte a las sarcoglicanopatías en un tipo de LGMD con un amplio espectro de presentación sin que se conozcan claramente los factores que están involucrados.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la progresión de la enfermedad, debido a la degeneración muscular progresiva y sustitución por tejido fibroadiposo, como se profundirá posteriormente en el apartado corresponde de esta tesis, se produce una progresión de la debilidad muscular que se va haciendo más manifiesta y afectando a más grupos musculares. Esto va a propiciar una pérdida de la deambulación que en la mayoría de los pacientes ocurre durante la adolescencia, aunque hay pacientes con un fenotipo más leve que conservan la deambulación incluso hasta los 50-60 años de edad (21,22). La escoliosis y las contracturas también suelen formar parte del fenotipo de la enfermedad, sobre todo en los casos graves con debilidad muscular severa y pérdida de deambulación precoz (26). No se conoce con exactitud qué factores pueden estar influenciando en la variabilidad fenotípica que presentan las sarcoglicanopatías, aunque la ausencia completa de expresión de proteína se ha postulado que puede asociar a un peor pronóstico al observarse en algunos pacientes con fenotipo grave (27).

En las sarcoglicanopatías durante la progresión de la enfermedad puede existir una afectación cardíaca y/o de la musculatura respiratoria. La afectación cardíaca en las LGMD puede darse en forma de miocardiopatía o de trastorno del ritmo cardíaco. En algunos tipos de distrofias musculares la afectación cardíaca es un rasgo distintivo como pueden ser los trastornos del ritmo en las distrofias musculares por mutaciones en el gen *LMNA* (28) o la miocardiopatía en la DMD (29). En el caso de las sarcoglicanopatía se estima que la afectación cardíaca afecta en torno al 30% de los pacientes, reportándose más frecuentemente en pacientes con β -SG o γ -SG. Aunque hay que considerar que estos resultados están basados en estudios con cohortes pequeñas de pacientes, en torno 20-40 pacientes (30–33). En un estudio de 32 pacientes con β -SG se observó una frecuencia bastante mayor de afectación cardíaca, de hasta el 63%, mientras que la afectación respiratoria se situaba en el 18.8% (34). El conocimiento sobre la afectación cardíaca en la δ -SG es muy limitado debido a la baja frecuencia de esta enfermedad y se basa únicamente en casos aislados. Sin embargo, el gen *SGCD*, responsable de la δ -SG, se ha postulado como un gen asociado a la miocardiopatía

1. INTRODUCCIÓN

dilatada (MCD) familiar o esporádica, aunque los estudios son contradictorios y actualmente se considera al *SGCD* como una causa marginal de MCD y de intensidad leve (35–39). Por otro lado, la ausencia de delta-sarcoglicano se ha asociado con miocardiopatía en varios modelos animales preclínicos (40–43).

La afectación respiratoria se produce por una debilidad progresiva de los músculos responsables de la respiración y suele presentarse como una insuficiencia respiratoria restrictiva que puede llegar a necesitar soporte respiratorio. En los pacientes con sarcoglicanopatías, la afectación respiratoria aparece generalmente tras la pérdida de la deambulación aunque puede estar presente en casos leves mientras siguen manteniendo la marcha autónoma (44). Como ocurría con la función cardíaca, la función respiratoria en las sarcoglicanopatías se ha evaluado únicamente en pequeños grupos de pacientes y analizando cada subtipo en estudios de forma independiente. Estos estudios reportan que la función respiratoria suele estar afectada entre el 40-55% de los pacientes, requiriendo soporte respiratorio en torno al 10-15% de los casos según las series, sin existir una clara diferencia entre los distintos tipos de sarcoglicanopatía (12,30,34,45).

1.2.3. Diagnóstico

Dado que el proceso diagnóstico de las sarcoglicanopatías puede resultar complejo, una correcta anamnesis y caracterización fenotípica son claves para poder interpretar correctamente los resultados de las pruebas complementarias solicitadas.

Ante la presencia de un paciente con una debilidad muscular proximal progresiva siempre en primer lugar tendremos que descartar causas de miopatías adquiridas o incluso trastornos neurógenos, como puede ser la atrofia muscular espinal (AME) (46). Posteriormente nos podemos plantear el diagnóstico de una miopatía hereditaria, entre

las que se encuentran las distrofias musculares y a su vez las sarcoglicanopatías. Existen una serie estudios complementarios que nos pueden ayudar al diagnóstico diferencial.

1.2.3.1. Estudio analítico

En el estudio analítico de un paciente con miopatía, los niveles de creatina cinasa (CK) son determinantes. La CK es una enzima que se localiza en el interior de la fibra muscular por lo que una elevación implica un daño en la misma. Hay que tener en cuenta que los niveles de CK también van a depender del sexo y raza del paciente, siendo más elevada en varones y en raza negra. Además, la CK se puede elevar en otras enfermedades neuromusculares como en neuropatías o enfermedades de la neurona motora, por lo que hay que considerar que la elevación de la CK es inespecífica y debe ponerse en contexto clínico. Una elevación persistente y mayor de 1,5 veces el límite superior de la normalidad (ULN) suele ser indicativo de miopatía (47). En el caso de las sarcoglicanopatías los niveles de CK se encuentran generalmente elevados y de forma significativa, en torno 5-10 veces sobre el ULN (26).

1.2.3.2. Electromiografía

La electromiografía (EMG) puede apoyar el diagnóstico de una miopatía si se observan unidades motoras de potencial de acción (MUAP) miopáticas caracterizadas por ser polifásicas, de corta duración y amplitud disminuida, con un reclutamiento normal o precoz (**Figura 2**). Aunque la presencia de MUAPs miopáticas puede ayudar en el diagnóstico de una miopatía, hay que considerar que los hallazgos del EMG pueden ser inespecíficos o incluso, en el caso de miopatías crónicas de larga evolución, como ocurre en las distrofias musculares y en las sarcoglicanopatías, puede existir algo de denervación y la consecuente reinervación. En consecuencia, se pueden observar unos MUAPs polifásicos pero con una duración y amplitud aumentada como se pueden observar en procesos neurógenos crónicos, sin embargo la presencia de un reclutamiento precoz sería indicativo de MUAPs miopáticas. El EMG también es una

1. INTRODUCCIÓN

herramienta que nos puede ayudar en el diagnóstico diferencial al poder descartar un trastorno neurógeno como puede ser la AME, que puede tener un fenotipo similar a una LGMD (48).

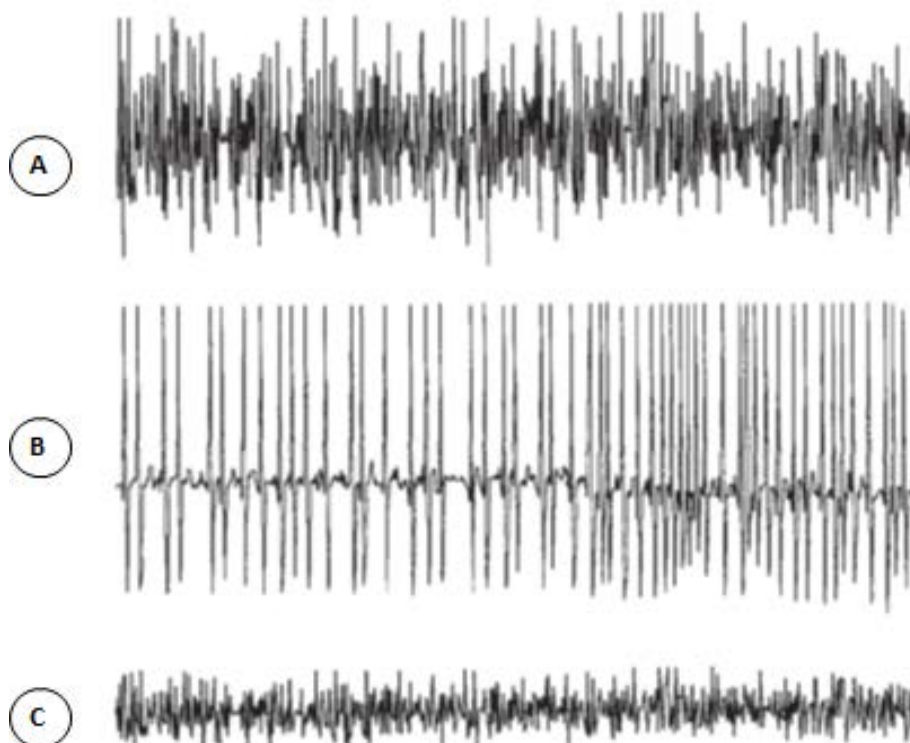


Figura 2. Patrones de reclutamiento de las unidades motoras. A) Patrón interferencial normal. **B)** Patrón neurógeno. **C)** Patrón miopático. *Figura adaptada de David C. Preston, 2013 (48).*

1.2.3.3. Resonancia Magnética muscular

La resonancia magnética (MRI) muscular se ha convertido en los últimos años en una herramienta útil en el abordaje diagnóstico de los pacientes con miopatía dado que permite hacer una aproximación no invasiva del estado del tejido muscular. Existen diferentes secuencias que permiten evaluar el estado del tejido muscular siendo la más utilizada la secuencia T1-weighted (T1w) en la cual el músculo enfermo, donde ya existe

1. INTRODUCCIÓN

sustitución del tejido muscular por tejido fibro-adiposo, se observa hiperintenso (blanco); mientras que el músculo sano se observa hipointensivo (gris). La cantidad de infiltración grasa se puede estratificar de manera semicuantitativa mediante la escala de Mercuri modificada por Fischer (49) del siguiente modo: 0: apariencia normal; 1: infiltración leve, <30% del volumen muscular individual; 2: infiltración moderada, 30-60% del músculo afectado; 3: infiltración severa, >60% del músculo afectado; 4: estadio final, todo el músculo afectado (**Figura 3**).

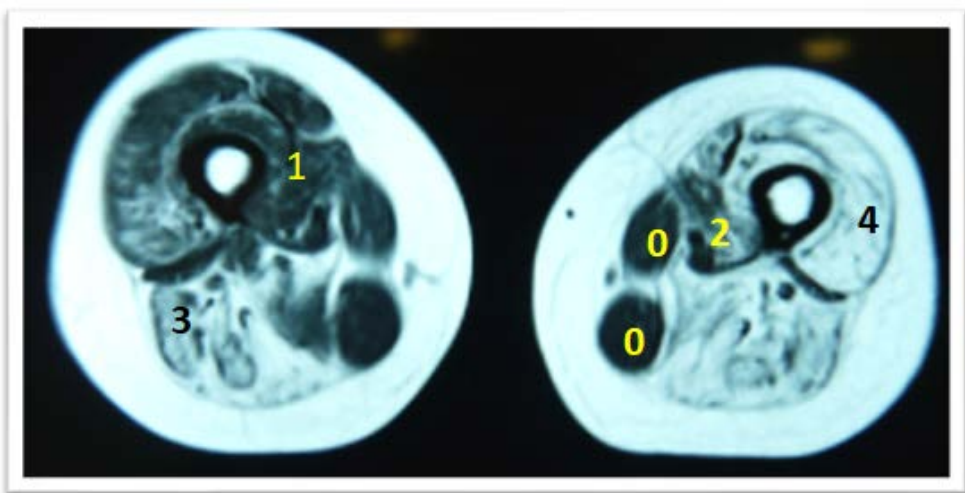


Figura 3. Imagen de MRI en secuencia T1w en un corte medio del muslo de un paciente con distrofia muscular con representación de la escala de Mercuri. Se observan distintos grados de sustitución del tejido muscular por tejido graso. Los números representan la graduación de la escala de Mercuri modificada. 0= normal, 1= infiltrado graso <30%, 2= infiltrado graso 30-60%, 3= infiltrado graso >60%, 4= 100% infiltrado graso.

Otras secuencias, como la "*Short Tau Inversion Recovery*" (STIR), pueden ser útiles en el abordaje diagnóstico de los pacientes con miopatías. La secuencia STIR permite identificar la presencia de inflamación muscular que se manifestará como una señal hiperintensa (blanca), lo que puede ser de utilidad en el caso de sospecha diagnóstica de una miopatía inflamatoria, aunque también se pueden observar alteraciones en el STIR en algunos tipos de distrofias musculares, como la facioescapulohumeral tipo I

1. INTRODUCCIÓN

(FSH-I), las disferlinopatías o la anoctamina-5, o en algunos procesos neurógenos como atrofas musculares distales o en algunas neuropatías hereditarias tipo Charcot Marie-Tooth (CMT) (50–52).

En relación con la sustitución grasa, valorada por la secuencia T1w, en la MRI se puede observar, al igual que en la exploración física, que la afectación de todos los grupos musculares no es homogénea. Por un lado, habrá algunos músculos mucho más afectados con gran porcentaje del músculo sustituido por grasa, mientras que habrá otros músculos en los que existe una afectación mucho menor o incluso es casi inexistente. Esto ha permitido establecer diferentes patrones de afectación muscular específico de uno o varios tipos de enfermedades, lo que puede ser de gran ayuda en el proceso diagnóstico de un paciente con miopatía (6,50,53–57) (**Figura 4**). En el caso de las sarcoglicanopatías, diversos estudios han demostrado que existe un patrón específico que puede ser de ayuda para establecer el diagnóstico. Los músculos más comúnmente afectados y de forma más precoz son los glúteos, aductores y el compartimiento posterior del muslo, mientras que la musculatura distal de la pierna está relativamente respetada hasta etapas avanzadas de la enfermedad (58). Esta última característica es bastante distintiva respecto a otras LGMD, donde el comportamiento posterior de la pierna con gemelo medial y sóleo están comúnmente afectados. Sin embargo, este patrón no es patognomónico ya que hay otras enfermedades, como por ejemplo la enfermedad de Pompe, donde existe un patrón de afectación similar con relativa conservación de la musculatura distal de la pierna en la MRI (59,60). Otra característica común en la MRI muscular de los pacientes con sarcoglicanopatías en la presencia de un gradiente de afectación de proximal a distal en el muslo, sobre todo en el vasto lateral (58), al contrario de lo que ocurre en la miositis por cuerpos de inclusión (IBM), donde el gradiente es de afectación en el compartimiento anterior del muslo es de distal a proximal (61).

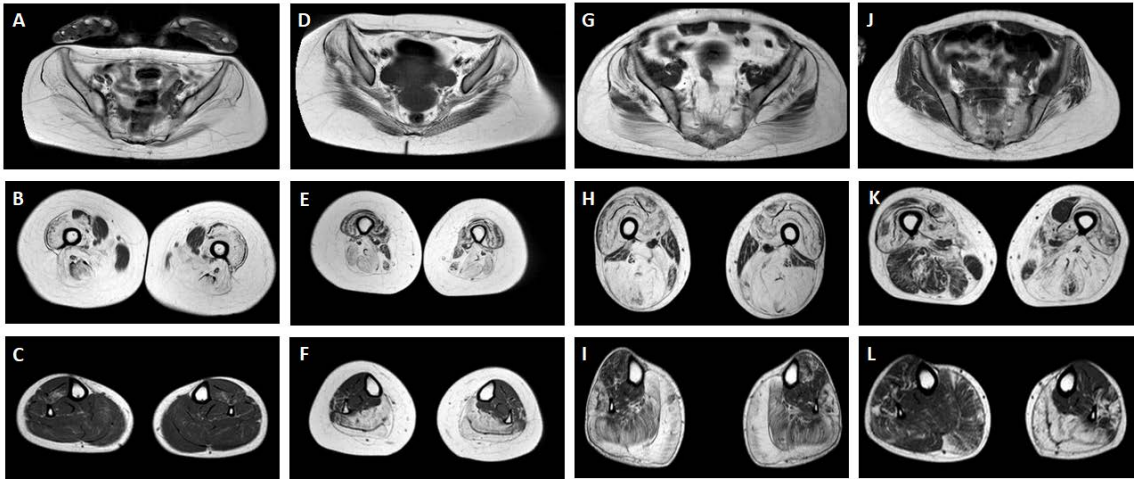


Figura 4. Representación de imágenes de MRI secuencias T1w de pacientes con varias distrofias musculares. A-C) Paciente con alfa-sarcoglicanopatía (LGMDR3). D-F) Calpainopatía (LGMDR1). G-I) Distrofia muscular de Becker. J-L) Portadora sintomática de distrofinopatía.

1.2.3.4. *Biopsia muscular*

A pesar del gran avance y la disponibilidad de las nuevas técnicas diagnóstico genético, actualmente la biopsia muscular sigue siendo de gran utilidad en el abordaje diagnóstico de las sarcoglicanopatías. Generalmente el músculo elegido para la biopsia muscular es aquel que presenta debilidad y/o afectación en la MRI muscular, siendo generalmente el cuádriceps en los casos de sarcoglicanopatías. La biopsia muscular confirmará la presencia de cambios distróficos, como se ha comentado previamente, y permite excluir otros diagnósticos como puede ser una AME o una miositis que también se puede presentar con debilidad muscular proximal y elevación significativa de CK (4). Además de los cambios distróficos, en las SG también se pueden objetivar infiltrados inflamatorios en la biopsia muscular así como expresión anómala del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) (62). Este hallazgo puede dificultar el diagnóstico y obliga establecer el diagnóstico diferencial con una miopatía inflamatoria u otras distrofias musculares en la existen infiltrados inflamatorios cuando se produce una

1. INTRODUCCIÓN

degeneración muscular rápida como ocurre en la DMD y en algunos casos de disferlinopatía (4).

En la biopsia muscular se pueden realizar además estudios de las deficiencias de proteínas mediante estudios de inmunohistoquímica o Western blot (WB). En las sarcoglicanopatías se puede realizar un estudio de inmunotinción del músculo usando anticuerpos para cada una de las cuatro proteínas del complejo de sarcoglicano (SG). Tradicionalmente, para evaluar la alteración del complejo de SG se realizaba la inmunohistoquímica aislada de α -SG (63,64) para el despistaje diagnóstico de sarcoglicanopatía. Sin embargo, aunque se han descrito casos en los que existe una reducción severa o ausencia de expresión de un determinado tipo de SG de forma aislada y que se correlaciona con el diagnóstico genético específico (65,66), como norma general una mutación en un gen de SG produce una reducción o incluso ausencia de varios SG (**Figura 5**). De este modo se recomienda realizar el estudio de los 4 tipos de SG de forma simultánea dado que no existe un patrón de inmunotinción específico que permita conocer el genotipo y el diagnóstico de un tipo concreto de SG (67,68). Igualmente, junto con la inmunotinción de los 4 tipos de SG, se recomienda la realización un estudio de expresión de distrofina, dado que los pacientes con sarcoglicanopatías pueden presentar una deficiencia secundaria de distrofina y viceversa, los pacientes con DMD pueden presentar una deficiencia secundaria de algún tipo de SG. Sin embargo, un paciente con una inmunotinción de distrofina normal y una ausencia o reducción severa de cualquier tipo de SG sugiere el diagnóstico de sarcoglicanopatía (26).

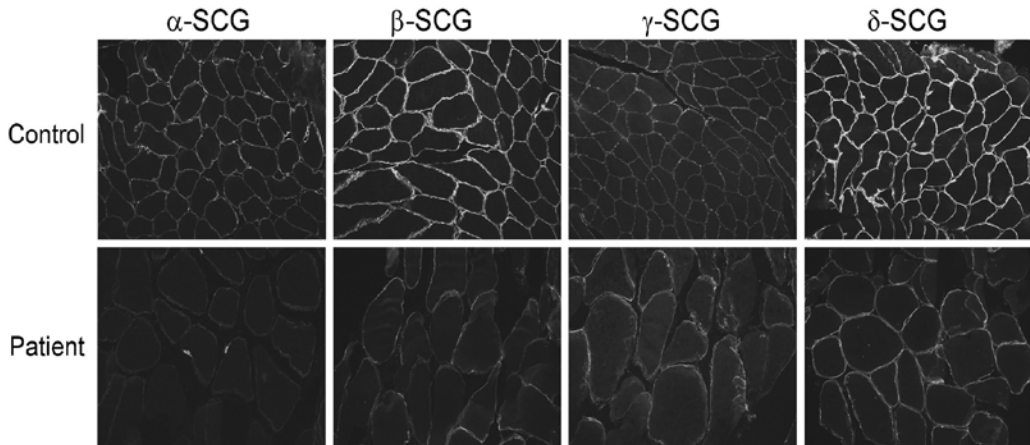


Figura 5. Patrón de inmunofluorescencia de los 4 tipos de sarcoglicanos en un paciente con alfa-sarcoglicanopatía y en un control. Se observa una ausencia de expresión de alfa-sarcoglicano, asociada a una reducción de expresión en el resto de sarcoglinos. α -SCG: alfa-sarcoglicano; β -SCG: beta-sarcoglicano; γ -SCG: gamma-sarcoglicano; δ -SCG: delta-sarcoglicano.

Figura adaptada de Lidia GQ et al, 2018 (22).

Es decir, los estudios de inmunohistoquímica en las sarcoglicanopatías pueden ser muy sensibles, pero poco específicos dado que se puede observar una reducción secundaria de SG en otras enfermedades como en la DMD, donde además pueden existir infiltrados y cambios inflamatorios en la biopsia muscular lo cual puede dificultar el diagnóstico diferencial.

1.2.4. Genética

Tras la evaluación del fenotipo del paciente y las pruebas complementarias solicitadas, para confirmar la sospecha diagnóstica de una sarcoglicanopatía se debe realizar el estudio genético.

La distrofia muscular por déficit de sarcoglicano se produce por mutaciones en los 4 genes que codifican cada uno de los sarcoglicanos que forman el complejo de

1. INTRODUCCIÓN

sarcoglicano en la membrana muscular. Los genes son el *SGCA*, *SGCB*, *SGCG* y el *SGCD*, los cuales producen la LGMDR3, LGMDR4, LGMDR5 y LGMDR6, respectivamente. Existen otros dos genes de sarcoglicano, *SGCE* y *SGCZ*, que no se han asociado a ninguna condición muscular hasta el momento, aunque el *SGCE* se ha asociado a mioclonía-distonía (69).

En los últimos años los estudios genéticos han evolucionado rápidamente, sobre todo gracias a las técnicas de NGS, y actualmente la realización de paneles de genes que analicen simultáneamente los 4 tipos de SG, es accesible y forma parte de la práctica clínica habitual. Tradicionalmente era necesario analizar cada gen de SG de forma independiente mediante la técnica de Sanger; y dado que en la mayoría de los casos existe una reducción severa o ausencia de varios tipos de SG en la biopsia muscular, realizar el estudio genético dirigido de un tipo específico de SG con el objetivo de confirmar el diagnóstico era complicado. Sin embargo, hay algunos casos concretos en los que realizar directamente un estudio dirigido podría ser factible. En poblaciones aisladas, con alto grado de consanguinidad o en determinadas regiones geográficas existe una alta prevalencia de ciertos tipos de SG que además asocian determinadas mutaciones fundadoras. De este modo, la mutación c.525delT o la mutación c.848G>A del gen *SGCG* es la causa de la mayoría de los casos de LGMD en el Norte de África o en la población gitana Romaniote, respectivamente (15,16,70,71). En los Amish la mutación c.452C>G en el gen *SGCB* se ha considerado también como mutación fundadora en esta población (72). En Europa y América del Norte, la α -SG es generalmente el tipo de SG más habitual y la mutación c.229C>T, p.Arg77Cys en el gen *SGCA* se ha reportado como la más frecuente (73). En la población brasileña hay que considerar que la frecuencia de δ -SG es mayor que en el resto de países, siendo la mutación c.656delC en el gen *SGCD* la más frecuentemente reportada (18). Actualmente dado el fácil acceso a las pruebas genéticas, generalmente se realiza la secuenciación completa de los 4 genes de SG de forma conjunta, sin embargo es importante conocer estas particularidades ya que puede ayudar en la interpretación y validez de los estudios genéticos de NGS, y también puede

ser de gran ayuda cuando no exista la posibilidad de realizar estudio de NGS u otros estudios más complejos, como es el caso del RNA-seq que nos permite analizar cambios a nivel del transcriptoma en el tejido muscular.

Respecto al tipo de mutación presentes en las sarcoglicanopatías, se han identificado varios tipos de mutaciones en cada uno de los genes del SG, aunque la mayoría de ellas son mutaciones de tipo *missense* o pequeñas deleciones, también se pueden encontrar mutaciones de tipo *nonsense*, *splicing* o duplicaciones (74). Existe una base de datos abierta completa en *Leiden Open Variation Database* (LOVD) donde se pueden consultar las variaciones descritas actualmente en los diferentes genes del SG (<https://www.lovd.nl/>). En el momento actual se han descrito 998 variantes en el gen *SGCA*, 588 en el gen *SGCB*, 757 en el *SGCG* y 275 en el gen *SGCD*.

1.2.5. Fisiopatología

En el músculo esquelético el complejo de sarcoglicano está formado por 4 subunidades de proteínas glicosiladas (α -SG, β -SG, γ -SC y δ -SC). Todas son proteínas transmembranas con un pequeño dominio intracelular y otro dominio extracelular de mayor tamaño (75). Este tetrámero se encuentra en la membrana de las fibras musculares y forma parte del complejo distrofina-glicoproteína (DGC). El DGC tiene una función fundamental en el anclaje del citoesqueleto a la matriz extracelular teniendo un papel clave en la estabilización de la membrana muscular durante la contracción muscular (76). El DGC también interviene en la transducción de señales y en la regulación de las interacciones entre el citoesqueleto, el sarcolema y la matriz extracelular (77). El complejo de SG tiene un papel importante en la estabilidad mecánica del sarcolema y del resto de complejo DGC durante la contracción muscular, manteniendo un vínculo entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, y siendo crucial en la detección y transmisión del estrés mecánico al núcleo a través de proteínas de señalización (78). Por otro lado, el complejo de SG interactúa con otros componentes claves del DGC, como son la α -

1. INTRODUCCIÓN

dystrobrevin, una fosfoproteína citoplasmática que interactúa con la distrofina y en el complejo SG estableciendo un nexo de unión entre el complejo SG y la nNOS (79); o el sarcospan, el cual forma un complejo junto con el tetrámero de SG participando en la estabilización del α -dystroglicano a la membrana y potenciando el vínculo entre la distrofina y el α -dystroglicano (66,75) (**Figura 6**).

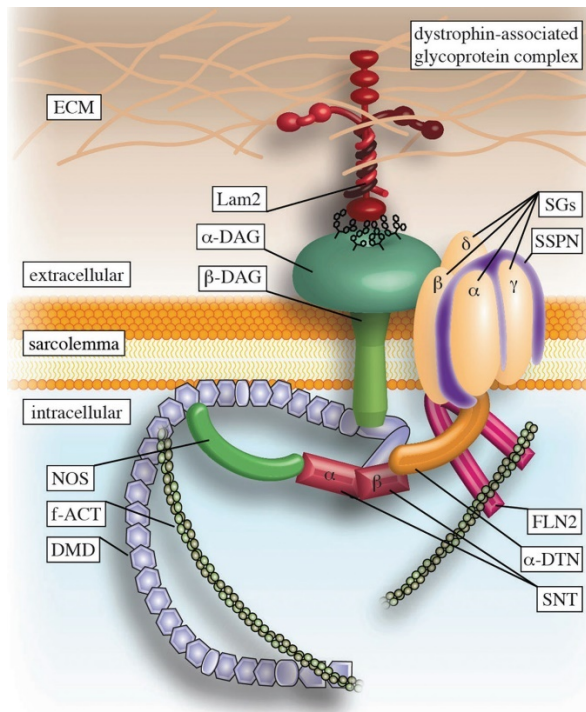


Figura 6. Organización molecular del complejo distrofina-glicoproteína (DGC) y del complejo de sarcoglicano. SGs: sarcoglicanos; α -DTN: α -dystroberdin; SSPN: sarcospan; α -DAG: α -dystroglicano; DMD: distrofina; f-ACT: filamento de actina; ECM: matriz extracelular. Figura adaptada de Hakan Tarakci et al, 2016 (75).

El ensamblaje del complejo de SG es sofisticado. La formación del complejo se inicia en el retículo endoplasmático (ER). Se postula que el β -SG es el protagonista en iniciar el ensamblaje tras unirse con el δ -SG formando lo que se conoce como el núcleo del complejo de SG. Posteriormente, el γ -SG se une al δ -SG y por último el α -SG se une al γ -SG. Una vez formado el complejo, éste se une con la proteína sarcospan y el complejo

1. INTRODUCCIÓN

distroglicano durante el transporte por el aparato de Golgi hasta llegar al sarcolema (78,80,81).

Como se ha comentado, una mutación en cualquiera de los cuatro genes del complejo de SG, causa una ausencia o reducción de expresión no sólo de la proteína defectuosa sino además de las otras subunidades del complejo de SG. La reducción o ausencia de expresión de la proteína, puede deberse a una alteración o ausencia de la transcripción o traducción de la proteína, como suele ocurrir en las mutaciones *nonsense* o *frameshift*, o también a defectos del procesamiento de la proteína en el ER donde el sistema de control de calidad puede detectar una proteína mal plegada o disfuncionante y eliminarla a través del sistema de ubiquitina-proteasoma. Estos procesos, dan lugar a que no se pueda ensamblar el complejo de SG y por lo tanto no puede llegar a la membrana muscular, observándose una ausencia global o una reducción severa del conjunto de SG en conjunto. Sin embargo, si una proteína mutada evade el sistema de control de calidad y es capaz de plegarse y formar el tetrámero, ésta podría llegar a la membrana muscular. A pesar de ello, al tratarse de una proteína disfuncionante, ésta podría causar una inestabilidad y pérdida de función de todo el complejo de SG produciendo un fenotipo distrófico pero en el que puede existir cierto nivel de expresión residual de la proteína mutada y del resto de sarcoglicanos (27) (**Figura 7**).

1. INTRODUCCIÓN

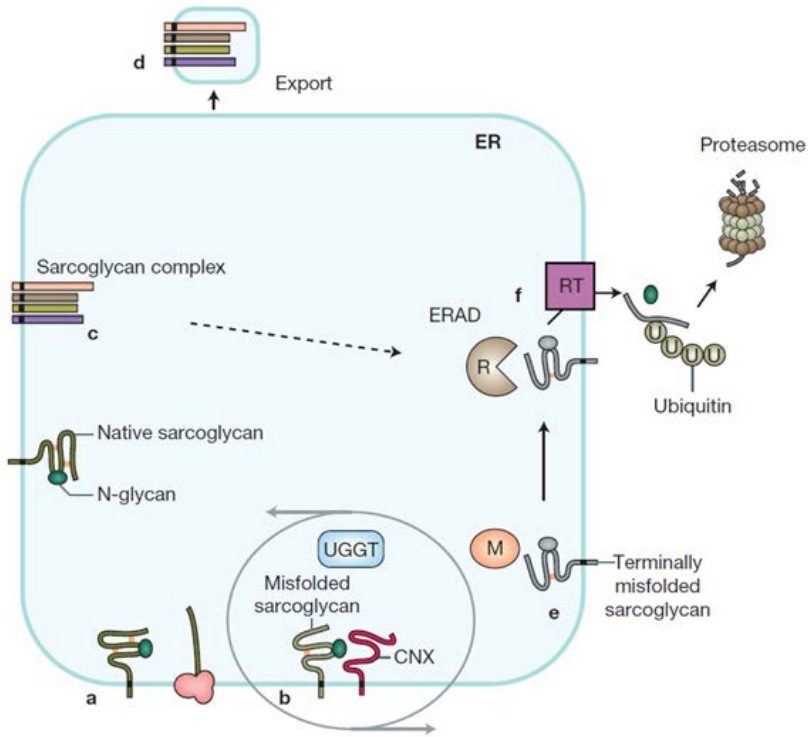


Figura 7. Procesamiento de formación y maduración del sarcoglicano en el retículo endoplasmático (ER). Se observa cómo una proteína de sarcoglicano con una mutación puntual es evaluada por el control de calidad del ER (b), el cual puede ser evadido, madurando y formando el complejo de sarcoglicano que es exportado hasta la membrana muscular (c,d). Por otro lado, la proteína disfuncionante puede ser identificada por el control de calidad y es eliminada por la vía del proteosoma (f). *Figura adaptada de Dorianna Sandonà et al, 2009 (27).*

1.2.6. Tratamiento

En el momento actual no existe un tratamiento que retrase o pare la evolución de la enfermedad en las sarcoglicanopatías. Por tanto, el tratamiento es únicamente sintomático con el objetivo de mejorar la función motora y realizar un seguimiento estricto y tratamiento de una posible afectación respiratoria y/o cardíaca.

Como tratamiento sintomático de la función motora es fundamental el tratamiento fisioterápico valorando la fuerza muscular y el rango de movimiento articular y, si es necesario, apoyado de un tratamiento ortopédico. En paciente con formas graves, la escoliosis suele ser un problema añadido sobre todo si se produce una pérdida de deambulación temprana antes del estirón de crecimiento de la pubertad, siendo necesario la cirugía en algunas ocasiones. Por la similitud clínica de muchos pacientes con la DMD, se han reportado casos aislados del uso de glucocorticoides en pacientes con sarcoglicanopatías pero con resultados dispares, motivo por el que actualmente, aunque no existen estudios controlados con gran número de pacientes, no se recomienda su uso de forma generalizada (82–85).

Dado que no se conoce con exactitud la frecuencia o la probabilidad de afectación cardíaca o respiratoria en los pacientes con sarcoglicanopatías es obligatorio hacer un control periódico de ambas funciones. La evaluación de la función respiratoria permitirá identificar de forma precoz la necesidad de un soporte ventilatorio nocturno, lo cual ha demostrado que puede mejorar incluso la función sistólica del ventrículo izquierdo en estos pacientes (86). La afectación cardíaca subclínica es común y se recomienda realizar controles con ecocardiografía y electrocardiografía, al menos cada dos años. En el caso de existir una afectación cardíaca en forma de miocardiopatía podría estar indicado el tratamiento con IECA y/o beta-bloqueantes (33).

1.2.6.1. *Terapia génica en sarcoglicanopatías.*

En los últimos años se han realizado grandes avances en relación con la posibilidad de llevar a cabo una terapia génica para enfermedades en los que la mutación de un gen produce la pérdida de función de una proteína, como ocurre en las sarcoglicanopatías. En estas enfermedades reemplazar ese gen mutado por otro gen que no tenga el defecto genético es un enfoque terapéutico factible (87).

1. INTRODUCCIÓN

La principal estrategia de terapia génica utilizada en las sarcoglicanopatías se basa en el uso de vectores virales, los virus recombinantes adeno-asociados (rAAV), que portan una copia sana del gen de SG afectado que es transferido al músculo esquelético. Se han realizado varios estudios preclínicos en modelos animales evaluando la eficacia de esta técnica en distintos tipos de sarcoglicanopatías, usando una administración del rAAV mediante inyección local intramuscular (88–90), intravenosa en una extremidad aislada (91) o mediante infusión sistémica (92–95). Estos estudios mostraron no sólo distintos grados de aumento de la expresión del complejo de SG en el sarcolema, sino además una mejoría de la histología y la arquitectura muscular, así como de las pruebas de función motora valorando la fuerza muscular y capacidad locomotora de los diferentes modelos murinos de sarcoglicanopatía.

Tras los estudios preclínicos se han comenzado a realizar algunos ensayos clínicos de terapia génica en pacientes con sarcoglicanopatías utilizando los rAAV. En el momento actual se han realizado ensayos clínicos con administración intramuscular de rAAV en pacientes con α -SG (LGMDR3) (96,97) y γ -SG (LGMDR5) (98). En ningún estudio se observaron efectos adversos graves y se produjo un aumento, aunque variable, de la expresión del sarcoglicano mutado y de las otras unidades del complejo después de hasta 6 meses de seguimiento tras la administración. En un paciente con LGMDR3 la transfección no fue eficaz, y posteriormente se comprobó que este paciente tenía anticuerpos previamente contra el rAAV utilizado. La presencia de anticuerpos neutralizantes es una de las principales limitaciones de la terapia génica utilizando rAAV como vector (99). Más recientemente, en 2019, se realizó el primer ensayo en pacientes con LGMDR3 con administración intravenosa en una o las dos extremidades inferiores de forma aislada. Participaron un total de 6 pacientes, y en 4 se realizó estudio de biopsia muscular antes y tras 180 días después del tratamiento. En estos pacientes se confirmó la liberación del gen en el tejido muscular a través de estudios cuantificación del genoma del vector y se analizó el aumento de expresión de proteína α -SG mediante inmunofluorescencia y de WB. Se logró una expresión de α -SG entre el 14-25% respecto

1. INTRODUCCIÓN

a controles, cuantificado por WB. Además, se produjo también un aumento en la fuerza muscular y se redujo o se mantuvo estable la distancia recorrida en el test de la marcha de 6 minutos (6MWT); además el tratamiento fue bien tolerado sin eventos adversos destacables (100).

En el futuro próximo, el objetivo principal es el diseño de ensayos clínicos en los que se pueda realizar una administración sistémica de los rAAV con el objetivo de que las partículas virales puedan llegar a la totalidad de la musculatura y aumentar así el beneficio clínico. De hecho, actualmente hay varios protocolos de ensayos clínicos en marcha de diversas compañías para el tratamiento de administración sistémica en diferentes tipos de sarcoglicanopatías. Actualmente se está realizando el primer ensayo clínico con terapia génica mediante administración sistémica en β -SG (LGMDR4). En este ensayo participaron 6 pacientes divididos en dos cohortes de 3 pacientes cada una, una cohorte que recibió una dosis baja de rAAV y la otra una dosis alta de rAAV. Los resultados preliminares, aún no publicados, mostraron en la cohorte de dosis baja una expresión de β -SG, cuantificada por WB, de 36% a los 60 días y del 54% a los 24 meses; mientras que en la cohorte de dosis alta se obtuvo una expresión de β -SG, medida mediante por IF, en el 72% de las fibras musculares a los 60 días. Igualmente se obtuvo una mejoría clínica evaluada mediante diversas pruebas funcionales motoras en ambas cohortes (101). Los resultados finales de estas cohortes están aún pendientes de ser publicados.

1.2.6.2. Otros tratamientos en desarrollo en sarcoglicanopatías.

A pesar de que en la actualidad la línea principal de investigación en la búsqueda de un tratamiento eficaz en los pacientes con sarcoglicanopatías se centra en la terapia génica con rAAV, hay otras aproximaciones terapéuticas que pudieran tener su utilidad en el futuro en este tipo de pacientes.

1. INTRODUCCIÓN

Por un lado, se encuentran las terapias antifibróticas que persiguen bloquear o atenuar el proceso de fibrosis y degeneración muscular que se produce en estos pacientes, así como en el resto de las distrofias musculares. Estos estudios se explicarán con mayor profundidad posteriormente en el apartado correspondiente de esta tesis, aunque hay muy pocos estudios y terapias realizados de forma específica en las sarcoglicanopatías con este tipo de terapias.

Como se comentó previamente, la mayoría de los pacientes con sarcoglicanopatías tienen mutaciones de tipo *missense* en alguno de los genes del SG, las cuales dan lugar a una alteración en el plegamiento de la proteína que puede ser detectada por la maquinaria de la célula y ser eliminada, por lo que no se puede formar el complejo SG ni alcanzar el sarcolema. En este sentido, una estrategia novedosa es el uso de pequeñas moléculas que modifican el plegamiento de la proteína, permitiendo así el ensamblaje del complejo de SG y el tráfico de este hasta el sarcolema. Actualmente se ha comprobado que el uso de correctores de "*cystic fibrosis transmembrane regulator*" (CFTR), denominados así porque inicialmente se mostró su utilidad en la fibrosis quística, mejora la expresión en el sarcolema del complejo de SG en miotubos derivados un paciente con α -SG (LGMDR3) heterocigoto compuesto con las mutaciones *missense* V247M y L31P. Esta mejoría en la expresión del complejo de SG se obtuvo principalmente con las moléculas C17 y C6 de forma aislada o en combinación (102,103). Del mismo modo, la molécula correctora CFTR C17, también mejoró la expresión del complejo en el sarcolema así como la fuerza muscular de un modelo murino *Sgca*^{-/-} portador de la mutación *missense* R98H en el gen *SGCA* en la musculatura de las extremidades posteriores (104). El futuro éxito de este tipo de terapias con moléculas que modifican el plegamiento de los sarcoglicanos significará disponer de un tipo de un tratamiento personalizado para este tipo de pacientes.

1.3. El músculo esquelético

1.3.1. Estructura del músculo esquelético

El músculo esquelético es uno de los tres tejidos musculares principales del cuerpo humano, junto con músculo cardíaco y el músculo liso, representando aproximadamente el 40 % del peso corporal total. Además contiene 50–75 % de todas las proteínas del cuerpo y necesita aproximadamente el 25 % del gasto cardíaco para suplir sus necesidades metabólicas basales (105).

Cada músculo esquelético está constituido por miles de fibras musculares, las cuales están envueltas entre sí por vainas de tejido conectivo conocida como endomisio. Las fibras musculares se agrupan en haces formando fascículos que están también rodeados de tejido conectivo conocido como perimisio. El conjunto de fascículos forma el músculo esquelético rodeado a su vez por un tejido conectivo denominado epimisio (106). Profundizando dentro de la fibra muscular individual, cada una de éstas se compone de varias miofibrillas que contienen a su vez múltiples miofilamentos (**Figura 8**). Los miofilamentos de actina y miosina son los más importantes y se acoplan de manera entrelazada formando bandas reconocibles en el músculo esquelético y que contribuyen a generar un aspecto estriado que da lugar a la denominación de músculo esquelético estriado (107).

La fibra muscular es la unidad básica del músculo esquelético, siendo su integridad fundamental para desarrollar una correcta actividad contráctil (108). Además de la fibra muscular, en el músculo esquelético encontramos la matriz extracelular (MEC), los nervios y los capilares sanguíneos que irrigan el músculo esquelético. La MEC participa en la transmisión de la fuerza generada en la fibra muscular y en el mantenimiento y la reparación de la fibra muscular tras una lesión (109).

1. INTRODUCCIÓN

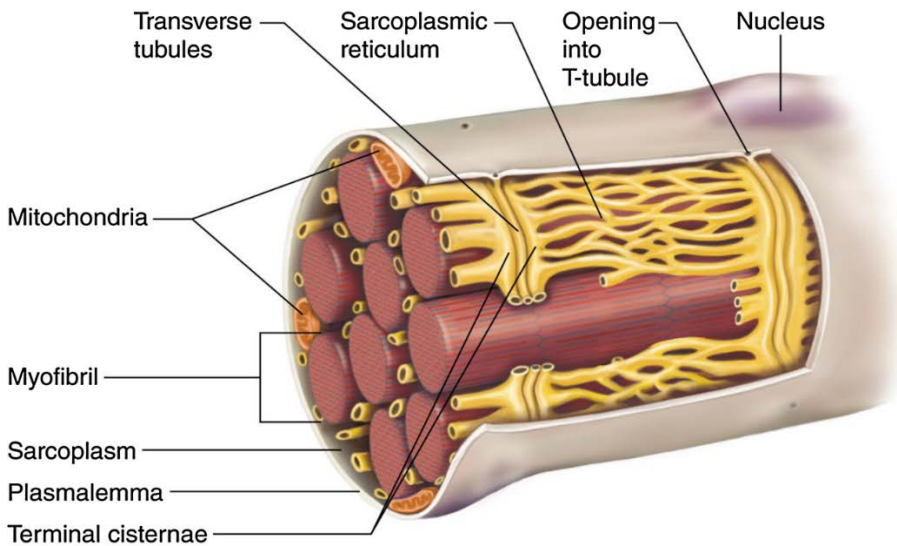


Figura 8. Estructura de una fibra muscular. Figura adaptada de Walter R. Frontera et al, 2015 (105).

1.3.2. Regeneración muscular

En condiciones normales, el músculo esquelético es un tejido estable con poco recambio celular. Se estima que sólo el 1-2% del músculo esquelético normal es reemplazado en el plazo de una semana (110). Sin embargo, el músculo esquelético es un tejido con una alta capacidad de regeneración. Cuando se produce algún tipo de lesión, las células satélite (CS), que son las células madre del músculo, juegan un papel principal en el proceso de regeneración de la fibra muscular. Sin embargo, para lograr con éxito una regeneración muscular completa va a ser necesario la intervención de otros tipos de células como son las células inflamatorias o las células progenitoras fibro-adiopogénicas (FAPs), que son importantes también en la remodelación y regeneración de la MEC. En los siguientes apartados se profundizará en cada uno de los protagonistas de la regeneración muscular.

1.3.2.1. Las células satélites

Las CS fueron descritas por primera vez en 1961 por dos investigadores independientes, Alexander Mauro (111) y Bernard Katz (112), al observar en el microscopio electrónico unas células mononucleares situadas entre la lámina basal y el sarcolema o membrana de la fibra muscular. Desde su descripción original se postuló que las CS eran responsables del crecimiento muscular así como de la reparación muscular en respuesta a una lesión, ejercicio o una enfermedad muscular como ocurre en las distrofias musculares (113).

En condiciones basales las CS se encuentran en un estado de quiescencia. Tras una lesión o un daño en la fibra muscular se produce una infiltración muscular de células inflamatorias de forma transitoria y una activación de las CS. Una vez activadas, las CS proliferan a través de una división asimétrica, de manera que tras la división celular una célula hija se mantendrá en estado de quiescencia, y la otra célula hija se encargará de la regeneración muscular migrando hacia la zona dañada y se diferenciará en mioblastos o progenitores miogénitos (PM), células con una alta capacidad de proliferación. Estos PM pueden unirse a una célula dañada o bien fusionarse en miotubos para finalmente madurar originando en una nueva miofibrilla (114). Las CS también pueden realizar una división simétrica, originando dos células hijas que se mantendrán en estado de quiescencia. La capacidad de auto-regenerarse de las CS, permite que el número de CS se mantenga constante a lo largo de los ciclos de daño y regeneración muscular (115) (**Figura 9**). Por otro lado, tras el daño muscular y gracias al papel de las FAP, como se comentará posteriormente, la MEC también se remodela de forma que el músculo regenerado, en condiciones normales se asemeja al músculo intacto tanto estructural como funcionalmente (110).

El proceso de activación, proliferación y diferenciación miogénica de las CS está estrictamente organizado por una jerarquía de factores reguladores miogénicos (FRM). Las CS adultas quiescentes expresan el factor de transcripción *paired box 7* (Pax7). Pax3

1. INTRODUCCIÓN

o *paired box 3*, un parálogo de Pax7, es fundamental en la miogénesis embriónica pero también se expresa en un subconjunto de células satélite de ciertos músculos adultos, como es el caso del diafragma y la musculatura del tronco (116). Tanto Pax7 como Pax3 tienen un papel fundamental en la activación de las CS quiescentes. Tras la activación, las CS expresan el factor miógeno 5 (Myf5) y la proteína de determinación mioblástica (MyoD). Antes de finalizar la proliferación de las CS, se produce una disminución de la expresión de Pax7 y Pax3. Posteriormente, los mioblastos comienzan a expresar *myogenin* y factor regular músculo-específico 4 (*Mrf4*), iniciándose la transición desde mioblasto a miocitos alargados, fusionándose en miotubos y finalmente madurando en miofibrillas (117,118). En la activación de las CS también está relacionado un cambio de factores de transcripción desde la vía de señalización *Notch*, que induce la quiescencia de las CS, hacia vías de señalización canónica *Wnt* que será necesaria para la diferenciación de las CS, siendo la expresión de Wnt7a importante en la proliferación de las CS activadas y en la hipertrofia de la nueva miofibrilla regenerada (119).

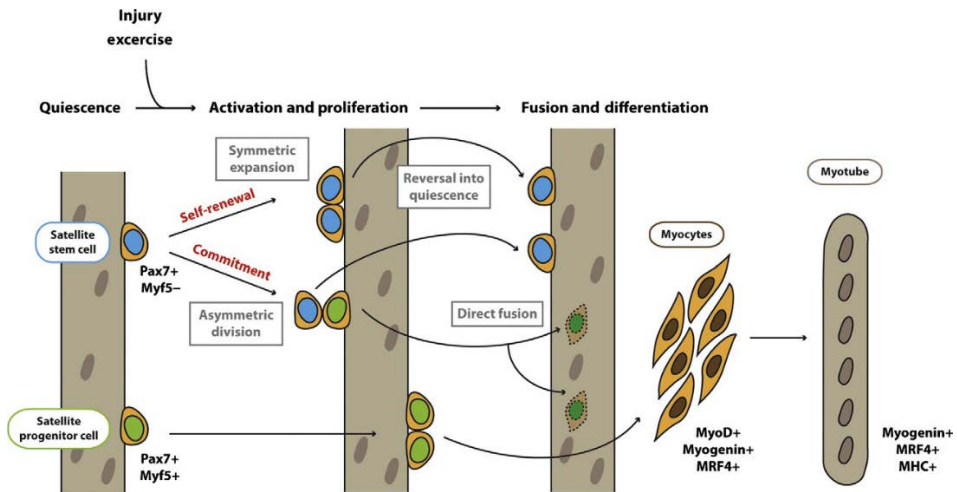


Figura 9. Representación esquemática de la activación, proliferación y diferenciación de las células satélites. Figura adaptada de Natasha C. Chang et al, 2014 (118).

1.3.2.2. Las células del sistema inmune.

Aunque las CS juegan un papel principal en la regeneración muscular, tras una lesión muscular para conseguir una restauración muscular completa, será necesario la intervención de diversos factores de crecimiento y citoquinas, así como de otros tipos de células como son las células inflamatorias y las FAPs.

Inmediatamente tras una lesión muscular, se van a liberar citoquinas y factores de crecimiento, tanto por parte del tejido dañado como de las CS (120), desencadenando una compleja respuesta inflamatoria con el objetivo de eliminar las células dañadas o muertas, coordinar el proceso de regeneración y restaurar la homeostasis tisular. En condiciones basales, existe una población de leucocitos residentes en el músculo esquelético, principalmente mastocitos y macrófagos, quienes, junto con los monocitos circulantes, van a comenzar a secretar citoquinas, principalmente el factor de necrosis tisular alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), favoreciendo la activación y proliferación inicial de las CS. Por otro lado, esa liberación de citoquinas por parte de los leucocitos residentes, tales como TNF- α o la proteína inflamatoria de macrófago-2 (MIP-2), también van a servir de quimioatrayentes y promover la infiltración rápida del tejido dañado por neutrófilos circulantes y, en menor medida, eosinófilos. Estos neutrófilos van a crear un estado proinflamatorio necesario para la eliminación de los desechos celulares y van a secretar, entre otros factores, la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) o ligando-2 de quimiocina (CCL2) y la proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa (MIP-1a) también conocida como ligando-3 de quimiocina (CCL3). Tanto CCL2 como CCL3 van a favorecer el reclutamiento de monocitos que se diferenciarán en macrófagos una vez invadan el tejido y se convertirán en la célula inflamatoria predominante tras 24 horas de la lesión (121). Se diferencian dos subtipos de macrófagos. En un primer lugar van a predominar los macrófagos proinflamatorios o M1 que son importantes en la inducción de la proliferación de los PM al secretar citoquinas proinflamatorias como interleucina-1B (IL-1B), IL-6 y TNF- α . Posteriormente, van a predominar los macrófagos M2 o

1. INTRODUCCIÓN

antiinflamatorio, quienes van a ser importantes en la diferenciación de los mioblastos a miotubos y miofibrillas. Es decir, tanto los macrófagos M1 como los M2 van a ser importantes en el proceso de regeneración muscular y en la proliferación y diferenciación de las CS. Los macrófagos M2 también se conocen como profibróticos dado que secretan una mayor cantidad de colágeno-VI (col-VI) y fibronectina que los macrófagos M1, y además activan la proliferación de fibroblastos a través del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), como se explicará a continuación (122).

1.3.2.3. Las células progenitoras fibro-adipogénicas.

Otras células no miogénicas involucradas de forma importante en la regeneración del músculo esquelético son los progenitores fibro-adipogénicos (FAPs). Las FAPs fueron descritas por primera vez en el 2010 y se consideran unos de los reguladores maestros de la regeneración del músculo esquelético (123,124).

Las FAPs son una población de células multipotenciales que pueden diferenciarse en fibroblastos, adipocitos o en osteocitos según los estímulos que reciban y el microambiente en el que se encuentren. Estas células se pueden identificar por la expresión en membrana del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (PDGFR α) y el antígeno-1 de célula madre (Sca-1) (125).

En el músculo sano las FAPs se encuentran en reposo en el intersticio muscular, tras una lesión muscular se produce una activación y proliferación de éstas. Esta proliferación inicial de las FAPs se produce de manera rápida y precoz, de forma que en los primeros días tras el daño muscular la ratio FAP/CS aumenta considerablemente (126). Tras la proliferación, las FAPs indiferenciadas van a tener efectos positivos en la proliferación de los mioblastos y CS activadas secretando moléculas como IL-6. Además, van a ser importantes en la diferenciación de los mioblastos así como el crecimiento de las miofibrillas por la liberación de la folistatina o del factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) (125).

1. INTRODUCCIÓN

Tras la proliferación, las FAPs pueden diferenciarse en adipocitos lo cual está controlado por diversos factores entre los que está el óxido nítrico (NO), pero la diferenciación de FAP en adipocitos esta inhibida durante la regeneración muscular tanto por señales de las fibras musculares intactas como por la secreción de IL-4 por parte de los eosinófilos, que también estimula la proliferación de las FAPs (127). Por otro lado, las FAPs se pueden diferenciar en miofibroblastos, expresando el *α -smooth muscle actin* (α -SMA), lo que va a ayudar a producir nueva MEC a través de la secreción de colágeno-I (col-I) y fibronectina (Fn) fundamentalmente. Esta diferenciación de las FAP a miofibroblasto, generalmente se produce en situaciones de enfermedad y está motivada principalmente por el TGF- β liberado por los macrófagos M2. Recientemente, se ha descrito que las FAPs también pueden diferenciarse en osteocitos o condrocitos, bajas estímulos particulares como la proteína morfogénica del hueso-2 (BMP-2). El papel de esta capacidad de diferenciación de las FAPs en la regeneración muscular está actualmente por determinar (128). Por último, tras la proliferación y diferenciación de las FAPs, se va a producir una apoptosis gradual de las FAPs no diferenciadas hasta llegar nuevamente al número basal de células FAPs presentes en el músculo. Este proceso de apoptosis está regulado principalmente por el TNF- α liberado por los macrófagos M1, y es fundamental para evitar depósito excesivo de MEC y la generación de fibrosis muscular (129) (**Figura 10**).

Por lo tanto, aunque los FAPs no tengan capacidades miogénicas *per se*, van a ser necesarios para mantener la reserva y modular la activación y proliferación de las CS, así como el crecimiento de miofibrillas, y en la remodelación de la nueva MEC del músculo regenerado.

1. INTRODUCCIÓN

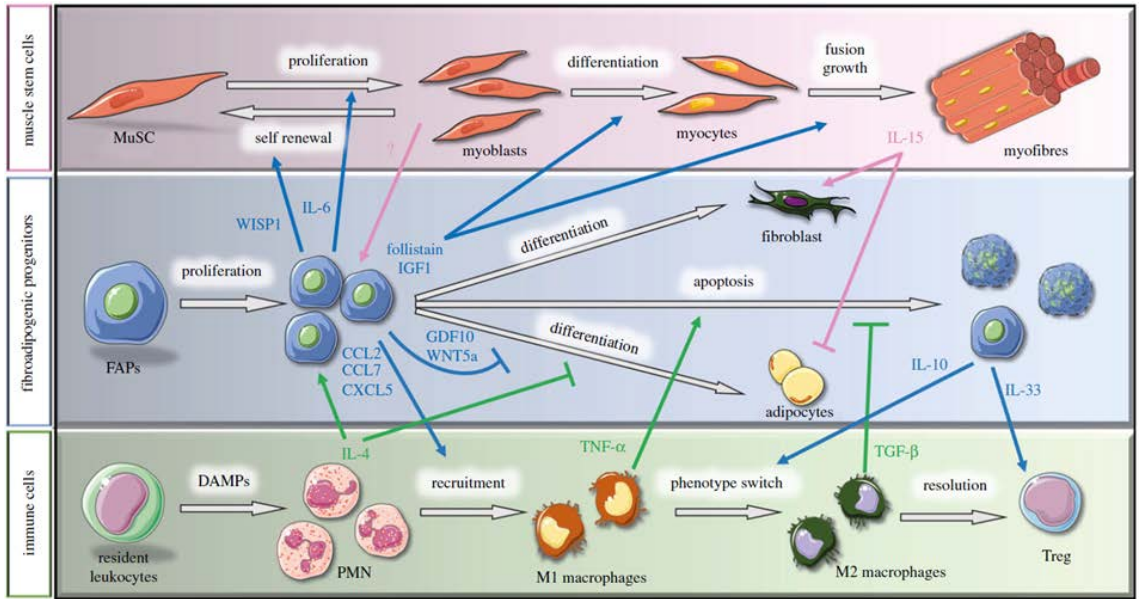


Figura 10. Representación gráfica de la interacción celular durante la regeneración

muscular. Se muestra la interacción entre las células satélite (MuSC), los progenitores fibroadipogénicos (FAPs) y las células del sistema inmune. *Figura adaptada de Thomas Molina et al., 2021 (125).*

1.3.2.4. La matriz extracelular

La MEC forma hasta el 10% del peso muscular y juega un papel principal en la transmisión de fuerza, pero también en el mantenimiento y reparación de las fibras musculares después de una lesión, por lo tanto, al igual que los protagonistas de los apartados anteriores, tiene un papel fundamental en la regeneración muscular tras un daño muscular (109).

Tras un daño el tejido muscular se forma un hematoma y una infiltración por células inflamatorias. La fibrina y la fibronectina que se extravasa al tejido muscular se une al colágeno-I y colágeno-III producido por los fibroblastos residentes formándose una nueva y temporal MEC (130). Además, junto con los fibroblastos residentes, las FAPs se van a activar, proliferar y diferenciar en miofibroblastos colaborando en la formación de

una MEC temporal. Este depósito de MEC temporal está condicionado por la presencia de factores de crecimiento como el TGF- β o el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). Esta MEC temporal generará un microambiente idóneo para la proliferación y diferenciación de los mioblastos, así como de soporte para las nuevas fibras musculares regenerantes (131). Además, el colágeno-VI, el mayor componente de la MEC, mantiene la reserva de CS durante la regeneración muscular (132).

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs), son un grupo de enzimas proteolíticas que van a tener un papel esencial en la regeneración muscular (133). Estas enzimas se producen por las fibras musculares dañadas y por las células infiltrantes, y tienen la habilidad de degradar los componentes MEC. Esta degradación de la MEC va a permitir que se facilite la llegada nuevas células inflamatorias y va a permitir que las CS activadas puedan migrar por el tejido muscular hacia la zona dañada para proceder a la miogénesis. Además, con la apoptosis progresiva de las FAPs disminuirá la producción de nueva MEC y facilitará la remodelación por parte de las MMPs (134). Finalmente, tras la miogénesis y la remodelación de la nueva MEC, se inicia el proceso de angiogénesis que facilitará el desarrollo de una nueva red vascular en el sitio de la lesión, mientras las nuevas fibras musculares formadas continúan con su crecimiento y maduración (135).

El balance entre la producción y degradación de la MEC es esencial para una regeneración muscular completa y eficiente, al contrario de lo que ocurre en las distrofias musculares como se comentará en los siguientes apartados.

1.3.3. Regeneración muscular en las distrofias musculares

En la mayoría de las distrofias musculares, como ocurre en las sarcoglicanpatías, se produce una mutación que afecta a una de las proteínas que forman parte del DGC, el cual forma un vínculo entre el citoesqueleto de la fibra muscular y la MEC, siendo esencial para la estabilidad del sarcolema y resistencia al daño que se produce durante la

1. INTRODUCCIÓN

contracción muscular continuada. Las 4 proteínas del SG, como se explicó previamente, forman un tetrámero en el sarcolema y forma parte del DGC. Una mutación en cualquiera de los 4 tipos de SG produce una disrupción del complejo de sarcoglicano condicionando una mayor fragilidad del sarcolema pudiendo producir una ruptura del sarcolema tras cada contracción muscular. Esta ruptura del sarcolema, produce un aumento de la entrada de calcio a la fibra muscular y un daño focal o difuso de la fibra muscular (136).

Como se ha descrito, el fenómeno de regeneración muscular requiere de la intervención de una serie secuencial y orquestada de varios eventos con múltiples protagonistas involucrados. Sin embargo, en el caso de las sarcoglicanopatías, al igual que ocurre en otras distrofias musculares, la inestabilidad y fragilidad basal del sarcolema va a propiciar un daño muscular continuo de la fibra muscular y una activación crónica de los mecanismos de regeneración muscular. Dado que las fibras regeneradas retienen el defecto molecular subyacente también van a presentar una mayor fragilidad a la ruptura y se van a producir ciclos constantes de degeneración-regeneración muscular junto con inflamación muscular crónica.

Estos ciclos continuos de daño y degeneración-regeneración muscular, va a generar una desregulación del complejo proceso de regeneración muscular provocado por varios factores: 1) persistencia crónica del daño del tejido muscular; 2) reclutamiento continuo e infiltración crónica de células inflamatorias que liberan factores de crecimiento y citoquinas; 3) activación y proliferación de FAPs y fibroblastos productores de MEC; 4) cambios cuantitativos y cualitativos de la MEC, que van a limitar la capacidad de reparación tanto por motivos mecánicos como de espacio. Finalmente, como resultado de la degeneración e inflamación crónica, el tejido muscular se va a ir sustituyendo progresivamente por un tejido fibroso y adiposo (**Figura 11**).

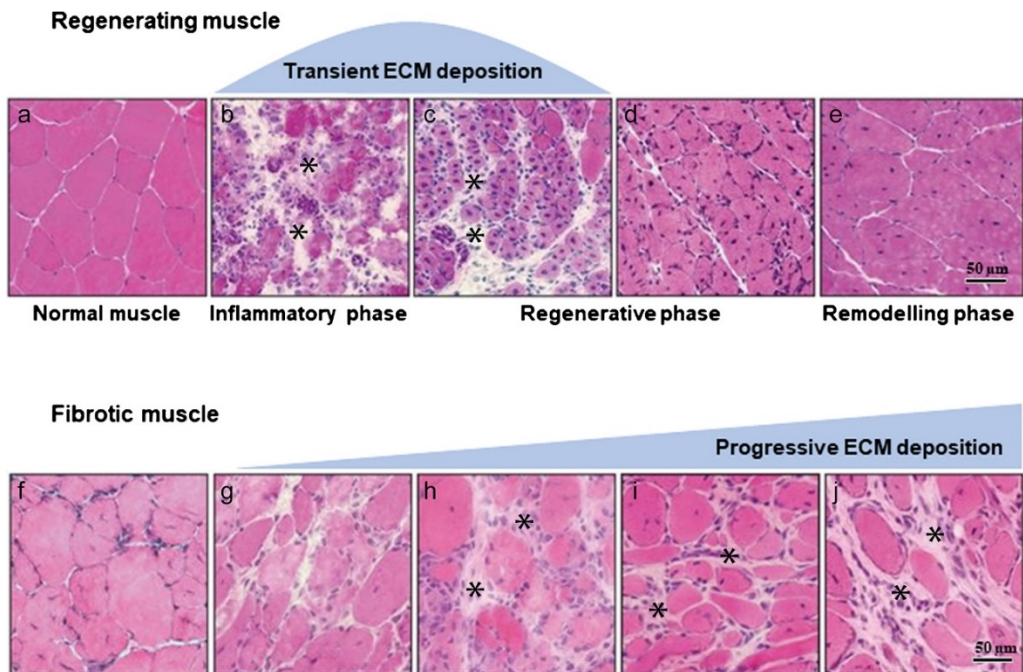


Figura 11. Representación esquemática del depósito de MEC durante la regeneración muscular. En el panel superior se observa el proceso de regeneración muscular en un músculo sano, con un aumento transitorio de MEC. En el panel inferior, se observa el acúmulo progresivo y sustitución por tejido fibro-adiposo que ocurre en las distrofias musculares. *Figura adaptada de Mann et al, 2011 (137).*

Con el paso del tiempo, se produce un agotamiento de las CS que son incapaces de reparar y regenerar de forma completa el tejido muscular, dando lugar a una remodelación y acumulación progresiva de los componentes de la MEC. Se produce un círculo vicioso de retroalimentación, donde el aumento de la MEC va reemplazando al músculo funcional y finalmente va a predominar la fibrosis en lugar de tejido muscular contráctil, lo que a su vez va a dificultar la migración de las CS activadas hasta el lugar de lesión. Todo este proceso se traducirá clínicamente en una debilidad muscular progresiva.

1. INTRODUCCIÓN

1.3.3.1. Fibrosis muscular en las distrofias musculares

El proceso de fibrosis muscular en las distrofias musculares está mediado por la acumulación de factores de crecimiento y citoquinas, así como la interacción y “conversación” entre los diferentes tipos celulares involucrados en el proceso fisiológico de regeneración muscular, el cual se encuentra desregulado en las distrofias musculares, como ocurre en los sarcoglicanos. En la **Figura 12**, puede observarse una representación gráfica de este complejo proceso, el cual describiremos con mayor profundidad en los próximos párrafos de este apartado.

Uno de los factores profibrogénicos más importantes es el TGF- β . El TGF- β es liberado principalmente por los macrófagos M2 presentes en el nicho de regeneración. Esto va a producir una activación constante de los fibroblastos, así como una inhibición de la apoptosis de las FAPs promoviendo su diferenciación en miofibroblastos. Los fibroblastos activados por el TGF- β comenzarán a producir proteínas de la MEC, como colágeno y fibronectina. La vía de principal de activación del TGF- β para mediar sus efectos profibróticos, es mediante la fosforilación y activación de la vía *Mother Against Decapentaplegic Homolog 2 y 3* (Smad 2 y Smad3), aunque puede activar otras vías no canónicas para mediar sus efectos fibrogénicos. Además, el TGF- β aumenta la secreción de inhibidores de metaloproteasas (TIMP) y del inhibidor del activador del plasminógeno-I (PAI-I), lo que genera una inhibición de la degradación de la MEC por parte de las MMPs. En conjunto, esto dará lugar a un aumento y expansión progresiva de la MEC.

Otro factor que induce la fibrosis muscular e inhibe la miogénesis es el CTGF, el cual se encuentra elevado en pacientes y en diferentes modelos animales de distrofias musculares (138). El CTGF se expresa en presencia del TGF- β y amplifica los efectos fibróticos induciendo la expresión de colágeno-I, colágeno-III, fibronectina e integrinas de manera más eficiente que TGF- β (130). Por tanto, tanto TGF- β como CTGF, bloquean la reparación muscular al promover la fibrosis en las distrofias musculares. La decorina

1. INTRODUCCIÓN

es una molécula que actúa regulando negativamente la expresión de CTGF, y en menor medida de TGF- β , por lo que tiene un papel de protección frente al desarrollo de la fibrosis (130).

El sistema renina-angiotensina (RAS) también se encuentra involucrado en el proceso fibrótico en el músculo distrófico modulado por la señal del TGF- β . De hecho, la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se encuentra elevada en pacientes con DMD (139). En este sistema, que es fundamental para la regulación de la presión arterial, la renina modula el paso de angiotensinógeno a angiotensina I, para convertirse posteriormente en angiotensina II a través de la acción de la ECA. Es conocido que la angiotensina II tiene una acción profibrótica en diversos órganos (140), de hecho el tratamiento con lisinopril, un inhibidor de la ECA, o con losartán, un bloqueador del receptor de la angiotensina II, mejoró la fibrosis cardíaca pero no en el músculo esquelético en el ratón *mdx*, un modelo murino de DMD (141,142); sin embargo un ensayo clínico mostró que, aunque el tratamiento con losartán durante un año mejoró significativamente la función cardíaca de pacientes con DMD, no tuvo impacto en la fibrosis muscular (143). Por lo tanto, puede ocurrir que aunque el sistema RAS contribuye a la fibrosis es probable que las acciones profibróticas sean eclipsadas por TGF- β , o que en realidad no influya en el proceso de fibrosis muscular en humanos.

El infiltrado inflamatorio crónico va a jugar un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis muscular. Por un lado, los eosinófilos van a producir interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13), que inducen la conversión de los macrófagos hacia el fenotipo M2 profibrótico. Los macrófagos M1, por la secreción de IL-6, dan soporte proliferativo para las células satélite, sin embargo mantienen la inflamación crónica contribuyendo también a la fibrogenesis. El equilibrio entre los macrófagos M1 y M2 va a modular el destino final de las FAPs. La activación persistente de macrófagos M1, con la producción de TNF- α va a inducir la apoptosis de las FAPs; mientras que los macrófagos M2, con la producción de TGF- β , van a modular la proliferación y diferenciación de las FAPs hacia

1. INTRODUCCIÓN

miofibroblastos y perpetuar el proceso fibrótico. El aumento de IL-4 y IL-13 por el infiltrado inflamatorio persistente, va a producir que el equilibrio entre macrófagos M1 y M2, se decante a favor de los M2 y se favorezca así la fibrosis muscular.

Otra familia de factores de crecimiento que induce la fibrosis muscular es la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que incluye PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC y PDGF-DD. Sin embargo, PDGF-AA y PDGF-BB son los que se han relacionado específicamente con las distrofias musculares (144,145) u otras miopatías como la enfermedad de Pompe (146). Estos factores de crecimiento están producidos por diversas células, como macrófagos o células endoteliales, y activan las vías de señalización no canónica c-abl, activada también por el TGF- β , para inducir la fibrógenesis (147). La expresión del PDGF está inducida principalmente por el TGF- β , pero también por el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el TNF- α (148). Los distintos tipos de PDGF se unen a los receptos PDGFR α y PDGFR β , los cuales se dimerizan tras la unión del ligando y activan un dominio tirosina cinasa intracelular. Tras la activación, mediante fosforilación de este dominio tirosina cinasa, se inicia la cascada de transducción de la señal y activación de las vías de señalización c-abl para mediar los efectos profibróticos y promover la proliferación de fibroblastos y su diferenciación en miofibroblastos (149).

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), es un factor de crecimiento estrechamente relacionado con la angiogénesis en diversos tejidos, incluido en el músculo esquelético, sin embargo también hay estudios que indican que podría estar implicado en la regeneración muscular. Por un lado, se ha visto observado en un modelo murino que el VEGF se expresa en las CS quiescentes en situaciones de normoperfusión; y además en las fibras regenerantes tras someter el músculo a un proceso de isquemia (150). Sin embargo, la exposición crónica a VEGF ha mostrado tener efectos profibróticos. Por ejemplo, se ha observado que fibroblastos aislados de músculos distróficos del ratón *mdx* tratados con VEGF presentan un aumento de expresión de fibronectina, así como

1. INTRODUCCIÓN

de α -SMA lo que implica la diferenciación en miofibroblastos (151). Además, la transferencia intramuscular mediante rAAV con VEGF en los músculo de las extremidades posteriores de un conejo después de un año, mostró no sólo un aumento significativo de la neovascularización, sino además una gran infiltración muscular de macrófagos y un aumento de la MEC en forma de fibrosis muscular (152). Por lo tanto, en situaciones de activación de la cascada fibrótica y niveles persistentes de VEGF podría provocar una activación y proliferación de fibroblastos colaborando al proceso de expansión del tejido fibrótico en las distrofias musculares.

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), son otros factores de crecimiento que han demostrado inducir la proliferación de los fibroblastos in vitro y podrían estar también implicados en el mecanismo de fibrosis muscular (135).

La miostatina, un miembro de la superfamilia del TGF- β , es un inhibidor del aumento de la masa muscular (153) que se ha observado que está involucrada en la generación de fibrosis muscular, dado que induce la síntesis de TGF- β y a través de los receptores de activina IIB (ActR-IIB) activa las vías de señalización Smad2 y Smad3 que generan la expresión de genes profibróticos e induce la proliferación de fibroblastos (154). Existe una relación estrecha entre la miostatina y el TGF- β , de forma que una elevación crónica de TGF- β puede actuar induciendo la apoptosis de los miofibroblastos y provocando que aumenten la expresión de miostatina, actuando conjuntamente bloqueando la diferenciación de los miofibroblastos y contribuyendo así al proceso de fibrosis muscular (155).

1. INTRODUCCIÓN

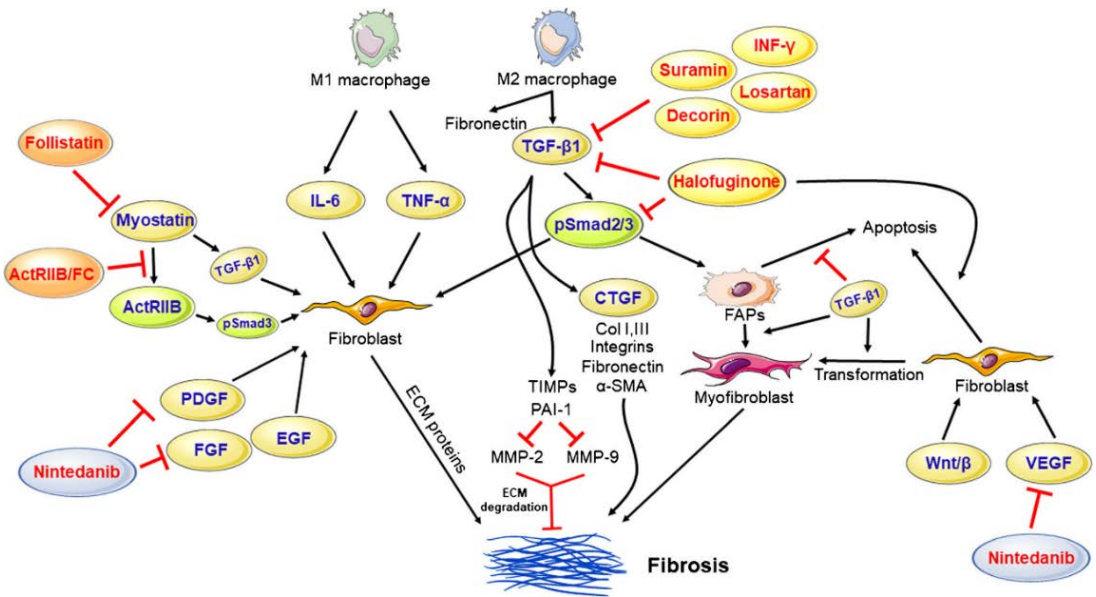


Figura 12. Representación esquemática de citoquinas y factores de crecimiento involucrados en la fibrosis muscular en las distrofias musculares y lugar de actuación de diferentes aproximaciones terapéuticas. Las diferentes aproximaciones terapéuticas con fármacos antifibróticos en distrofias musculares se discutirán a continuación. Figura adapta de Mohamed A. A. Mahdy, 2018 (135).

1.3.4. Estrategias para disminuir la fibrosis muscular en las distrofias musculares

El aumento del conocimiento sobre la fisiopatología de la regeneración y fibrosis muscular en las distrofias musculares ha generado que el tratamiento con fármacos antifibróticos, que bloqueen o aminoren el proceso de fibrosis muscular, sea una estrategia ampliamente estudiada de tratamiento en las distrofias musculares. Hay que considerar que la mayoría de los ensayos con este tipo de fármacos se han realizado en modelos preclínicos o en pacientes con DMD; y aunque las sarcoglicanopatías comparten, a grandes rasgos, el mecanismo fisiopatológico de fibrosis muscular con la DMD, en la actualidad no se ha evaluado la posible eficacia de la mayoría de estos fármacos o

estrategias antifibróticas en las sarcoglicanopatías. A continuación, se describirán las distintas estrategias y tratamientos antifibróticos que se han llevado a cabo en modelos preclínicos y clínicos de distrofias musculares.

1.3.4.1. Inhibición de la vía de señalización de TGF- β

Dado que la vía de señalización de TGF- β es el principal mediador en el desarrollo de fibrosis, la mayoría de las estrategias antifibróticas se centran en modular esta vía (156). Se han evaluado pequeñas moléculas que tienen una actividad inhibitoria del TGF- β . Por ejemplo, suramin es un inhibidor directo del TGF- β ha mostrado efectos antifibróticos, mejorar la fuerza muscular y proteger del daño inducido por el ejercicio en ratones *mdx* (157,158).

Otra molécula con propiedades anti-TGF- β es la decorina. Como se comentó previamente la decorina actúa inhibiendo la acción profibrótica de TGF- β y de CTGF. Se ha evaluado que la administración de decorina mejora la regeneración muscular en un modelo murino de fibrosis muscular y además ha demostrado tener un efecto antifibrótico al disminuir la expresión de colágeno-I en el ratón *mdx* (135,159).

La halofuginona (HT-100), es otra pequeña molécula que bloquea la activación de Smad3 por parte de TGF- β , y por lo tanto la expresión de colágenos y otros genes profibróticos. Los estudios preclínicos en el ratón *mdx* tuvieron muy buenos resultados en reducir la fibrosis y mejorar la activación de las CS en el músculo esquelético y cardiaco (160). Sin embargo, el ensayo clínico fase I/II en pacientes con DMD, a pesar de reducir la fibrosis de forma significativa y mejorar la fuerza muscular, se suspendió de forma precoz por reacciones adversas graves después de fallecer un paciente, que se situaba en el grupo de dosis alta, 2 semanas después de haber recibido última dosis del fármaco (NCT02525302).

La inhibición del sistema RAS, que bloquearía secundariamente al TGF- β , con el uso de losartán o linisopril, como se comentó previamente, ha mostrado algunos efectos

1. INTRODUCCIÓN

beneficiosos aunque sobre todo a nivel de la funcionalidad cardiaca, también en la musculatura esquelética en pacientes con DMD (143).

1.3.4.2. Inhibición de la vía de señalización de CTGF

Como se ha comentado previamente, otra vía importante en el proceso de fibrosis muscular es la vía de CTGF, la cual potencia el efecto profibrótico del TGF- β .

Pamrevlumab (FG-3019) es un anticuerpo monoclonal humanizado que bloquea el CTGF. En modelos preclínicos con ratones *mdx*, los ratones tratados tuvieron mejor función muscular en las pruebas físicas y en las pruebas de fuerza muscular, y además mejoraron la degeneración y fibrosis muscular (161). Estos resultados llevaron al desarrollo de un ensayo clínico fase 2 en pacientes con DMD no ambulantes (NCT02606136) que no mostró reacciones adversas severas, por lo actualmente se está desarrollando un ensayo clínico fase 3 frente a placebo en pacientes con DMD ambulantes (NCT04632940) y no ambulantes (NCT04371666).

Pamrevlumab también ha sido evaluado recientemente como tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), una enfermedad pulmonar en lo que predomina el componente fibrótico como ocurre en las distrofias musculares. Los resultados del ensayo clínico fase II mostraron que pamrevlumab fue bien tolerado y mostró una disminución de la progresión de la enfermedad frente al placebo (162). Estos resultados le otorgaron la aprobación por parte de la *Food and Drug Administration* (FDA) americana, a la espera de los resultados del ensayo fase III que está actualmente en marcha, con la designación de *Fast Track*, es decir una asignación de revisión acelerada que se asigna a medicamentos para tratar enfermedades graves sin tratamiento óptimo con el objetivo de que el tratamiento pueda estar disponible para el paciente de forma precoz.

La similitud en la fisiopatología de la expansión del tejido fibrótico entre la IPF y las distrofias musculares, hacen que este fármaco sea un buen candidato de tratamiento antifibrótico en el futuro en las distrofias musculares.

1.3.4.3. Inhibidores de la vía de la miostatina

Como se comentó previamente, la miostatina es un regulador negativo de la masa muscular y actúa induciendo la síntesis de TGF- β y a través del receptor ActR-IIb activando la vía de señalización Smad2 y Smad3 promoviendo la fibrosis muscular. Se ha documentado que mutaciones que producen una ausencia de miostatina en el ganado bovino azul belga se asocia a un aumento considerable de la fuerza y masa muscular (163). También se ha descrito un niño de una familia con mutaciones en la miostatina que presentaba hipertrofia muscular y un aumento de la fuerza muscular (164). Por lo tanto, la inhibición de la miostatina se muestra como una estrategia terapéutica contra la atrofia y debilidad muscular junto con el potencial adicional de poder contrarrestar la fibrosis muscular en las distrofias musculares.

La evaluación de inhibición de la miostatina se ha realizado a través de la folistatina, un inhibidor endógeno de la miostatina; o bloqueando el receptor ActR-IIb. La folistatina administrada de forma intramuscular a través de un rAAV ha demostrado un aumento persistente de la masa y fuerza muscular en ratones y en macacos, así como en el ratón *mdx* mejorando también la histología muscular en este último (165,166). Estos resultados propiciaron el desarrollo de un ensayo clínico fase I-IIa en pacientes con distrofia muscular de Becker (BMD) administrando un rAAV con folistatina mediante una inyección intramuscular en el cuádriceps. Los resultados mostraron una mejoría del 6MWT en la mayoría de los pacientes (4 de 6 pacientes), así como una hipertrofia muscular junto con una disminución de la fibrosis muscular (167). Actualmente está en marcha un ensayo clínico fase I/II en pacientes con DMD mayores de 7 años donde se

1. INTRODUCCIÓN

administra la follistatina en los músculos glúteos, cuádriceps y tibial anterior (NCT02354781).

Las técnicas de inhibición de la miostatina se han aplicado en modelos preclínicos de sarcoglicanopatías con resultados contradictorios. En el ratón *Sgca*^{-/-}, modelo murino de α -SG, el tratamiento no mostró un aumento de la masa ni del peso del animal, lo cual se atribuyó a una mayor gravedad del fenotipo distrófico del *Sgca*^{-/-} en relación con el ratón *mdx* o con el modelo murino de calpainopatía, otro tipo de distrofia muscular, en los cuales si se obtuvieron resultados positivos (168). La misma estrategia se usó en el ratón *Sgcg*^{-/-}, modelo murino de γ -SG, mostrando una mejoría de la función muscular, aunque no de la fibrosis y degeneración muscular (169). En el ratón *Sgcd*^{-/-}, modelo murino de δ -SG, también se evaluó la eficacia del bloqueo de miostatina, encontrándose una mejoría de la masa muscular, así como de la regeneración y fibrosis muscular cuando se administraba a las 4 semanas de vida; sin embargo cuando el tratamiento se administraba a las 20 semanas no se observó una mejoría significativa (170). Los resultados obtenidos en la forma tardía del ratón *Sgcd*^{-/-} y en el ratón *Sgca*^{-/-}, ambos con fenotipos de distrofia muscular más graves que el ratón *mdx*, podrían poner de manifiesto la limitación del uso de este tipo terapias en las sarcoglicanopatías.

Otra estrategia para inhibir la actividad de la miostatina se basa en usar un ligando soluble del ActR-IIIB, que secuestre la miostatina e impida realizar su mecanismo de acción. Este mecanismo ha demostrado que reduce la proliferación e induce la apoptosis de fibroblastos de músculos distróficos, mejorando además la fibrosis muscular en el modelo *mdx* (171). En este sentido se realizó un ensayo clínico fase I/II con la molécula ACE-031, un ligando del ActR-IIIB, administrado de forma subcutánea en pacientes con DMD. Aunque observó una tendencia en la mejoría del 6MWT y en el aumento de masa muscular respecto al placebo, pero tuvo que detenerse precozmente por problemas de seguridad por epistaxis y telangiectasias, que se asociaron a que el ligando de ActR-IIIB se podría unir y bloquean otros ligando como otras activinas o las proteínas

morfogénicas del hueso (BMP), como la BMP-9 y BMP-10 que están relacionadas con la angiogénesis (172). Otra molécula similar, la ACE-083, se evaluó en un ensayo fase II en pacientes con FSH-I. La molécula se administró intramuscular en el bíceps braquial (BB) y tibial anterior (TA) y evitó los efectos adversos previamente reportados con otros tipos ligandos del ActR-IIIB. Este estudio mostró, mediante estudio con MRI, un aumento del volumen muscular total en BB y en TA, aunque sólo una disminución de la fracción grasa muscular en el TA. Por otro lado, el ensayo no logró ninguna mejora funcional en las escalas realizadas por lo que tuvo que suspenderse (173). Actualmente, dado el potencial efecto en aumentar la masa muscular de esta estrategia de bloqueo de la miostatina a través de un ligando del receptor ActR-IIIB se está evaluando su utilidad en la caquexia y pérdida de masa muscular tanto de origen tumoral o tras viajes espaciales en modelos murinos (174,175).

1.3.4.4. Inhibición de la vía de señalización de PDGF

La familia de PDGF, como se explicó previamente, está involucrada en el proceso de la fibrosis muscular en las distrofias musculares al ser producidos por diversas células e inducida por TGF- β . La familia de PDGF está implicada también en otros procesos como el desarrollo embrionario o la angiogénesis, y además se ha asociado con el desarrollo de determinados tipos de cáncer, motivo por el cual la inhibición de esta vía de señalización se ha utilizado en el desarrollo de terapias anti-tumorales (176).

El bloqueo de la vía del PDGF se puede realizar de diversas maneras: 1) En primer lugar se puede bloquear mediante anticuerpos neutralizantes que actúen directamente contra el PDGF evitando que se una a su receptor; 2) También se pueden utilizar anticuerpos neutralizantes que actúen bloqueando el receptor, el PDGFR; 3) Por último, el uso de inhibidores de tirosina cinasa de bajo peso molecular que bloquean la activación de la función enzimática del dominio intracelular tirosina cinasa y por lo tanto, la señalización de los PDGFR (177).

1. INTRODUCCIÓN

Imanitib, es un inhibidor tirosina cinasa que bloquea la actividad de *c-abl*, que ha demostrado que reduce la fibrosis muscular en varios modelos murinos de DMD aunque asociando una importante pérdida de peso en los ratones tratados (178,179). Además, el tratamiento también aumenta la apoptosis de las FAPs y reduce la proliferación y diferenciación fibrogénica, con el consecuente menor depósito de colágeno y fibrosis muscular (180). Nilotinib, crenolanib y nintedanib son otros inhibidores tirosina cinasa que han mostrado resultados similares reduciendo la fibrosis muscular y mejorando la función muscular en el ratón *mdx*, y ejerciendo también su acción reguladora de la actividad de las FAPs (181–183). Aunque estos fármacos pudieran tener un efecto beneficioso, en el momento actual no hay ningún ensayo clínico en marcha y a su vez no se ha comprobado su posible efecto antifibrótico en otras distrofias musculares como son las sarcoglicanopatías. Se profundizará acerca del nintedanib en el siguiente apartado de esta tesis.

1.3.5. Nintedanib

Nintedanib es un inhibidor tirosina cinasa de segunda generación que se dirige contra el receptor α y β de PDGF (PDGFR α y PDGFR β), al receptor del FGF 2 y 3 y contra el receptor del VEGF 1-3 (184).

Nintedanib, previamente conocido como BIBF-1120, fue desarrollado por la empresa alemana Boehringer Ingelheim® inicialmente diseñado como un tratamiento antitumoral por sus posibles efectos anti-angiogénicos al inhibidor el VEGF y FGF, ambos factores de crecimiento que se han asociado con la angiogénesis y expansión y crecimiento de la patología tumoral (185). De hecho, varios ensayos clínicos obtuvieron resultados beneficiosos en diversos tumores sólidos, como el cáncer de ovario, de colon y recto o de próstata (186). También demostró su efectividad frente al cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) para el cual consiguió la aprobación por parte de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) como tratamiento de segundo nivel (187).

1. INTRODUCCIÓN

Además, al actuar también inhibiendo el PDGF, se ha demostrado que nintedanib posee un efecto antifibrótico al reducir la proliferación y diferenciación de fibroblastos en modelos murinos de fibrosis pulmonar (188), así como de fibroblastos de pacientes con CPCNP y IPF, tanto de forma basal como tras la inducción de la fibrosis con TGF- β (189,190).

El efecto antifibrótico de nintedanib en la IPF fue evaluado en dos ensayos clínicos fase III replicados (NCT01335464 y NCT01335477) donde nintedanib produjo una reducción de la progresión de la enfermedad en los pacientes tratados al mejorar la función pulmonar, evaluada por la capacidad vital forzada (FCV), así como una disminución de las exacerbaciones agudas. Además el perfil de seguridad fue favorable, siendo los eventos adversos más frecuentes de tipo gastrointestinal como vómitos, náuseas, dolor abdominal y diarrea, que fue el evento adverso más frecuente presente de intensidad leve o moderada en el 4,3% de los pacientes que recibieron nintedanib (191). Tras los resultados de estos ensayos clínicos, en 2015 nintedanib recibió la aprobación tanto de la EMA como de la FDA y fue comercializado con el nombre de OFEV® como tratamiento para la IPF. Posteriormente, también se ha comprobado la eficacia de nintedanib en pacientes con estadios más avanzados de IPF, donde existe un mayor componente fibrótico (192).

El efecto antifibrótico de nintedanib también se ha evaluado en otras enfermedades donde la fibrosis es uno de los componentes principales. Este es el caso de la esclerodermia o esclerosis sistémica donde puede existir una enfermedad intersticial pulmonar asociada (EPI-SS) y donde nintedanib ha demostrado en un ensayo clínico fase III ser eficaz en disminuir la pérdida progresiva de la función pulmonar evaluada mediante la FCV (193); y además mejorar algunos parámetros específicos de la esclerosis sistémica, sobre todo en pacientes con una esclerosis sistémica difusa (194). Existen otras enfermedades que pueden producir una fibrosis pulmonar progresiva, como puede ser la artritis reumatoide (AR), la enfermedad mixta del tejido conectivo, la neumonitis por

1. INTRODUCCIÓN

hipersensibilidad crónica o la enfermedad pulmonar intersticial autoinmune, entre otras. Para estos pacientes se realizó un ensayo clínico fase III donde se demostró la eficacia de nintedanib en reducir la progresión de la enfermedad y disminuir la pérdida de FVC tras 52 semanas de seguimiento (195). Los resultados de estos ensayos clínicos le han otorgado actualmente a OFEV® la indicación también para el tratamiento en pacientes con EPI-SS y en pacientes con una enfermedad pulmonar intersticial fibrosante crónica. Un estudio reciente también demostró que los pacientes con una neumonía por COVID-19 que requerían de ventilación mecánica, el uso de nintedanib se asociaba a una menor severidad y un menor porcentaje de afectación pulmonar evaluada mediante tomografía computarizada (TC) (196).

Los resultados en los diversos estudios y ensayos clínicos llevados a cabo con nintedanib en la fibrosis pulmonar de distintos orígenes ponen de manifiesto el poder global de nintedanib en reducir el proceso fibrótico en enfermedades cuyo mecanismo fisiopatológico de la fibrosis sea similar. Por este motivo se ha evaluado la eficacia de nintedanib en distintos modelos preclínicos de fibrosis en diferentes órganos y enfermedades. Por ejemplo, se ha demostrado que nintedanib tiene un efecto antifibrótico y anti-inflamatorio en un modelo murino de fibrosis hepática (197,198) y en un modelo murino de esteatosis hepática no alcohólica (199). Nintedanib también ha demostrado su eficacia en modelos de fibrosis renal. Por un lado, un modelo murino de enfermedad renal crónica el tratamiento con nintedanib disminuyó la fibrosis renal e inhibió la activación de los fibroblastos intersticiales renales (200). Otro estudio reciente demostró que nintedanib redujo la proliferación celular y la migración de miofibroblastos renales in vitro y redujo significativamente la fibrosis renal en un modelo murino de poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD), una enfermedad genética que se caracteriza por el desarrollo de quistes renales asociados a una fibrosis renal progresiva que destruye el parénquima renal (201). También en un modelo murino de fibrosis peritoneal inducida, nintedanib demostró que inhibe la progresión de la

fibrosis peritoneal al reducir el acúmulo de colágeno I y fibronectina así como la expansión de la MEC (202).

Desde el punto de vista de las distrofias musculares, nintedanib ha demostrado ser eficaz en reducir la proliferación, activación y migración de fibroblastos obtenidos de muestras de biopsias musculares de pacientes con DMD y, además, ha demostrado reducir la fibrosis muscular en el ratón *mdx* de 10 meses de edad (183).

1.4. Modelos animales de sarcoglicanopatías

La disponibilidad de diversos modelos animales de distrofias musculares es fundamental a la hora de estudiar la fisiopatología de cada una de las distrofias musculares, así como para la realización de estudios preclínicos de posibles futuros tratamientos para este tipo de pacientes. Actualmente existen modelos animales para los cuatro tipos de sarcoglicanopatías.

El primero modelo animal de sarcoglicanopatía fue la cepa de hámster Sirio BIO 14.6 que fue descrita en 1962 por Homburger (203). Estos animales presentaban un fenotipo con miopatía, con hallazgos distróficos en la histología, y miocardiopatía que era la responsable de una muerte prematura por necrosis miocárdica progresiva. Sin embargo, no fue hasta 1997 que se identificó que estos animales poseían una delección del exón 1 del *SGCD* y por lo tanto se considera el primero modelo animal de δ -SG y de cualquier tipo de sarcoglicanopatía (204).

Tras el hámster BIO 14.6, se han generado modelos murinos de los cuatro tipos de sarcoglicanopatías (α -SG, β -SG, γ -SG y δ -SG). El ratón *SGCD*^{-/-}, modelo murino de δ -SG, además del fenotipo distrófico en el músculo esquelético desde las 8 semanas de vida, presenta una miocardiopatía de forma precoz, desde las 16 semanas de vida (43). De hecho el *SGCD-null* es considerado un modelo preclínico de miocardiopatía (40).

1. INTRODUCCIÓN

Los ratones *SGCB*^{-/-} y *SGCG*^{-/-}, modelos murinos de β -SG y γ -SG respectivamente, también presentan miocardiopatía y un fenotipo distrófico grave, similar a lo que sucede en la enfermedad humana. Recientemente se ha generado otro modelo murino de γ -SG con una deleción de un nucleótido en el exón 6 dando lugar a la mutación c.525delT. Esta mutación es conocida como la mutación fundadora Magrebí, y es una de las mutaciones más frecuentes en pacientes con γ -SG. Este modelo murino presenta un fenotipo distrófico grave similar a la enfermedad humana, y es una gran oportunidad para la investigación de una posible terapia con *exon skipping* o de salto de exón (205). Esta técnica se basa en el uso de oligonucleótidos antisentido (AON) que corrigen un marco de lectura anómalo que produce una ausencia de expresión de proteína. De esta forma los AON son capaces de empalmar el pre-RNA truncado con la siguiente zona donde se recupere la pauta de lectura del gen, provocando una producción de una proteína de menor longitud pero que puede ser parcialmente funcionante. Este tipo de técnicas se ha usado de forma satisfactoria en la DMD, y actualmente se está explorando en otras enfermedades neuromusculares como son la Enfermedad de Pompe, las disferlinopatías o en la distrofia muscular congénita por laminina- α 2 (206,207). En el caso de la mutación c.525delT es necesario el salto de los exones 4, 5, 6 y 7, generándose una proteína denominada "Mini-gamma" que sólo tiene los exones 2, 3 y 8 pero que ha demostrado que aumenta la expresión de γ -SG en la membrana en fibroblastos aislados de pacientes con LGMDR5 (208).

El ratón *SGCA*-null o *SGCA*^{-/-}, el modelo murino del α -SG, también presenta un fenotipo distrófico grave similar a la enfermedad humana. De hecho, estudios de historia natural realizados en este modelo animal, han demostrado que desde las 8 semanas de vida los ratones presentan un empeoramiento de la función muscular y cambios distróficos en el estudio histológico. Estos hallazgos progresan a lo largo que evoluciona la enfermedad, añadiéndose una afectación respiratoria a partir de la semana 16 de vida. Desde el punto de vista cardiológico, al contrario que ocurre con el resto de modelos murinos de sarcoglicanopatías, no se ha podido constatar alteraciones morfológicas cardiológicas a

1. INTRODUCCIÓN

las 32 semanas de vida, aunque no se han realizado análisis de ratones de edad mayor o estudios funcionales cardiacos con ecocardiografía en estos ratones (42,43,209,210).

En los estudios preclínicos con modelos murinos, es muy importante que el fenotipo se asemeje lo más posible al fenotipo de la enfermedad humana para así poder realizar una traslación al humano con la mayor fiabilidad posible, tanto desde el punto de vista de eficacia como de seguridad. Esto ha sido uno de los principales problemas por lo que muchos tratamientos que han resultado ser efectivo en el modelo murino de DMD, el ratón *mdx*, el modelo de distrofia muscular más usado durante décadas, posteriormente no sido efectivos en el humano, dado que el ratón *mdx* tiene un fenotipo mucho más leve que la enfermedad humana (211). En este sentido, se ha considerado que una de las posibles razones de la menor afectación del ratón *mdx* puede ser la existencia de una expresión residual en la membrana muscular de las proteínas del complejo de sarcoglicano y otros componentes del DGC. De hecho el ratón doble *knock-out* (KO) δ -SG/distrofina, presenta una ausencia de expresión de las proteínas del complejo de sarcoglicano y un fenotipo clínico e histopatológico más severo que el ratón *mdx* (212).

Por todo lo comentado, los modelos murinos de sarcoglicanopatías, pueden considerarse un bueno modelo preclínico de enfermedad, dado que el fenotipo tanto a nivel clínico como histopatológico es bastante similar a la enfermedad humana. Por este motivo, la realización de estudios de historia natural, progresión o enfoques terapéuticos en estos modelos murinos pueden ser de gran utilidad para una posterior traslación de los estudios a pacientes con sarcoglicanopatías.

2. HIPÓTESIS

2.1. Hipótesis general

Las distrofias musculares por déficit de sarcoglicano son un grupo de 4 tipos de distrofias musculares que clásicamente se han asociado con un fenotipo común de debilidad muscular grave de inicio temprano junto con una pérdida de deambulación precoz durante la segunda década de la vida. Sin embargo, se han descrito pacientes que presentan un fenotipo más leve sin que se conozcan qué factores podrían estar involucrados en esta heterogeneidad clínica. La identificación de posibles diferencias clínicas y genéticas entre los distintos tipos de sarcoglicanopatías, así como de factores pronósticos que puedan influir en la progresión de este grupo de enfermedades sería de gran utilidad para el correcto diagnóstico y seguimiento de estos pacientes. Del mismo modo, la identificación de un posible tratamiento que ralentice el proceso de degeneración muscular sería de gran relevancia para poder modificar la historia natural de la enfermedad.

2.2. Hipótesis específicas

- Existen diferencias clínicas y genéticas entre los 4 tipos de sarcoglicanopatías que dependen del tipo de sarcoglicano mutado y/o de los distintos tipos de mutación.
- Existen factores pronósticos que influyen en la heterogeneidad fenotípica y pronóstico de los pacientes con sarcoglicanopatías.
- El tratamiento con el fármaco antifibrótico nintedanib mejora el fenotipo distrófico y reduce la fibrosis muscular de un modelo murino de distrofia muscular con déficit de alfa-sarcoglicanopatía.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Identificar factores pronósticos y de evolución de enfermedad, así como de tratamiento, en los diferentes tipos de distrofias musculares por déficit de sarcoglicanos para mejorar el conocimiento sobre su caracterización clínica, genética y sobre su fisiopatología.

3.2. Objetivos específicos

- Describir las características demográficas, clínicas y genéticas de los pacientes con distrofia muscular secundaria a déficit de sarcoglicano.
- Establecer relaciones clínico-genéticas e identificación de factores pronósticos en pacientes con sarcoglicanopatías.
- Estudiar la eficacia de nintedanib como agente antifibrótico en un modelo murino de alfa-sarcoglicanopatía.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

4.1. Artículo 1

New genotype-phenotype correlations in a large European cohort of patients with sarcoglycanopathy.

Alonso-Pérez J, González-Quereda L, Bello L, Guglieri M, Straub V, Gallano P, Semplicini C, Pegoraro E, Zangaro V, Nascimento A, Ortez C, Comi GP, Dam LT, De Visser M, van der Kooi AJ, Garrido C, Santos M, Schara U, Gangfuß A, Løkken N, Storgaard JH, Vissing J, Schoser B, Dekomien G, Udd B, Palmio J, D'Amico A, Politano L, Nigro V, Bruno C, Panicucci C, Sarkozy A, Abdel-Mannan O, Alonso-Jimenez A, Claeys KG, Gomez-Andrés D, Munell F, Costa-Comellas L, Haberlová J, Rohlenová M, Elke V, De Bleecker JL, Dominguez-González C, Tasca G, Weiss C, Deconinck N, Fernández-Torrón R, López de Munain A, Camacho-Salas A, Melegh B, Hadzsiev K, Leonardis L, Koritnik B, Garibaldi M, de Leon-Hernández JC, Malfatti E, Fraga-Bau A, Richard I, Illa I, Díaz-Manera J.

Brain. 2020 Sep 1;143(9):2696-2708. doi: 10.1093/brain/awaa228. Erratum in: Brain. 2022 Nov 03;: PMID: 32875335.

New genotype-phenotype correlations in a large European cohort of patients with sarcoglycanopathy

Jorge Alonso-Pérez,¹ Lidia González-Quereda,^{2,3} Luca Bello,⁴ Michela Guglieri,⁵ Volker Straub,⁵ Pia Gallano,^{2,3} Claudio Semplicini,⁴ Elena Pegoraro,⁴ Vittoria Zangaro,⁴ Andrés Nascimento,⁶ Carlos Ortez,⁶ Giacomo Pietro Comi,⁷ Leroy ten Dam,⁸ Marianne De Visser,⁸ A.J. van der Kooij,⁸ Cristina Garrido,⁹ Manuela Santos,⁹ Ulrike Schara,¹⁰ Andrea Gangfuß,¹⁰ Nicoline Løkken,¹¹ Jesper Helbo Storgaard,¹¹ John Vissing,¹¹ Benedikt Schoser,¹² Gabriele Dekomien,¹³ Bjarne Udd,¹⁴ Johanna Palmio,¹⁴ Adele D'Amico,¹⁵ Luisa Politano,¹⁶ Vincenzo Nigro,¹⁷ Claudio Bruno,¹⁸ Chiara Panicucci,¹⁸ Anna Sarkozy,¹⁹ Omar Abdel-Mannan,¹⁹ Alicia Alonso-Jimenez,²⁰ Kristl G. Claeys,^{21,22} David Gomez-Andrés,²³ Francina Munell,²³ Laura Costa-Comellas,²³ Jana Haberlová,²⁴ Marie Rohlenová,²⁴ De Vos Elke,²⁵ Jan L. De Bleecker,²⁵ Cristina Dominguez-González,^{4,26} Giorgio Tasca,²⁷ Claudia Weiss,²⁸ Nicolas Deconinck,²⁹ Roberto Fernández-Torrón,³⁰ Adolfo López de Munain,³⁰ Ana Camacho-Salas,³¹ Béla Melegh,³² Kinga Hadzsiev,³² Lea Leonardis,³³ Blaz Koritnik,³³ Matteo Garibaldi,³⁴ Juan Carlos de Leon-Hernández,³⁵ Edoardo Malfatti,³⁶ Arturo Fraga-Bau,³⁷ Isabelle Richard,³⁸ Isabel Illa^{1,4} and Jordi Díaz-Manera^{1,2,5}

Sarcoglycanopathies comprise four subtypes of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies (LGMDR3, LGMDR4, LGMDR5 and LGMDR6) that are caused, respectively, by mutations in the *SGCA*, *SGCB*, *SGCG* and *SGCD* genes. In 2016, several clinicians involved in the diagnosis, management and care of patients with LGMDR3–6 created a European Sarcoglycanopathy Consortium. The aim of the present study was to determine the clinical and genetic spectrum of a large cohort of patients with sarcoglycanopathy in Europe. This was an observational retrospective study. A total of 33 neuromuscular centres from 13 different European countries collected data of the genetically confirmed patients with sarcoglycanopathy followed-up at their centres. Demographic, genetic and clinical data were collected for this study. Data from 439 patients from 13 different countries were collected. Forty-three patients were not included in the analysis because of insufficient clinical information available. A total of 159 patients had a confirmed diagnosis of LGMDR3, 73 of LGMDR4, 157 of LGMDR5 and seven of LGMDR6. Patients with LGMDR3 had a later onset and slower progression of the disease. Cardiac involvement was most frequent in LGMDR4. Sixty per cent of LGMDR3 patients carried one of the following mutations, either in a homozygous or heterozygous state: c.229C>T, c.739G>A or c.850C>T. Similarly, the most common mutations in LGMDR5 patients were c.525delT or c.848G>A. In LGMDR4 patients the most frequent mutation was c.341C>T. We identified onset of symptoms before 10 years of age and residual protein expression lower than 30% as independent risk factors for losing ambulation before 18 years of age, in LGMDR3, LGMDR4 and LGMDR5 patients. This study reports clinical, genetic and protein data of a large European cohort of patients with sarcoglycanopathy. Improving our knowledge about these extremely rare autosomal recessive forms of LGMD was helped by a collaborative effort of neuromuscular centres across Europe. Our study provides important data on the genotype-phenotype correlation that is relevant for the design of natural history studies and upcoming interventional trials in sarcoglycanopathies.

Received March 15, 2020. Revised May 25, 2020. Accepted May 27, 2020. Advance access publication 1 September 2020
© The Author(s) (2020). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.
For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

- 1 Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- 2 U705 CIBERER, Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain
- 3 Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Spain
- 4 Department of Neuroscience, University of Padova, Padova, Italy
- 5 John Walton Muscular Dystrophy Research Centre, Newcastle University and Newcastle Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle Upon Tyne, UK
- 6 Neuromuscular Disorder Unit, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain
- 7 Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Dino Ferrari Centre, University of Milan, Milan, Italy
- 8 Department of Neurology, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam Neuroscience, Amsterdam, The Netherlands
- 9 Neuropediatric Department, Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal
- 10 Neuromuscular Centre for Children and Adolescents, Department of Paediatric Neurology, University Hospital Essen, Essen, Germany
- 11 Copenhagen Neuromuscular Center, Department of Neurology, Rigshospitalet and University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark
- 12 Friedrich-Baur-Institute, Department of Neurology Klinikum München Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany
- 13 Department of Human Genetics, Ruhr-University Bochum, Germany
- 14 Neuromuscular Research Center, University of Tampere and Tampere University Hospital, Tampere, Finland
- 15 Unit of Neuromuscular and Neurodegenerative Diseases, Department of Neurosciences, Bambino Gesù Children's Hospital, Rome, Italy
- 16 Cardiology and Medical Genetics, Department of Experimental Medicine, University of Campania, Naples, Italy
- 17 Department of Precision Medicine - University of Campania, Naples, Italy
- 18 Center of Translational and Experimental Myology, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy
- 19 Dubowitz Neuromuscular Centre, MRC Centre for Neuromuscular Diseases, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London, UK
- 20 Neuromuscular Reference Center, Department of Neurology, Antwerp University Hospital, Antwerp, Belgium
- 21 Department of Neurology, University Hospitals Leuven, KU Leuven, Leuven, Belgium
- 22 Laboratory for Muscle Diseases and Neuropathies, Department of Neurosciences, KU Leuven, Leuven, Belgium
- 23 Paediatric Neuromuscular disorders Unit, Pediatric Neurology, Vall d'Hebron University Hospital and Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Barcelona, Spain
- 24 Department of Child Neurology, Charles University, 2nd Medical School, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic
- 25 Department of Neurology, Ghent University and University Hospital Ghent, Ghent, Belgium
- 26 Neuromuscular Unit, Department of Neurology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación imas12, Madrid, Spain
- 27 UOC Neurologia, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma, Italy
- 28 Department of Neuropediatrics, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany
- 29 Department of Neurology, Queen Fabiola Children's University Hospital (HUDERF), Free University of Brussels, Brussels, Belgium
- 30 Neurosciences, BioDonostia Health Research Institute, Hospital Donostia, San Sebastián, Spain
- 31 Division of Child Neurology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain
- 32 Department of Medical Genetics, and Szentagothai Research Center, University of Pécs, School of Medicine, Pécs, Hungary
- 33 Institute of Clinical Neurophysiology, University Medical Centre, Department of Neurology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia
- 34 Neuromuscular and Rare Disease Center, Department of Neurosciences, Mental Health and Sensory Organs (NEMOS), SAPIENZA Università di Roma, Rome, Italy
- 35 Department of Neurology, Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria, Tenerife, Spain
- 36 Department of Neurology, Raymond-Poincaré teaching hospital, centre de référence des maladies neuromusculaires Nord/Est/Ile-de-France, AP-HP, Garches, France
- 37 Department of Neurology, Alvaro Cunqueiro Hospital, Vigo, Spain
- 38 Intégrare (UMR_S951), Inserm, Génomique, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 91002, Evry, France

Correspondence to: Prof. Jordi Diaz-Manera
The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre
University of Newcastle
Newcastle Upon Tyne, UK
E-mail: Jordi.Diaz-Manera@newcastle.ac.uk

Keywords: limb girdle muscular dystrophies; sarcoglycan; registries; treatment; cohort

Abbreviation: LGMD = limb girdle muscular dystrophy

Introduction

Limb girdle muscular dystrophy (LGMD) is a genetically inherited condition that primarily affects skeletal muscle leading to progressive, predominantly proximal muscle weakness at presentation caused by a loss of muscle fibres (Straub *et al.*, 2017). Mutations in 32 genes have been reported to cause different types of LGMD, with the sarcoglycanopathies being one of the most frequent forms (Vainzof *et al.*, 1999; Straub *et al.*, 2017; Winckler *et al.*, 2019). There are four different sarcoglycan genes associated with autosomal recessive LGMD (LGMDR3–6; LGMD2D–F): *SGCA*, *SGCB*, *SGCD* and *SGCG* encoding for the alpha-, beta-, delta- and gamma-sarcoglycan proteins respectively. Two other sarcoglycan genes, *SGCE* and *SGCZ* have not been associated with any muscular condition so far. Sarcoglycans are transmembrane glycoproteins that form a tetrameric complex across the cell membrane of skeletal and cardiac muscle fibres (Ervasti *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 1998; Tarakci and Berger, 2016). They play an important role in maintaining muscle membrane integrity during cycles of contraction and relaxation through association with the dystroglycan complex, which links the subsarcolemmal protein dystrophin to the basement membrane (Ozawa *et al.*, 2005; Tarakci and Berger, 2016). Mutations in any of the four sarcoglycan genes disrupt the whole complex, leading to the loss of muscle membrane integrity (Duclos *et al.*, 1998; Lim and Campbell, 1998).

The sarcoglycan genes were identified in the 1990s, and since then several studies have reported the clinical features of small cohorts of patients (Eymard *et al.*, 1997; Angelini *et al.*, 1999; Nalini *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Semplicini *et al.*, 2015; Winckler *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019). Most patients develop progressive proximal muscle weakness during the first decade of life, although other rarer phenotypes, such as asymptomatic hyperCKemia or exercise intolerance, have also been reported (Trabelsi *et al.*, 2008; Tarnopolsky *et al.*, 2015; Kyriakides *et al.*, 2020). In general, sarcoglycanopathies are severe disorders characterized by loss of ambulation during adolescence or in early adulthood, though milder cases, in which patients are still ambulant at 50 or 60 years of age, have been described (Gonzalez-Quereda *et al.*, 2018; Oliveira Santos *et al.*, 2020). Cardiac and respiratory muscle involvement is frequently part of the clinical picture (Melacini *et al.*, 1999; Politano *et al.*, 2001; Sveen *et al.*, 2008). Several studies have tried to establish a correlation between genetic findings and phenotypes. It has been suggested that mutations leading to the absence of protein expression cause a severe phenotype characterized by early loss of ambulation, but it is not entirely clear if partial loss of expression is associated with milder phenotypes (Guglieri *et al.*, 2008; Semplicini *et al.*, 2015). Moreover, even if there are certain clinical similarities between the different types of sarcoglycanopathies, their relative frequency and the natural history of the individual subtypes is not fully understood.

To answer these questions, we collected demographic, genetic, clinical and muscle protein data from a large cohort

of patients with mutations in the sarcoglycan genes followed at neuromuscular centres across Europe. Our aims were to describe the main clinical and genetic features of the disease subtypes, investigate potential correlations between genotype and phenotype, and identify factors influencing the progression of the disease.

Materials and methods

Study design

This study was designed as an observational retrospective study collecting clinical and genetic data from patients with confirmed pathogenic mutations in the sarcoglycan genes (*SGCA*, *SGCB*, *SGCD* or *SGCG*). The data were collected from clinical assessments during patient clinical care visits. A total of 33 centres from 16 different countries provided data from their patients.

Patient cohort

The inclusion criteria for the study were: (i) genetically confirmed diagnosis of sarcoglycanopathy by identification of two heterozygous or one homozygous pathogenic mutation in one of the sarcoglycan genes; and (ii) sufficient data available in the clinical records to answer questions about disease onset and progression, presence or absence of cardiac and respiratory involvement and muscle function status at last clinical assessment. To analyse all the collected data, patients were categorized according to the mutated gene in four groups, LGMDR3, R4, R5 and R6, and then further stratified by presence or absence of symptoms.

Data sources

All participating centres completed a survey for each patient followed and evaluated at the centre. The survey collected demographic, clinical and genetic data and muscle biopsy information if performed.

Clinical features at first visit and during disease progression were collected from medical records. The age of disease onset was defined as the age at which the first symptoms were noticed by the patients or parents. The following data were collected to analyse disease progression: age at which patients were not able to run, age at which patients were not able to get up from a chair without support, age at which patients were not able to climb up stairs without using the handrail and age at which patients began using any walking aids, such as canes, sticks or walkers. The age of loss of ambulation was defined as the time when patients were not able to walk short distances (such as crossing a room) and needed a wheelchair both at home or when out. Cardiac involvement was defined by a left ventricular ejection fraction lower than 50% or fractional shortening lower than 25%, the existence of morphological abnormalities in the ventricular walls evaluated by echocardiography or the existence of cardiac conduction defects (Ponikowski *et al.*, 2016; Lipshultz *et al.*, 2019). The need for ventilatory support was also recorded as well as the age at which it was started.

We collected the following data on the muscle biopsies: which muscle was biopsied, age at which the muscle biopsy was performed, main characteristics observed in the haematoxylin-eosin staining including the presence of internal

nuclei, existence of necrotic fibres, inflammatory infiltrates, fibrosis or fat replacement. We also collected data on the remaining protein expression analysed by western blot and stratified this quantification into: no protein expression (<1%), <30% protein expression, 30–60% protein expression and >60% protein expression compared to controls. Western blots were performed in all hospitals at the time the muscle biopsy was performed for diagnosis.

Mutations in the *SCGA*, *SCGB*, *SCGG* or *SCGD* genes were collected and centrally reviewed by experienced geneticists from Hospital Santa Creu I Sant Pau (L.G-Q and P.G.) to predict pathogenicity. We considered nonsense, frameshift and canonical splice site mutations as incompatible with full-length protein production as these mutations are predicted to cause a disruption of the reading frame or a considerable shortening of the transcript resulting in aberrant degradation. Missense variants and mutations that maintained the reading frame were considered as compatible with protein production. Deep intronic mutations were also considered as compatible with protein production, as mutations affecting splicing, located outside canonical splice sites, usually produces a certain amount of wild-type transcript.

To reduce the selection bias, patients with more than 30% of missing data were excluded from the study.

Statistical analysis

Quantitative variables were analysed using the Kolmogorov-Smirnov test, to verify the normal distribution. Comparison between the different subgroups of patients was performed using the ANOVA test for quantitative variables and the chi-squared test for categorical variables. To identify which level of protein expression, quantified using western blot, predicted with highest

sensitivity and specificity loss of ambulation before 18 years of age, we generated a receiver operating characteristic curve (ROC). Area under the curve (AUC) and the optimal cut-off point (also known as Youden's index) are provided. We used a Cox proportional hazard regression model for the analysis of time to wheelchair. To select which variables were associated with loss of ambulation before 18 years old, we performed a two-step analysis. First, we performed a univariate analysis using the chi-squared test for categorical variables and the Student's *t*-test for quantitative variables. Those variables that showed a significantly different distribution among groups (considering in this case $P < 0.1$) were included in a multivariable logistic regression modelling and backward eliminated until reaching significance. A ROC curve was generated to test the predictive power of the final model and AUC is also provided. *P* was considered significant if < 0.05 . Statistics analysis was performed by J.D-M. and J.A-P. using SPSS software version 20 from IBM.

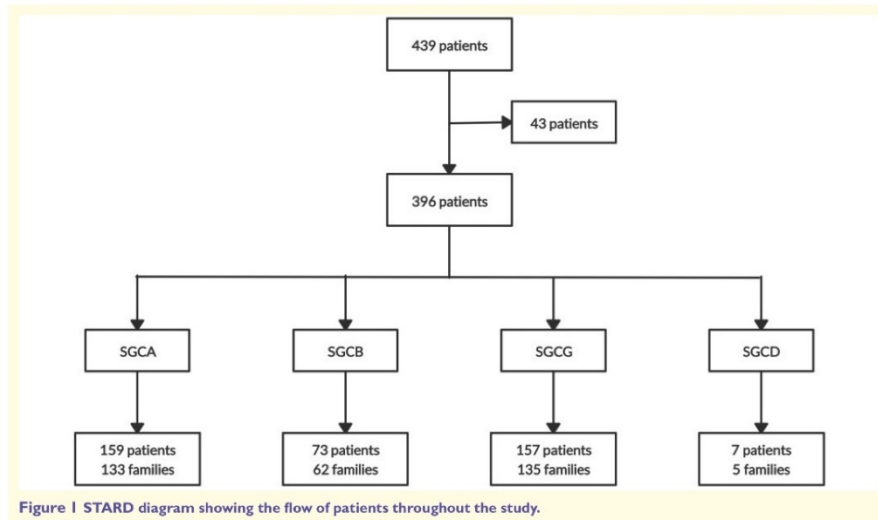
Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, upon reasonable request.

Results

Patient cohort

A total of 439 patients were collected (Fig. 1, STARD diagram). Forty-three patients were not included in the analysis because of insufficient genetic or clinical data. We



4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

included 396 patients from 329 different families in the analysis. We divided the cohort in four different subgroups depending on the mutated gene (Fig. 1): 159 patients were classified as LGMDR3 (alpha patients), 73 as LGMDR4 (beta patients), 157 patients as LGMDR5 (gamma patients), and seven as LGMDR6 (delta patients). Delta patients were excluded from the general comparisons between groups due to the low number of patients.

Patients data were collected from 33 hospitals in 13 European countries including: Spain, Portugal, Italy, The Netherlands, UK, Finland, Czech Republic, Hungary, Slovenia, France, Germany, Denmark and Belgium. We did not identify significant differences in the geographic distribution of subgroups across the 33 recruiting sites. However, beta patients were more prevalent in northern countries, such as The Netherlands, UK and Denmark, while gamma patients were more prevalent in southern countries, such as Spain, Italy and Portugal (Supplementary Fig. 1B and C). Most of the patients had Caucasian origin (91.9% alpha, 84.5% beta, 45% gamma and 57.1% delta patients). In the

case of gamma patients, 27.7% had a Roma and 17.8% a Maghreb background.

There were not significant differences in gender in any of the subgroups studied (ANOVA, $P = 0.69$). Thirty-seven per cent of alpha, 28.8% of beta, 43.3% of gamma and 57.1% of delta patients had relatives affected by the disease. Consanguinity was reported in 15.5%, 25%, 49.2% and 85.7% of cases, respectively (Table 1).

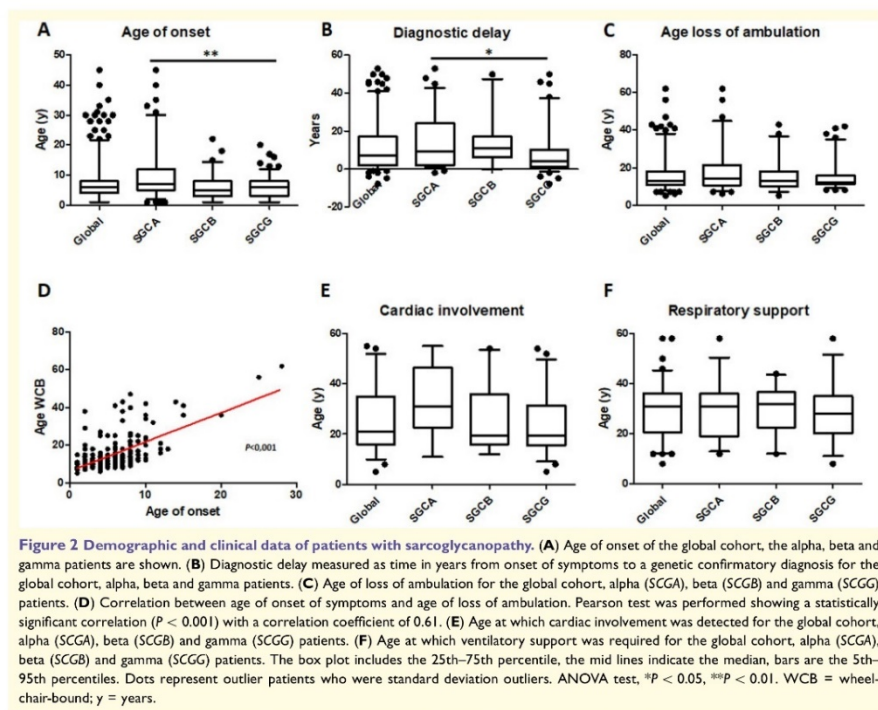
Symptoms and muscle function status

Ninety-six per cent of the patients were symptomatic at the time of inclusion in the study (Table 1). Non-symptomatic patients were diagnosed either because they were relatives of patients with the disease or because they had asymptomatic hyperCKemia. Age at symptoms onset varied between the different subtypes: alpha patients experienced first symptoms later (mean: 10.2; range: 1–45 years) than beta (5.8; 1–22

Table 1 Clinical and demographic features for each type of sarcoglianopathy

	Alpha patients (LGMDR3)	Beta patients (LGMDR4)	Gamma patients (LGMDR5)
Patients, n	159	73	157
Sex, male/female (Unk)	70/75 (14)	36/37	77/80
Families, n	133	62	135
Affected related, n (%)	60 (37.7)	21 (28.8)	68 (43.3)
Symptomatic, n (%)	148 (93.1)	73 (100)	152 (96.8)
Age onset, average \pm SD [range]	10.2 \pm 9 [1–45]	5.8 \pm 4.1 [1–22]	5.8 \pm 3.4 [1–20]
Diagnostic delay, average \pm SD [range]	14.1 \pm 13.9 [–2–53]	14.3 \pm 13.4 [1–50]	9.2 \pm 11.6 [–5–50]
Age at last evaluation, average \pm SD [range]	28.9 \pm 17.8 [2–74]	28.3 \pm 15.9 [8–66]	19.9 \pm 13 [2–61]
Evolution of the disease, years, average \pm SD [range]	19.1 \pm 13.6 [0–54]	21.5 \pm 14.2 [4–60]	14.7 \pm 11.6 [0–50]
Symptom onset, n (%)	n = 102 (46 Unk)	n = 46 (27 Unk)	n = 107 (45 Unk)
Proximal LL weakness	45 (44.1)	25 (54.3)	53 (49.5)
Proximal UL weakness	30 (20.3)	9 (19.6)	15 (14)
HyperCKemia	27 (18.2)	13 (28.3)	28 (26.2)
Symptoms, n (%); average \pm SD [range]	n = 87 (61 Unk)	n = 35 (28 Unk)	n = 103 (49 Unk)
Tiptoe gait	20 (22.9); 7.4 \pm 5.4 [3–25]	23 (65.7); 8.9 \pm 5.9 [2–25]	38 (36.9); 5.7 \pm 3 [1–11]
Calf hypertrophy	50 (57.5); 12.4 \pm 11.5 [3–51]	21 (60); 6.1 \pm 2.6 [2–12]	66 (64.1); 6.4 \pm 3.7 [2–16]
Scoliosis	29 (33.3); 16 \pm 7.5 [6–35]	17 (48.6); 17.6 \pm 13.6 [7–37]	43 (39.8); 14.7 \pm 8 [7–31]
Scapular winging	39 (44.8); 20.5 \pm 12.2 [6–51]	18 (51.4); 14.9 \pm 13 [4–43]	41 (39.8); 12.5 \pm 7.3 [2–30]
Motor function, n (%); average age \pm SD [range]	n = 129 (19 Unk)	n = 65 (8 Unk)	n = 135 (17 Unk)
Running	15 (11.7); 13.1 \pm 4.6 [5–19]	2 (3.2); 16 \pm 2.8 [14–18]	10 (7.7); 8.4 \pm 8.7 [2–9]
Walk without aids	30 (23.4); 29.7 \pm 18.5 [4–63]	7 (10.9); 19.3 \pm 11.6 [8–34]	25 (19.2); 12.2 \pm 8.7 [4–48]
WCB	72 (56.3); 18.6 \pm 11.9 [6–62]	50 (78.1); 16.7 \pm 9.5 [5–45]	87 (66.9); 14.6 \pm 7 [8–42]
Cardiac involvement, n (%); average age \pm SD (range)	14 (10.4); 34.1 \pm 14.4 [11–55]	30 (41.1); 25.8 \pm 13.1 [12–54]	32 (22.5); 21.1 \pm 11.2 [5–48]
Heart rhythm abnormalities, n (%)	10 (71.4)	4 (13.3)	6 (18.8)
Dilated cardiomyopathy, n (%)	1 (7.1)	19 (63.3)	19 (59.4)
Unknow type of cardiac involvement, n (%)	3 (21.4)	7 (23.3)	7 (21.8)
Respiratory support, n (%); average age \pm SD [range]			
Non-invasive ventilation	40 (27); 29 \pm 11 [12–58]	21 (28.8); 29.8 \pm 9.2 [12–44]	35 (23.6); 28.7 \pm 11.4 [8–58]
Invasive ventilation	1 (0.7); 51	3 (3.9); 47.7 \pm 8.3 [41–57]	2 (1.4); 37
Death, n (%)	3 (1.9)	2 (2.7)	4 (2.6)

LL = lower limbs; UL = upper limbs; Unk = unknown; WCB = wheelchair-bound.



years) and gamma (5.8; 1–20 years) patients (ANOVA test, $P < 0.001$), while there was no difference in the age of onset between beta and gamma patients (Table 1 and Fig. 2A). Mean age at symptoms onset in delta patients was 8.5 years (range 1–30). Delay in diagnosis, defined as the time from onset of symptoms to the genetic confirmation of the disease varied from one subtype to the other, but it was significantly shorter in gamma patients compared to alpha and beta patients (ANOVA test, $P = 0.004$) (Table 1 and Fig. 2B). The most frequent symptom at onset in all subgroups was proximal lower limb weakness. However, ~25% of all patients were diagnosed because of the presence of asymptomatic hyperkemia, muscle pain or because they were relatives of already diagnosed patients (Table 1). At the time of the survey, 4% of all patients were considered non-symptomatic, as these patients did not have any symptom of muscle weakness and clinical examination was normal. Supplementary Table 1 describes their clinical data. In summary, there were 11 alpha, 0 beta and 5 gamma patients considered non-symptomatic. Mean age at last visit was 14.6 years old (range: 2–38) for the alpha and 11 years

(range: 3–24) for the gamma. Clinical examination was normal, and these patients did not have cardiac or respiratory involvement.

At the time of the survey, 23.4% of all alpha patients were able to walk without aids while 56.3% were wheelchair-bound. Only 10.9% of beta patients were able to walk without aids while 78.1% of them were wheelchair-bound. In the case of gamma patients, 19.2% were able to walk without aids and 66.9% were wheelchair-bound (Table 1). Only two of the seven delta patients had lost ambulation at the time of the survey (mean age of loss of ambulation was 12 years). There were not significant differences in the age at loss of ambulation between subgroups (ANOVA, $P = 0.053$), but we identified a non-significant trend for an earlier loss of ambulation in beta and gamma patients compared to alpha patients (Fig. 2C). We identified a significant correlation between the age of onset of symptoms and the age at loss of ambulation (Pearson correlation, $P < 0.001$, $r = 0.61$) (Fig. 2D). Interestingly, there were significant differences in the age at loss of ambulation when patients were classified as age of onset of symptoms before and after

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

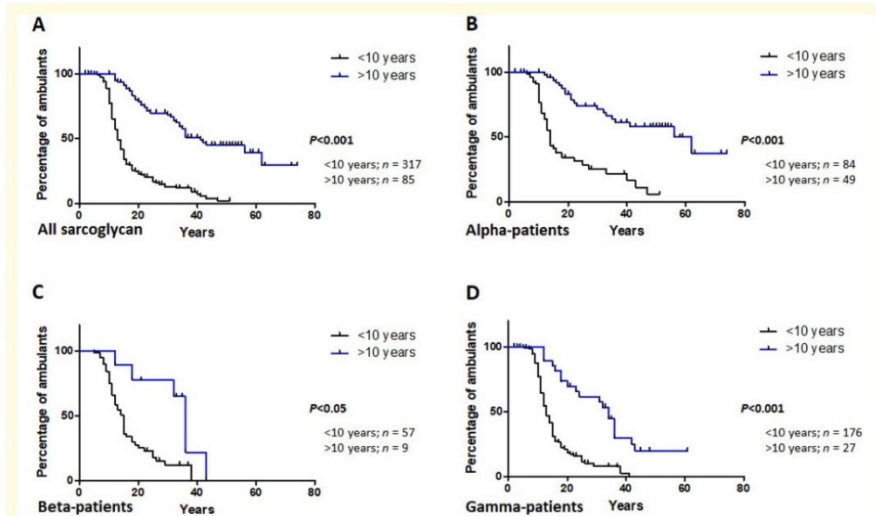


Figure 3 Influence of age of onset of symptoms on the time to wheelchair. Kaplan-Meier estimates age in age at wheelchair based in the age of the patients for all sarcoglycan patients (A), alpha patients (B), beta patients (C) and gamma patients (D). Patients were stratified into two groups: onset of symptoms before 10 years of age and onset of symptoms after 10 years of age. SGC = sarcoglycan; SGCA = alpha patients; SGCB = beta patients; SGCG = gamma patients.

10 years old (Mantel-Cox test, $P < 0.001$) both when the analysis was performed with all sarcoglycan patients and when it was performed in each subgroup (Fig. 3). Furthermore, we observed that the patients who began with muscle weakness after 18 years of age ($n = 20$) did not lose ambulation during the follow-up assessments (Supplementary Fig. 2).

Cardiac and respiratory involvement

The frequency and type of cardiac involvement varied between subgroups and are described in Table 1. Nineteen per cent of all patients had cardiac involvement as defined in the 'Materials and methods' section. There were significant differences in the frequency of cardiac involvement (ANOVA test, $P = 0.001$) between the subgroups, with beta patients showing more frequent cardiac involvement than alpha or gamma patients, but no differences in the age at which cardiac involvement was identified (ANOVA test, $P = 0.34$) (Fig. 2E). However, we identified a statistically significant correlation between the duration of the disease, measured as the time from the onset of symptoms, and the presence of cardiac involvement both in beta and gamma patients.

Up to 25% of all patients required ventilatory support, with the treatment recommended at a mean age of 29.1 years (range 8–58). Between the different subgroups we neither identified differences in the frequency of patients requiring ventilatory support (ANOVA test, $P = 0.64$) nor in the age at which it was recommended (ANOVA test, $P = 0.93$) (Fig. 2F). However, patients requiring ventilatory support had a significant longer duration of the disease. We specifically analysed the potential influence of scoliosis in the need of ventilatory support: 69.1% of patients requiring ventilation had scoliosis, while only 31.9% that did not require ventilation support had scoliosis. These differences were statistically significant (chi-square, $P < 0.001$). Additionally, we observed a non-significant trend of starting the ventilation earlier for patients with scoliosis compared to those patients without scoliosis (Student *t*-test, $P = 0.085$).

We did not identify differences in the age at onset, age at loss of ambulation or the remaining sarcoglycan expression between patients with or without cardiomyopathy and those with or without ventilatory support.

Genetic studies

A total of 131 different pathogenic variants were identified in the four sarcoglycan genes (Fig. 4). Interestingly, in each

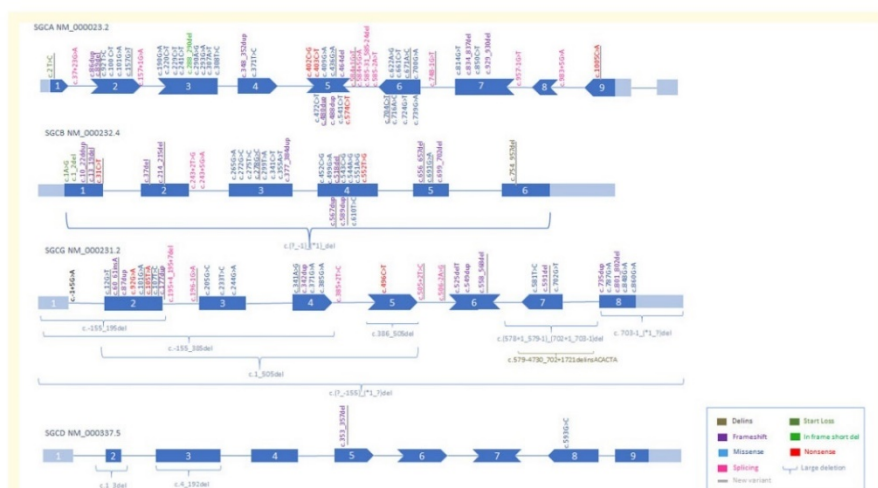


Figure 4 Distribution of the pathogenic variants found in our cohort of patients among the different sarcoglycan genes. The graph shows the distribution of the pathogenic variants identified in the patients that participated in the study. New variants not previously described are underlined. Bottom right: legend describes the type of mutation. Delins = deletion or insertion.

gene two or three mutations were more prevalent than the others. Moreover, mutations were mainly concentrated in two or three exons of the genes.

Alpha patients

Eighty-three alpha patients (52.2%) were homozygous for a single variant. In total, 52 different pathogenic variants were found in the *SGCA* gene and three of them were more prevalent than the others: c.229C>T, p.(Arg77Cys) was present in at least one allele in 75 patients (47.2% of all alpha patients), c.850C>T, p.(Arg284Cys) was present in 30 patients (18.9%) and, c.739G>A, p.(Val247Met) in 26 patients (16.4%). Nine of the 53 variants had not been previously described (Fig. 4). Most of the variants were located in exons 3, 6 and 7, with 103 of 159 (64.4%) patients having their two variants in these exons. Most of the patients had two missense mutations (74.8%), while only 3.1% carried two frameshift or nonsense mutations.

Beta patients

Fifty-five beta patients (75.2%) were homozygous for a single variant. In total, 34 different pathogenic variants were found in the *SGCB* gene, but one of them, c.341C>T, p.(Ser114Phe), was the most prevalent, being found in 30 patients (41.1% of all beta patients). Twelve of 34 variants had not been previously described (Fig. 4). Most of the variants were located in exons 3 and 4, with 55 of 73 (75.4%)

patients having their two variants in these exons. Fifty-three per cent of the patients had two missense mutations while 28.7% carried two frameshift or nonsense mutations.

Gamma patients

One hundred and thirty-five gamma patients (86%) were homozygous for a single variant. In total, 41 different pathogenic variants were found in the *SGCG* gene and two of them were more prevalent than the others: c.525delT, p.(Phe175Leufs*20) was present in at least one allele in 71 patients (45.2% of all gamma patients) and c.850C>T, p.(Arg284Cys) was present in 38 patients (24.2% of all gamma patients). Thirteen of 41 variants had not been previously described (Fig. 4). Most of the variants were located in exons 6 and 8, with 112 of 157 (71.3%) patients having their two variants in these exons. Most of the patients had two frameshift or nonsense mutations (47.7%) while 33.8% carried two missense mutations. Interestingly, 43.9% of gamma patients carried the mutation c.525delT (known as a Maghrebian founder mutation), while 43.9% carried the c.848G>A mutation (known as a Roma founder mutation).

Delta patients

The seven delta patients were all homozygous for a single variant. Four different pathogenic variants were found in the *SGCD* gene. Five patients (71.4%) were homozygous for a

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

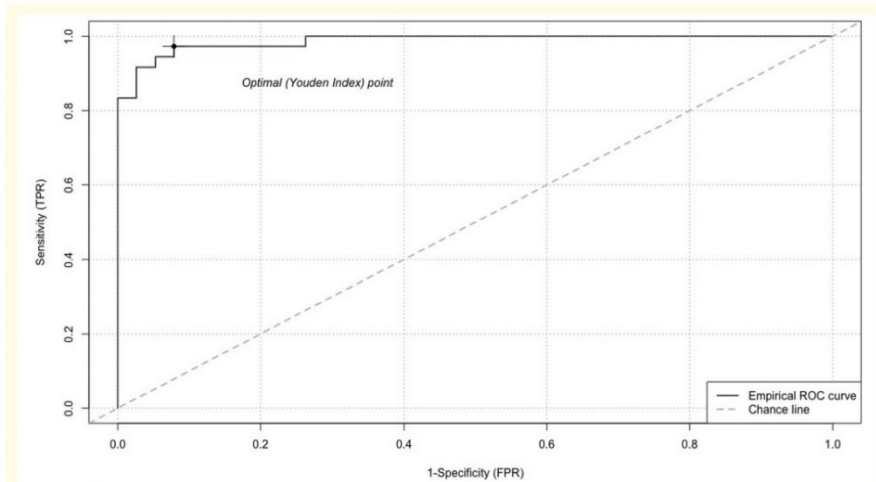


Figure 5 ROC curve of the influence of remaining protein expression for distinguishing patients at risk of losing ambulation before the age of 18 years. The ROC curve analysing remaining protein expression and risk of losing ambulation before 18 years of age, showed an AUC of 0.986 (0.67–1). The Youden's index (optimal point with higher sensitivity and specificity) was 27.5% expression.

deletion mutation. Two of the four variants had not been previously described (Fig. 4).

Genotype-protein expression-phenotype correlation

To analyse the potential genotype-phenotype correlation we studied the impact that the mutation had on the residual protein expression.

A muscle biopsy was performed in 208 patients (101 alpha patients, 42 beta patients and 65 gamma patients). Western blot analysis was performed in 55 (54.5% of patients with muscle biopsy) alpha patients, 20 (47.6%) beta patients and 35 (53.8%) gamma patients. However, because of the high frequency of patients sharing the same mutations and the fact that many patients harboured two out of frame mutations, we were able to predict remaining protein expression in 139 alpha patients, 67 beta and 148 gamma patients. There were 20 (12.6%) alpha patients, six (8.2%) beta patients and nine (5.7%) gamma patients where it was not possible to know the level of protein expression.

To identify if protein expression, analysed using western blot, predicted with high sensitivity and specificity loss of ambulation before 18 years of age, we generated a ROC curve (Fig. 5). We observed that optimal cut-off point was 27.5 expression which had an 83.3% sensitivity and 100% specificity. To compare clinical features depending

on the remaining protein expression we categorized all patients in no expression (<1%), <30% expression and >30% expression. We observed significant differences in the age of onset of the disease (ANOVA, $P < 0.001$), the age of loss of ambulation (ANOVA, $P < 0.001$) and the time from onset of symptoms to being wheelchair-bound (ANOVA, $P < 0.001$) between patients with no expression or <30% expression and those patients with expression >30% (Fig. 6). When we performed the analysis by gene subgroups, we observed that age of ambulation loss in alpha patients was significantly influenced by protein expression (Mantel-Cox study, $P < 0.001$) (Fig. 6B). In the case of beta patients, there was a non-significant trend in the age at being wheelchair-bound depending on protein expression levels (Mantel-Cox, $P > 0.05$), although we observed that those expressing >30% of protein had a longer time from onset of symptoms to the loss of ambulation (Fig. 6C). In gamma patients, significant differences were only found between patients having no expression or <30% and patients having >30% expression (Mantel-Cox, $P < 0.05$) (Fig. 6D).

Risk factors associated with rapid disease progression

To determine which risk factors could be associated with early loss of ambulation, before the 18 years of age, we performed a multivariate logistic regression analysis. First,

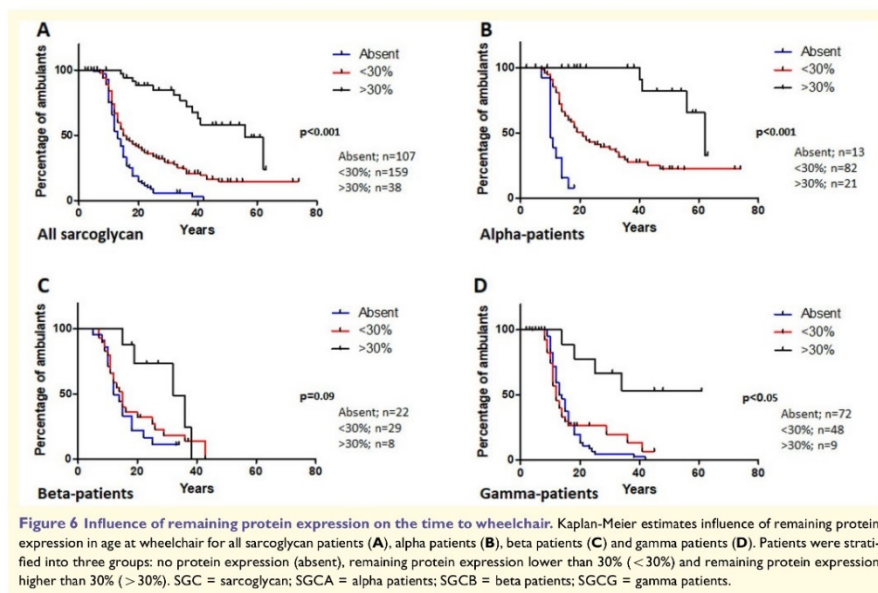


Figure 6 Influence of remaining protein expression on the time to wheelchair. Kaplan-Meier estimates influence of remaining protein expression in age at wheelchair for all sarcoglycan patients (A), alpha patients (B), beta patients (C) and gamma patients (D). Patients were stratified into three groups: no protein expression (absent), remaining protein expression lower than 30% (<30%) and remaining protein expression higher than 30% (>30%). SGC = sarcoglycan; SGCA = alpha patients; SGCB = beta patients; SGCG = gamma patients.

we identified which factors could be associated using a univariate analysis including clinical (age of onset, age at diagnosis, gender, scoliosis, need of ventilation, cardiac involvement), genetic data (gene mutated, harbouring two out-of-frame mutations, harbouring two in-frame mutations) and protein expression. This univariate study identified age of onset, protein expression <30% and mutations in the *SGCG* gene as factors with a significant relation with early loss of ambulation. These variables were further included in the multivariable logistic regression model that confirmed that age of onset {odds ratio (OR) = 1.37 [confidence interval (CI):1.18–1.59], $P = 0.001$ } and protein expression <30% [OR = 10.7 (CI : 2.04–56.22), $P = 0.020$] were independent risk factors for losing ambulation before age 18 years of age. The ROC curve for the final model, showed an AUC of 0.77 (Supplementary Fig. 3). In addition, we performed a ROC analysis to identify which age of onset cut-off point had the most balanced sensitivity/specificity to predict loss of ambulation before the age of 18 years (Supplementary Fig. 4A). We found that the most balanced cut-off point was age of onset ≤ 6 years, which showed a sensitivity of 69.33%, a specificity of 68.63% and an AUC of 0.74 to predict loss of ambulation before 18 years of age. The ROC curve for this age cut-off point is shown in Supplementary Fig. 4B.

Discussion

We report the clinical, genetic and protein expression data of the largest series of patients with mutations in the sarcoglycan genes described so far. The analysis of this international cohort revealed crucial information to establish a prognosis for the diseases as we have observed that onset of symptoms during the first decade of life and protein expression in muscle biopsy lower than 30% were independent risk factors associated with loss of ambulation before 18 years of age. In contrast, onset of symptoms later than 10 years of age and/or protein expression higher than 30% was associated with a slower progression and lower risk of losing ambulation before the age of 18 years. These data are especially relevant at present, as genetic therapies are under development and interventional clinical trials in patients with sarcoglycanopathies are being designed (Israeli *et al.*, 2019; Vita *et al.*, 2019).

Sarcoglycanopathies, as a group, are a common cause of recessive LGMD (Vainzof *et al.*, 1999; Fanin *et al.*, 2009) and the third most common cause of recessive muscular dystrophies after calpainopathies and dysferlinopathies (Ghaoui *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019). Mutations in these genes have classically been associated with a rapid progression of muscle weakness leading to severe disability, loss of ambulation in the second decade of life and frequently associated with

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

cardiac and respiratory problems (Semplicini *et al.*, 2015). However, several reports suggested that disease progression is not homogeneous, as there were patients who never lost ambulation or patients in which the onset of symptoms was in the third or fourth decade of life. Our data show that a series of factors may influence clinical progression including the mutated gene, age of onset of symptoms and residual protein expression. For example, progression of the disease was more rapid and severe for beta patients as a group than for alpha patients, as it has previously been suggested (Semplicini *et al.*, 2015). The onset of symptoms for beta patients was during the first decade of life in 87% of cases, and 78.4% of them were wheelchair-bound before 18 years of age. However, we also identified beta patients with milder clinical progression and in all these cases the remaining protein expression was higher than 30%. Previous series had suggested that gamma patients may have a milder progression than beta patients (Guglieri *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011). However, our data show that gamma patients have a more severe clinical phenotype than previously reported: 87.2% of them started with symptoms before 10 years of age and 84.4% of them were wheelchair-bound before 18 years old. In contrast, only 32% of alpha patients had their first symptoms before 10 years of age and just 56.3% were wheelchair-bound by the age of 18 years. In addition, our study supports that remaining protein muscle expression is an independent risk factor for disease progression as previously suggested (Guglieri *et al.*, 2008; Semplicini *et al.*, 2015). It was especially interesting that alpha patients, as a group, needed less remaining protein expression than beta and gamma to maintain ambulation beyond 18 years of age. However, these results should be interpreted carefully, as we have identified patients in which protein expression was >30% who lost ambulation before 18 years of age.

Analysis of mutations can be useful to predict protein expression in many disorders. Harboring two truncating mutations is generally associated with total or severe loss of protein expression; however, the effect of having one or two missense mutations is not always easy to predict (Guglieri *et al.*, 2008; Winckler *et al.*, 2019). We cannot discount that an apparently missense mutation detected in genomic DNA could create a cryptic splice site that causes a frameshift, only perceptible when analysing mRNA. It is also well known that after protein translation, sarcoglycans are glycosylated in the endoplasmic reticulum where some aberrant proteins could be identified by the ubiquitin-proteasome system and degraded. Consequently, some missense mutations can induce very low or no protein expression (Sandona and Betto, 2009; Bianchini *et al.*, 2014). Therefore, in our opinion, caution is needed to predict protein expression based on genetic results only. In our study, we had information about protein expression studied by skeletal muscle western blot in a considerable number of patients, which, together with the fact that many patients shared the same mutations, allowed us to predict protein expression in a large proportion of cases. Some of the most common missense mutations, such as c.229C>T,

p.(Arg77Cys) in the *SGCA* gene, c.341C>T, p.(Ser114Phe) in the *SGCB* gene and c.848G>A, p.(Cys283Tyr) in the *SGCG* gene were associated with a very reduced protein expression, always <30%, and consequently with a worse prognosis characterized by early onset of symptoms, more rapid progression and early loss of ambulation. In contrast, c.850C>T, p.(Arg284Cys) and c.739G>A, p.(Val247Met) in the *SGCA* gene were associated with a higher protein expression and therefore a better prognosis. It is also important to note that other factors could influence the progression of the disease (apart of the mutated gene and the remaining protein expression), which have not been assessed in this study such as epigenetic factors and modifier genes or even social aspects such as nutrition status, exposition to toxics, or access to physiotherapy and general care. All these aspects could also potentially influence disease's progression.

In our opinion, the data reported here can help in the design of clinical trials in sarcoglycanopathies. These trials should identify two groups of patients: (i) those with two truncating mutations; and/or (ii) those with none or <30% protein expression because these patients were commonly associated with an earlier onset of the disease, a quicker progression and a loss of ambulation before 18 years of age. To determine the effectiveness of gene therapy in these cases, we suggest including children younger than 10 years of age in the clinical trials. In contrast, patients with protein expression >30% were often associated with milder progression, with most of them still ambulant in the fourth decade of life. If these patients were also included in clinical trials, analysis of the effectiveness of the therapy should be performed separately to the other group, as results could be biased by the milder progression of the disease.

Our results can also provide insight into the expected effect of therapeutic approaches that aim to restore protein expression. We have shown that protein expression >30% was associated with a better prognosis. Therefore, gene replacement therapies able to reach almost this range of expression should be effective enough to show a change in the progression of the disease. These data, although hypothetical, are extremely important, as the efficacy of gene replacement therapies could depend on the amount of protein expression levels reached, which are probably influenced by the number of viral genomes infused.

Another interesting finding of our analysis was the low frequency of cardiac and respiratory involvement. Most of the previous cohort descriptions pointed out that >50% of patients developed cardiac and respiratory problems, although another recently published study described the frequency of cardio-respiratory involvement to be <5% in sarcoglycan patients (Melacini *et al.*, 1999; Calvo *et al.*, 2000; Politano *et al.*, 2001; Fanin *et al.* 2003; Winckler *et al.*, 2019).

The study also provided information about the delay in the diagnosis of the patients. The mean delay in diagnosis was 14 years for alpha and beta, and 8 years for gamma patients. There are many factors that could increase the delay, such as the lack awareness of the disease among non-specialized services, the difficulties accessing genetic studies

in some countries and the fact that many patients with a Duchenne-like clinical picture could be first assessed for mutations in the dystrophin (*DMD*) gene. We hope that next generation sequencing will allow faster diagnosis in the future and shorten the time to reach a diagnosis. We identified 131 variants in the three genes, but most of these variants were concentrated in two to three exons per gene confirming that there are hot spots in these genes as previously described. It was interesting to see the long delay.

Our study has some limitations because data were collected retrospectively, came from different countries and it is likely that the protocol to assess cardiac and respiratory involvement is different between countries, and they may not be up to date for all patients. Moreover, in the case of respiratory involvement, we only collected data regarding age at which ventilatory support was begun. However, our results show that only 21.6% of the patients had cardiac involvement and 26.2% required ventilatory support. We did not identify any correlation between protein expression, age of onset or age of losing ambulation and the development of cardiac and respiratory involvement. Therefore, it was not possible to predict the development of these symptoms based on protein expression data and periodic assessments of cardiac and respiratory involvement are needed in all cases. Moreover, the data were retrospectively collected and there were missing data for many patients that could have enriched the data analysed. Another limitation is that western blots were performed at local hospitals at the time the muscle biopsies were obtained. Our study covers a long period of time, from the 1990s to the present, and therefore the methods used for western blots were different between laboratories, including commercial antibodies used to detect the expression of sarcoglycans, proteins used as loading controls (GAPDH, b-tubulin, actin or the developing methods used (colorimetric, chemiluminescence, etc). These factors could add a degree of variability to the quantification of sarcoglycans expression. Moreover, there is also an inherent variability in the western blot itself when a protein is quantified. Therefore, we decided not to take into account the exact amount of protein expressed, because we considered that we could not compare an analysis performed in one laboratory with another performed in a different laboratory, many years later and using different technology; instead, we used a range of expression. To our knowledge, there are no reports in the literature that used western blot analysis to quantify the remaining protein expression in sarcoglycanopathies and correlate these results with muscle function in a large cohort of patients. In most previous reports, authors quantified sarcoglycan expression based on immunofluorescence studies and the cohort was divided into two groups: absence or reduction (Guglieri *et al.*, 2008; Semplicini *et al.*, 2015). However, there are some reports describing sarcoglycan patients with milder forms of the disease in which western blot was performed and protein expression was quantified ($n = 7$ cases). The remaining protein expression in these cases is variable, ranging from 18% to 45% (Tarnopolsky *et al.*, 2015; Cantero *et al.*, 2018; Gonzalez-

Quereda *et al.*, 2018). Based on these reports, we decided to use 30% protein expression as a threshold to potentially identify milder cases. However, future studies analysing protein expression of a large collection of muscle biopsies in a centralized laboratory would be useful to confirm our observation. Another clear limitation is that we were not able to collect consistent data on respiratory muscle function. Many centres did not perform spirometry until patients began having symptoms of respiratory involvement, and therefore we could not be sure of the real values of forced vital capacity in our cohort. Therefore, we chose to analyse only the needed of ventilatory support. Obviously, not all European patients were included in this analysis and although 62 centres were contacted and invited to participate, not all of them responded and we missed data from some countries such as Turkey, Russia, Romania and Bulgaria. However, the data presented here are still relevant, because they describe the distribution of patients among many European countries, their clinical symptoms and the correlation between protein expression, age of onset and age of lost ambulation.

Conclusion

Our study provides important information about the clinical and genetic features of a large cohort of LGMD patients with mutations in the sarcoglycan genes. We have identified the age of onset of symptoms before 10 years old and a protein expression < 30% as independent risk factors for losing ambulation before the age of 18 years. These data will be useful for the design of clinical trials, including gene replacement therapy studies, that are currently under development.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Pol Camps from the Neurology department of the Hospital de la Santa Creu I Sant Pau de Barcelona for his advice about the statistical analysis.

Funding

This investigation was sponsored by a grant from the Spanish Ministry of Health, Fondos FEDER-ISCIH PI18/01525 to J.D.-M. G.P.C.'s research was partially supported by the Italian Telethon Foundation Grant GSP18002B.

Competing interests

All authors report no competing interests.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

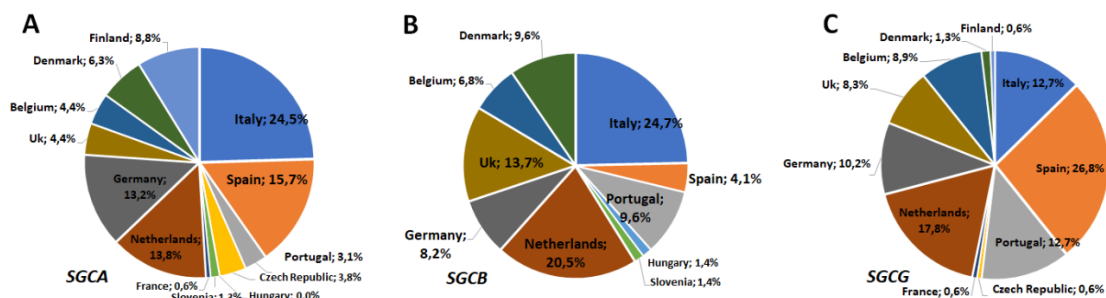
4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

References

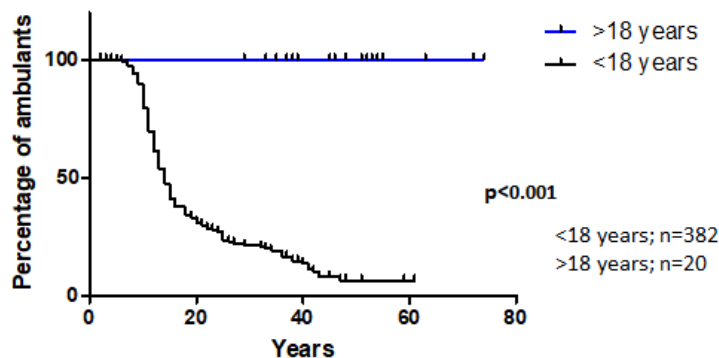
- Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology* 1999; 52: 176–9.
- Bianchini E, Fanin M, Mamchaoui K, Betto R, Sandonà D. Unveiling the degradative route of the V247M α -sarcoglycan mutant responsible for LGMD-2D. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 3746–58.
- Calvo F, Teixeira S, Fernandez JM, Teijeiro A, Fernandez-Hojas R, Fernandez-Lopez XA. Evaluation of heart involvement in gamma-sarcoglycanopathy (LGMD2C). A study of ten patients. *Neuromuscul Disord* 2000; 10: 560–6.
- Cantero D, Hernández-Lain A, Martínez JFG, Pérez MR, Ruano Y, Lleixà C, et al. Milder forms of alpha-sarcoglycanopathies diagnosed in adulthood by NGS analysis. *J Neurol Sci* 2018; 394: 63–7.
- Chan YM, Bönnemann CG, Lidov HGW, Kunkel LM. Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J Cell Biol* 1998; 143: 2033–44.
- Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrsta RF, Crosbie RH, et al. Progressive muscular dystrophy in α -sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol* 1998; 142: 1461–71.
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990; 345: 315–9.
- Eymard B, Romero NB, Leturcq F, Piccolo F, Carrié A, Jeanpierre M, et al. Primary adhalinopathy (alpha-sarcoglycanopathy): clinical, pathologic, and genetic correlation in 20 patients with autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* 1997; 48: 1227–34.
- Fanin M, Melacini P, Boito C, Pegoraro E, Angelini C. LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 303–9.
- Fanin M, Nascimbeni AC, Aurino S, Tascia E, Pegoraro E, Nigro V, et al. Frequency of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology* 2009; 72: 1432–5.
- Ferreira AFB, Carvalho MS, Resende MBD, Wakamatsu A, Reed UC, Marie S. Phenotypic and immunohistochemical characterization of sarcoglycanopathies. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66: 1713–9.
- Ghaoui R, Cooper ST, Lek M, Jones K, Corbett A, Reddel SW, et al. Use of whole-exome sequencing for diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy: outcomes and lessons learned. *JAMA Neurol* 2015; 72: 1424–32.
- Gonzalez-Quereda I, Gallardo F, Töpf A, Alonso-Jimenez A, Straub V, Rodriguez MJ, et al. A new mutation of the SCGA gene is the cause of a late onset mild phenotype limb girdle muscular dystrophy type 2D with axial involvement. *Neuromuscul Disord* 2018; 28: 633–8.
- Guglieri M, Magri F, Angelo MGD, Prella A, Morandi L, Rodolico C, et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* 2008; 29: 258–66.
- Israeli D, Cosette J, Corre G, Amor F, Poupiot J, Stockholm D, et al. An AAV-SGCG dose-response study in a γ -sarcoglycanopathy mouse model in the context of mechanical stress. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019; 13: 494–502.
- Kyriakides T, Angelini C, Vilchez J, Hilton-Jones D. European Federation of the Neurological Societies guidelines on the diagnostic approach to paucisymptomatic or asymptomatic hyperCKemia. *Muscle Nerve* 2020; 61: E14–E15.
- Lim LE, Campbell KP. The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 1998; 11: 443–52.
- Lipshultz SE, Law YM, Asante-Korang A, Austin ED, Dipchand AI, Everitt MD, et al. Cardiomyopathy in children: classification and diagnosis: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2019; 140: e9–68.
- Liu W, Pajusalu S, Lake NJ, Zhou G, Ioannidis N, Mittal P, et al. Estimating prevalence for limb-girdle muscular dystrophy based on public sequencing databases. *Genet Med* 2019; 21: 2512–20.
- Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danielli GA, et al. Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve* 1999; 22: 473–9.
- Nalini A, Gayathri N, Thaha F, Das S, Shylashree S. Sarcoglycanopathy Clinical and histochemical characteristics in 66 patients. *Neurol India* 2010; 58: 691–6.
- Oliveira Santos M, Coelho P, Roque R, Conceição I. Very late-onset limb-girdle muscular dystrophy type 2D: a milder form with a normal muscle biopsy. *J Clin Neurosci* 2019; 22: 471–3.
- Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve* 2005; 32: 563–76.
- Politano I, Nigro V, Passamano I, Petretta V, Comi LI, Papparella S, et al. Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies. *Neuromuscul Disord* 2001; 11: 178–85.
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2016; 37: 2129–200.
- Sandonà D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Rev Mol Med* 2009; 11: 1–27.
- Semplicini C, Vissing J, Dahlqvist JR, Stojkovic T, Bello L, Witting N, et al. Clinical and genetic spectrum in limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Neurology* 2015; 84: 1772–81.
- Straub V, Murphy A, Udd B. 229th ENMC International Workshop: limb girdle muscular dystrophies—nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscul Disord* 2017; 28: 702–10.
- Sven ML, Thune JJ, Køber L, Vissing J. Cardiac involvement in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2 and Becker muscular dystrophy. *Arch Neurol* 2008; 65: 1196–201.
- Tarakci H, Berger J. The sarcoglycan complex in skeletal muscle. *Front Biosci* 2016; 21: 744–56.
- Tarnopolsky M, Hoffman E, Giri M, Shoffner J, Brady L. Alpha-sarcoglycanopathy presenting as exercise intolerance and rhabdomyolysis in two adults. *Neuromuscul Disord* 2015; 25: 952–4.
- Trabelsi M, Kavian N, Daoud F, Comnere V, Debrugrave N, Beugnot C, et al. Revised spectrum of mutations in sarcoglycanopathies. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 793–803.
- Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RCM, Marie SK, Oliveira ASB, Zatz M. Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J Neurol Sci* 1999; 164: 44–9.
- Vita G, Vita GL, Stancanelli C, Gentile L, Russo M, Mazzeo A. Genetic neuromuscular disorders: living the era of a therapeutic revolution. Part 1: peripheral neuropathies. *Neurol Sci* 2019; 40: 661–9.
- Winckler PB, da Silva AMS, Coimbra-Neto AR, Carvalho E, Cavalcanti E, Sobreira C, et al. Clinico-genetic lessons from 370 patients with autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Clin Genet* 2019; 96: 341–53.
- Xie Z, Hou Y, Yu M, Liu Y, Fan Y, Zhang W, et al. Clinical and genetic spectrum of sarcoglycanopathies in a large cohort of Chinese patients. *Orphanet J Rare Dis* 2019; 14: 13.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

4.1.1. Material suplementario

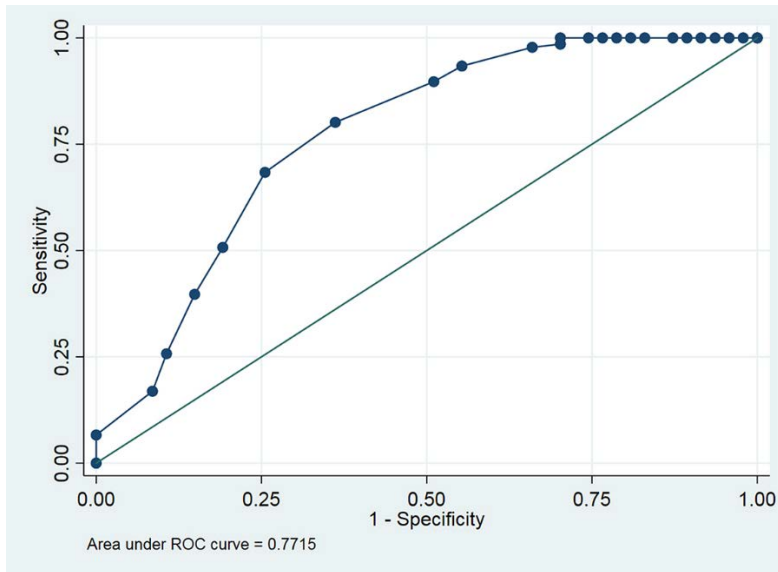


Supplementary Figure 1. Distribution of sarcoglycan patients among all the countries participating in the study. A) SGCA: Alpha patients; B) SGCB: beta patients and C) SGCG: gamma patients. UK: United Kingdom.



Supplementary Figure 2. Risk of being wheelchair bound if age of onset older than 18 years. Kaplan-Meier estimates age in age at wheelchair based in the age of the patients for all sarcoglycan patients. Patients were stratified into two groups: onset of symptoms before eighteen years old and onset of symptoms after eighteen years old.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS



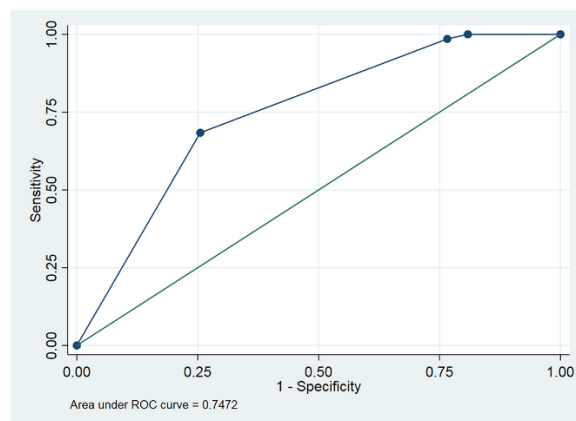
Supplementary Figure 3. Receiver-operator characteristic (ROC) curve of the influence of age at onset and remaining protein expression for distinguishing patients at risk of losing ambulation before the age of 18 years old. A multivariable logistic regression model identified age of onset (OR=1.37 (IC:1.18-1.59), $p=0.001$) and protein expression lower than 30% (OR= 10.7 (IC:2.04-56.22), $p=0.020$) as independent risk factors for losing ambulation before age 18 years. The ROC curve for the final model, showed an are under the curve (AUC) of 0.77 with a P value of 0.042 and 95% confidence interval (CI) were 0.539-0.935.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

A

Age of onset (cut-off)	Sensitivity	Specificity
28	100%	0%
25	100%	1.96%
20	100%	3.92%
15	100%	5.88%
14	100%	9.80%
13	100%	11.76%
12	100%	13.73%
11	99.33%	17.65%
10	99.33%	21.57%
9	95.33%	35.29%
8	90.67%	39.22%
7	81.33%	54.90%
6	69.33%	68.63%
5	51.33%	78.43%
4	39.33%	82.35%
3	25.33%	88.24%
2	16.00%	92.16%
1	6.67%	100%
<1	0%	100%

B



Supplementary Figure 4: Analysis performed to identify which cut-off point of age at onset of symptoms presented the most balanced sensitivity/specificity to predict loss of ambulation before 18 years old for all sarcoglycan patients. A) Sensitivity and specificity of all and cut-off points analyzed. **B)** Receiver-operator characteristic (ROC) curve of the influence of age at onset lower than 6 years old as a predictor of being wheelchair bound before the age of 18 years.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

	All sarcoglycans	Alpha-patients (LGMDR3)	Beta-patients (LGMDR4)	Gamma-patients (LGMDR5)
Asymptomatic patients, n (%)	16 (4.1)	11 (6.9)	0 (0)	5 (3.2)
Sex, M/F	5/11	4/7	-	1/4
Age last visit, average \pm SD (range)	12.8 \pm 11.4 (2 – 38)	14.6 \pm 13.2 (2 – 38)	-	11 \pm 7.9 (3 – 24)
Age at genetic diagnosis average \pm SD (range)	7.5 \pm 7.9 (2 – 32)	9 \pm 9.8 (2 – 32)	-	5 \pm 2.8 (3 – 9)
Affected related, n (%)	9 (56.3)	6 (54.5)	-	3 (60)
Consanguinity, n (%)	2 (12.5)	0 (0)	-	2 (40)
Muscle biopsy performed, n (%)	9 (56.3)	7 (65.6)	-	2 (40)
HyperCKemia, n (%)	16 (100)	11 (100)	-	5 (100)
Motor function (running), n (%)	16 (100)	11 (100)	-	5 (100)
Cardiac/respiratory involvement, n (%)	0 (0)	0 (0)	-	1 (0)

Supplementary Table 1. Clinical and demographic features of asymptomatic patients. M: male, F: female, n: number of patients, %: percentage, SD: standard deviation.

4.2. Artículo 2

Clinical and genetic spectrum of a large cohort of patients with δ -sarcoglycan muscular dystrophy.

Alonso-Pérez J, González-Quereda L, Bruno C, Panicucci C, Alavi A, Nafissi S, Nilipour Y, Zanuteli E, Isihi LMA, Melegh B, Hadzsiev K, Muelas N, Vélchez JJ, Dourado ME, Kadem N, Kutluk G, Umair M, Younus M, Pegorano E, Bello L, Crawford TO, Suárez-Calvet X, Töpf A, Guglieri M, Marini-Bettolo C, Gallano P, Straub V, Díaz-Manera J.

Brain. 2022 Apr 18;145(2):596-606. doi: 10.1093/brain/awab301. PMID: 34515763; PMCID: PMC9014751.



Clinical and genetic spectrum of a large cohort of patients with δ -sarcoglycan muscular dystrophy

🌐 Jorge Alonso-Pérez,¹ Lidia González-Quereda,^{2,3} Claudio Bruno,⁴ Chiara Panicucci,⁴ Afagh Alavi,⁵ Shahriar Nafissi,⁶ Yalda Nilipour,⁷ Edmar Zanoteli,⁸ Lucas Michielon de Augusto Isihi,⁸ Béla Melegh,⁹ Kinga Hadzsiev,⁹ Nuria Muelas,^{3,10,11} Juan J. Vilchez,^{2,11} Mario Emilio Dourado,¹² Naz Kadem,¹³ Gultekin Kutluk,¹³ 🌐 Muhammad Umair,^{14,15} Muhammad Younus,¹⁶ Elena Pegorano,¹⁷ 🌐 Luca Bello,¹⁷ Thomas O. Crawford,¹⁸ Xavier Suárez-Calvet,¹ Ana Töpf,¹⁹ Michela Guglieri,¹⁹ Chiara Marini-Bettolo,¹⁹ Pia Gallano,^{2,3} Volker Straub¹⁹ and Jordi Díaz-Manera^{1,3,19}

Sarcoglycanopathies include four subtypes of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies (LGMDR3, LGMDR4, LGMDR5 and LGMDR6) that are caused, respectively, by mutations in the SGCA, SGCB, SGCG and SGCD genes. Delta-sarcoglycanopathy (LGMDR6) is the least frequent and is considered an ultra-rare disease. Our aim was to characterize the clinical and genetic spectrum of a large international cohort of LGMDR6 patients and to investigate whether or not genetic or protein expression data could predict a disease's severity.

This is a retrospective study collecting demographic, genetic, clinical and histological data of patients with genetically confirmed LGMDR6 including protein expression data from muscle biopsies.

We contacted 128 paediatric and adult neuromuscular units around the world that reviewed genetic data of patients with a clinical diagnosis of a neuromuscular disorder. We identified 30 patients with a confirmed diagnosis of LGMDR6 of which 23 patients were included in this study. Eighty-seven per cent of the patients had consanguineous parents. Ninety-one per cent of the patients were symptomatic at the time of the analysis. Proximal muscle weakness of the upper and lower limbs was the most common presenting symptom. Distal muscle weakness was observed early over the course of the disease in 56.5% of the patients. Cardiac involvement was reported in five patients (21.7%) and four patients (17.4%) required non-invasive ventilation. Sixty per cent of patients were wheelchair-bound since early teens (median age of 12.0 years). Patients with absent expression of the sarcoglycan complex on muscle biopsy had a significant earlier onset of symptoms and an earlier age of loss of ambulation compared to patients with residual protein expression.

This study confirmed that delta-sarcoglycanopathy is an ultra-rare neuromuscular condition and described the clinical and molecular characteristics of the largest yet-reported collected cohort of patients. Our results showed that this is a very severe and quickly progressive disease characterized by generalized muscle weakness affecting predominantly proximal and distal muscles of the limbs. Similar to other forms of sarcoglycanopathies, the severity and rate of progressive weakness correlates inversely with the abundance of protein on muscle biopsy.

1 Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Department of Medicine, Barcelona 08041, Spain

2 Genetics Department, IIB Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona 08041, Spain

Received May 19, 2021. Revised July 05, 2021. Accepted July 22, 2021. Advance access publication September 13, 2021

© The Author(s) (2021). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

- 3 Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Spain
- 4 Center of Translational and Experimental Myology, IRCSS Istituto Giannina Gaslini, Genova 16147, Italy
- 5 Genetics Research Center, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran 13871, Iran
- 6 Department of Neurology, Neuromuscular Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran 14117, Iran
- 7 Pediatric Pathology Research Center, Research Institute for Children Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran 14117, Iran
- 8 Department of Neurology, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 05403, Brazil
- 9 Department of Medical Genetics, and Szentagothai Research Center, University of Pecs, School of Medicine, Pecs 07522, Hungary
- 10 Neuromuscular Diseases Unit, Neurology Department, Hospital Universitari I Politècnic La Fe, Neuromuscular Reference Centre, ERN-EURO-NMD, Valencia, 46026, Spain
- 11 Neuromuscular and Ataxias Research Group, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia 46026, Spain
- 12 Department of Integrative Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Campus Universitário Lagoa Nova, 59012-300 Natal, RN, Brazil
- 13 University of Health Sciences, Antalya Research and Training Hospital, Department of Paediatric Neurology, Antalya 07100, Turkey
- 14 Medical Genomics Research Department, King Abdullah International Medical Research Center (KAIMRC), King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences, Ministry of National Guard-Health Affairs (MNGHA), Riyadh 14611, Saudi Arabia
- 15 Department of Life Sciences, School of Science, University of Management and Technology (UMT), Lahore 54770, Pakistan
- 16 State Key Laboratory of Membrane Biology and Beijing Key Laboratory of Cardiometabolic Molecular Medicine, Institute of Molecular Medicine and Peking-Tsinghua Center for Life Sciences and PKU-IDG/McGovern Institute for Brain Research, Peking University, 100871 Beijing, China
- 17 Department of Neuroscience, University of Padova, Padova 35112, Italy
- 18 Department of Neurology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA
- 19 The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre, Newcastle University and Newcastle Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle-upon-Tyne NE1 3BZ, UK

Correspondence to: Jordi Díaz-Manera
The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre
Newcastle University and Newcastle Hospitals NHS Foundation Trust
Central Parkway, Newcastle-upon-Tyne NE1 3BZ, UK
E-mail: Jordi.Diaz-Manera@newcastle.ac.uk

Keywords: muscular dystrophies; delta-sarcoglycan; SGCD; LGMD-R6/2F; registries

Abbreviation: LGMD = limb-girdle muscular dystrophies

Introduction

Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a heterogeneous group of genetic diseases that affect skeletal muscle causing progressive loss of muscle fibres leading to muscle weakness predominantly affecting the pelvic and shoulder girdle.¹ More than 30 genes causing different types of LGMD have been described so far. Among them, sarcoglycanopathies are one of the most frequent forms especially when symptoms onset during childhood.^{2–7} There are four sarcoglycan genes (SGCA, SGCB, SGGC and SGCD) causing autosomal recessive LGMD (LGMDR3–6 previously known as LGMD2C, D, E and F). The frequency of each type of sarcoglycanopathy varies depending on the studied population, although LGMDR3/LGMD2D and LGMDR5/LGMD2C are the two most frequent forms.⁸

Delta-sarcoglycanopathy (LGMDR6/LGMD2F) is caused by recessive mutations in the SGCD gene and was originally described in 1996,^{9–11} and is thought to be the least common type of sarcoglycanopathy although the number of existing cases is not known. There are only a few reports describing the clinical features of single cases or short cohorts and therefore neither the clinical features nor the disease progression over time is well known.^{12–14}

Sarcoglycanopathies (LGMDR3–6) are in general severe disorders characterized by weakness onset at first decade of life leading to loss

of ambulation during adolescence or early adulthood. However, patients with a milder phenotype with onset of symptoms after the second decade of life, a slowly progressive course and still ambulant after the age of 50 or 60 years have also been described.^{15–18} We have recently observed that symptoms' onset before the age of 10 years, protein expression in the muscle biopsy of < 30% or mutations leading to absence of protein expression were independent risk factors associated with a more severe phenotype characterized by early loss of ambulation.⁸ However, it is not known whether these are also risk factors of quick progression in patients with LGMD-R6.

To answer these questions, we collected demographic, genetic, clinical and muscle protein data of a large international cohort of patients with mutations in SGCD. Our aims were to describe the main clinical and genetic features, investigate potential genotype-phenotype correlations and identify factors influencing the progression of the disease.

Materials and methods

Study design

This is an observational retrospective cross-sectional study reviewing clinical and genetic data of patients with confirmed

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

pathogenic mutations in the *SGCD* gene. Anonymized data from clinical reports were collected in a survey and stored in a secure server in the Hospital de la Santa Creu i San Pau (HSCSP). The study was approved by the Ethics Committee of the HSCSP. To identify patients for the study, we used two different strategies. On the one hand we contacted 128 paediatric and/or adult hospitals from 38 countries. Only 11 neuromuscular centres from nine different countries had patients with delta-sarcoglycanopathy and agreed to participate in the study. On the other hand, we also contacted colleagues that lead next-generation sequencing (NGS) studies in large cohorts of neuromuscular disease patients without diagnosis. These studies actually included 9610 patients. None of these patients had mutations in the *SGCD* gene.

Patient cohort

The inclusion criteria for the study were: (i) genetically confirmed diagnosis of delta-sarcoglycanopathy by identification of two heterozygous or one homozygous pathogenic mutation in the *SGCD* gene; and (ii) enough data available in the clinical records to answer ~70% of the variables of the survey about disease onset and progression, presence or absence of cardiac and respiratory involvement and muscle function status at last clinical assessment.

Data sources

Participating centres completed a survey for each of the patients included in the study. The survey collected demographic, clinical and genetic data of all patients. We also collected information about the muscle biopsy if performed, including morphological features and levels of protein expression measured by immunohistochemistry or immunofluorescence. Cardiac involvement was defined according to international guidelines based on the presence of left ventricular ejection fraction lower than 50% and/or fractional shortening lower than 25% and/or the existence of morphological abnormalities in the ventricular walls evaluated by echocardiography or the existence of cardiac conduction defects identified using ECG or Holter monitoring.^{19,20} The need for ventilatory support was also collected as well as the age at which it was started. A copy of the survey is provided in the Supplementary material.

Mutations in the *SGCD* gene were centrally reviewed by experienced geneticists from HSCSP (L.G.-Q. and P.G.) to confirm pathogenicity and predict protein expression. We considered nonsense, frameshift and canonical splice site mutations as non-protein producing since these mutations will cause a disruption of the reading frame or a considerable shortening of the transcript resulting in mRNA elimination by nonsense-mediated decay or aberrant protein degradation. A sequence-based prediction of impact of the missense mutations on protein function and/or expression was performed using different computational approaches assessing sequence conservation; for example, SIFT²¹ and PANTHER-PSEP,²² as well as sequence and structural features such as PolyPhen-2²³ and MutationTaster.^{24,25} Deep intronic variants were considered compatible with protein production since these variants even when resulting in abnormal splicing they usually produce a residual amount of wild-type transcript.^{26,27}

Statistical analysis

Quantitative variables were analysed using the Shapiro-Wilk test to verify the normal distribution. Comparison between the different subgroups of patients was performed using the Chi-squared test for categorical variables and the Student's *t*-test or Mann-Whitney test for quantitative variables. We used a Cox proportional hazard regression model for the analyses of time to wheelchair.

P was considered significant if lower than 0.05. Hierarchical analysis and graphical representation as a heat map of muscle strength measured using the MRC scale was performed using R software v.3.1.3 as previously described.²⁸ Statistical analysis was performed by J.D.-M. and J.A.-P. using SPSS® Statistics software v.21 from IBM®.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Results

Patient cohort

We contacted 128 paediatric and adult neuromuscular units and/or neurology departments around the world and identified a total of 30 patients with a confirmed genetic diagnosis of LGMDR6. We excluded seven patients because clinical data were not available or updated. The 23 patients included were from nine different countries: Spain, UK, Italy, Hungary, Turkey, Iran, Pakistan, Brazil and Canada. Additionally, we also contacted international centres that have lead research projects using NGS to sequence large cohorts of patients with neuromuscular diseases.^{4,29–34} After reviewing the results of 9610 patients, no patients with delta-sarcoglycanopathy were found.

Among the 23 identified patients with confirmed diagnosis of LGMDR6, 10 were males and 13 were females from 18 different families. Consanguinity was present in 20 patients (87%) and 12 patients (52.2%) had another relative affected by the disease.

Most of the patients (*n* = 21, 91.3%) were symptomatic at the time of data collection. However, two patients were considered presymptomatic as they had neither symptoms nor signs of neuromuscular involvement on clinical examination. These two patients were 4 and 5 years old, respectively, and relatives of other affected patients. Among the 21 symptomatic patients, median age at onset of symptoms was 5.0 years (range: 2–24 years). Diagnostic delay, defined as the time from onset of symptoms to the confirmed genetic diagnosis of the disease range from 1 to 37 years (median: 6.5 years). Median diagnostic delay in patients with onset of symptoms before 2010, when genetic testing was done using Sanger sequencing was of 10.0 years (range: 4–37, *n* = 13), while diagnostic delay in patients with onset of symptoms after 2010, when NGS studies started to be used in the diagnosis process of LGMD was of 2.0 years (range: 0–7, *n* = 10). These differences were statistically significant (*P* = 0.001, Mann-Whitney test).

Table 1 shows the most common symptoms at onset. In summary, proximal lower limb weakness was the most frequent symptom seen in 12 of 21 patients. Five patients (23.8%) complained of muscle pain associated with muscle weakness at the onset of the disease. Seven out of the 21 symptomatic patients were ambulant at their last visit. Median age at loss of ambulation was 12.0 years (range 9–37). Median time from onset of symptoms to loss of ambulation was 7.0 years (range 4–10). We characterized disease progression based on the data collected from the clinical reports and observed that 18 patients (85.7%) were not able to run since a median age of 8.0 years old, 16 patients (76.2%) were not able to stand up from a chair since a median age of 9.5 years and nine patients (42.9%) needed aids to walk since a median age of 10.0 years (Table 1).

At last clinical evaluation, clinical examination showed proximal muscle weakness in all symptomatic patients. Axial (*n* = 13, 61.9%) and distal (*n* = 12, 57.1%) weakness was also present from early stages of the disease, especially in patients with no

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

Table 1 Demographic and clinical features

	LGMDR6/2F
No. of patients	23
Sex, male/female	10/13
Consanguinity, n (%)	21 (87)
Age onset, median ± SD (range)	5.0 ± 6.8 (2–24)
Diagnostic delay (onset–genetic), median ± SD (range)	6.5 ± 7 (1–37)
Age at last evaluation, median + SD (range)	17.0 ± 12.3 (4–50)
Evolution of the disease, years, median ± SD (range)	11.5 ± 8.9 (3–33)
Symptom onset, n (%)	
Proximal lower limb weakness	12 (57.1)
Proximal upper limb weakness	2 (9.5)
Gait disturbance	11 (52.4)
Muscle pain	5 (23.8)
Motor function, n (%); median age ± SD (range)	
Stop running	18 (85.7); 8.0 ± 6.8 (3–32)
Impossibility to stand from a chair	16 (76.2); 9.5 ± 7.3 (7–34)
Walking with aids	9 (42.8); 10.0 ± 1.8 (9–14)
Wheelchair-bound	14 (66.7); 12.0 ± 7.1 (9–37)
Cardiac involvement, n (%); median age ± SD (range)	5 (23.8); 13.0 ± 2.7 (11–17)
Respiratory support, n (%); median age + SD (range)	4 (19.0); 20.5 ± 5.1 (13–24)
Death, n (%)	0 (0)

n = number of families; SD = standard deviation.

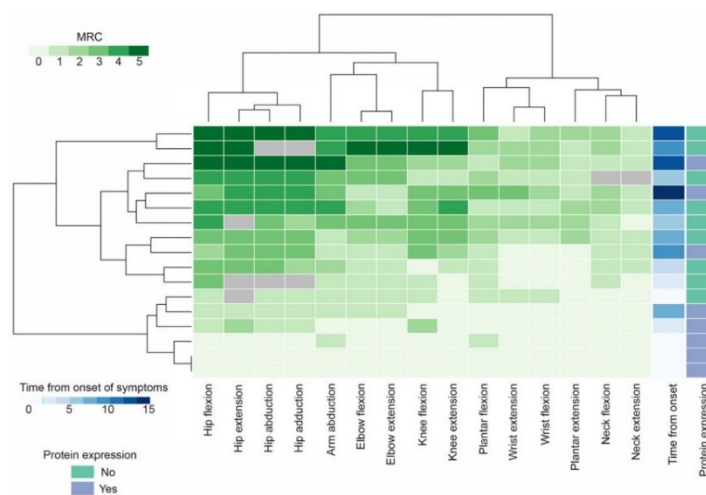


Figure 1 Heat map showing an unsupervised hierarchical clustering of MRC values of patients included in the study. The heat map shows the MRC value for all muscles studied. Patients and muscles were ordered automatically by the software in an unsupervised manner. Hip extension, flexion, abduction and adduction were the weakest movements followed by arm abduction, elbow flexion and extension, and knee flexion and extension. Muscle strength was measured using the MRC scale that scores muscle function from 0 to 5. We observed a correlation between the degree of muscle weakness and time from onset of symptoms and also between MRC and absence of protein expression on the muscle biopsy.

remaining protein expression (Fig. 1). Scoliosis was observed in 12 patients (57.1%) at a median age of 11.5 years (range 7–15). Scapular winging (n = 10, 47.6%), calf hypertrophy (n = 12, 57.1%) and generalized muscle atrophy (n = 13, 61.9%) were also described. Tiptoe walking due to Achilles tendon contractures was

reported in 15 patients (71.4%) at a median age of 9.5 years (range 3–16). Foot deformities, mainly pes cavus due to early lower limb distal muscle weakness was also observed (Fig. 2).

Cardiac involvement, defined as cardiomyopathy or heart rhythm abnormalities, was reported in five patients (23.8%) with a

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

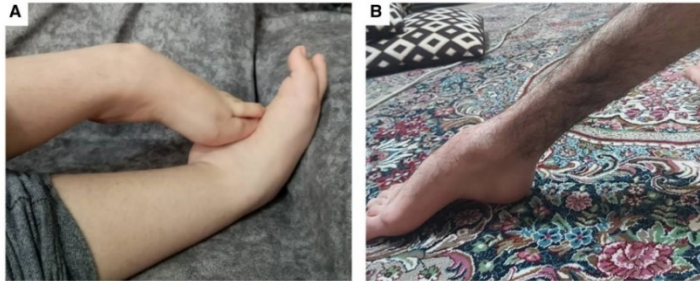


Figure 2 Foot deformities. We identified weakness of the distal muscles of the lower limbs in some of the patients in the cohort that led to the frequent presentation of deformities as the two shown here. (A) A 9-year-old patient with bilateral clubfeet. (B) A pes cavus in an 18-year-old patient.

median age of diagnosis of 13.0 years (range 11–17). Dilated cardiomyopathies were present in three patients (60%) and heart rhythm abnormalities were present in two patients. The last cardiac assessment showed median left ventricle ejection fraction of 40% (range 30–58). Four out of these five patients were under treatment because of the cardiac involvement. Median forced vital capacity at last assessment was of 62.0% (range 44–84). Four patients (19%) required ventilatory support from a median age of 20.5 years (range 13–24) and were using it a median of 9 h per night (range 6–15). None of the patients had a tracheostomy.

A muscle biopsy was performed in 14 patients (60.9%) at a median age of 10.0 years (range 2–34) and a median time of disease duration of 4.5 years (range 1–30). Increase in the amount of fibrotic tissue and presence of necrotic muscle fibres were the most frequent features (64.3 and 50%, respectively). Inflammatory infiltrates were observed in 28.6% of biopsies (Fig. 3A and B). Residual expression of sarcoglycan proteins was studied using immunohistochemistry or immunofluorescence in all patients (Fig. 3C). Six patients had no protein expression of any sarcoglycan subunit while eight patients had some amount of residual expression. There were no differences in the age when biopsy was obtained ($P = 0.295$, Mann–Whitney test) or in the time of progression of the disease ($P = 0.180$, Mann–Whitney test) between patients with residual protein expression and those with no protein expression.

Table 2 shows the clinical, genetic, muscle biopsy features and protein expression of the patients included in this study.

Genetics

Thirteen different pathogenic variants were identified in the SGCD gene (Fig. 4), six of them not previously described. All patients were homozygous for a single variant. The variants identified differed depending of the country of origin, with variant c.657delC, p.(Thr220Profs*6) being the most commonly detected in patients of Brazilian origin (21.7% of patients). Most of the pathogenic variants (65.2%) affected the extracellular domain of the protein. Four frameshift, three nonsense and two splicing mutations are reported in the present work, assuming that they will cause a premature termination of translation in case that the mRNA generated is not rapidly degraded by mRNA nonsense-mediated decay. In addition, three deletions are reported. The mutation c.1_3del.p.Met1del eliminates the translation initiation methionine (M1) located at the very end of exon 2. Protein production could still be possible since the first codon of exon 3 is also a

methionine (M2) that could act as a starting point for the polypeptide, as is the case in the alternative transcript ENST00000435422.7. However, expression of the whole sarcoglycan complex in the muscle biopsy of the cases harbouring this mutation was identified (Table 2). The deletion c.4_192del eliminates 63 amino acids (p.Met2_Ile64del) yet keeps the reading frame so it is difficult to predict its effect on protein structure. This mutation was present in two patients of the cohort with a muscle biopsy that showed severe reduction in protein expression. The deletion c.-519_502del from exon 1 to 6 removes first half of the protein and all protein domains. We identified one missense mutation, p.(Arg198Pro) that has been previously reported as pathogenic³⁵. Assessing the pathogenic effect of a missense variant requires an understanding of its impact on the gene expression and protein structure and function. Missense mutations can affect protein function not only by disrupting their structure and conformation but also influencing its interaction with other proteins or molecules. Thus, the effect of missense mutations is not always easy to predict. This missense variant was neither found in gnomAD nor the 1000 Genomes databases, and its pathogenicity is supported by different prediction tools' scores (Supplementary Table 1).

Genotype–protein expression–phenotype correlation

To study the potential genotype–phenotype correlation in delta-sarcoglycanopathies, we studied the impact of the mutations on the residual protein expression in 14 muscle biopsies. Based on these data we estimated the residual protein expression in the nine remaining patients without muscle biopsy but who shared the same variants in the SGCD gene with the patients who had a muscle biopsy. Patients were classified in two groups: (i) no protein expression if patients had an undetectable expression of the sarcoglycan complex measured by muscle immunohistochemistry or immunofluorescence or carried two frameshift or nonsense mutations; and (ii) residual protein expression detected by immunohistochemistry or immunofluorescence.

We did not observe differences in the duration of the disease, defined as the time from onset of symptoms to last clinical evaluation, between both groups of patients ($P = 0.49$, Student's *t*-test).

Patients with no protein expression had an earlier disease onset (4.1 versus 10.3 years; $P = 0.01$, Mann–Whitney test) (Fig. 5A) and lost ambulation earlier (10.9 versus 17.3 years; $P = 0.03$, Mann–Whitney test) than patients with residual protein expression (Fig. 5B). Consequently, patients with residual protein expression maintained ambulation for a longer period of time ($P = 0.001$,

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

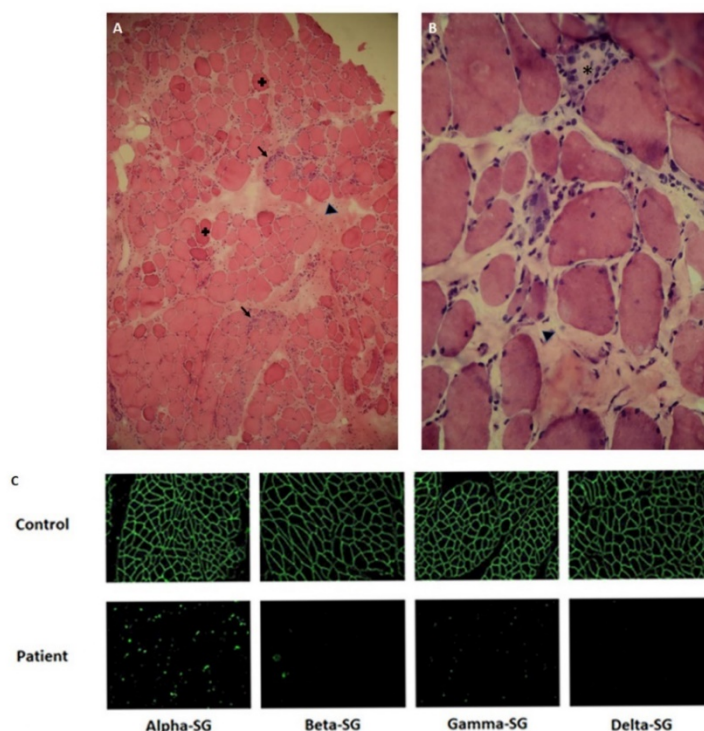


Figure 3 Muscle biopsy. (A and B) Haematoxylin-eosin staining. Necrotic fibres (asterisk), inflammatory infiltrate (arrow), increased fibrosis tissue (arrowhead), hypercontracted fibres (plus symbol). Magnification: $\times 20$ (left) and $\times 40$ (right). (C) Immunofluorescence of sarcoglycan subunits. SG = sarcoglycan.

Mantel–Cox test) (Fig. 5C). The correlation between the age of onset and progression of the disease remains if we analyse the data independently, depending on whether the protein level was obtained from muscle biopsy or by prediction (data not shown).

There were not significant differences in the prevalence of cardiac involvement (Chi-squared test, $P = 0.09$) or the needed for respiratory support (Chi-squared test, $P = 0.21$) between both groups.

Discussion

We report the clinical, genetic and natural history data of the largest series of patients with delta-sarcoglycanopathy described so far. International collaboration has been crucial to gather this number of patients and to obtain information about clinical features and prognosis of the disease. As described in other types of sarcoglycanopathy, patients with residual protein expression had a later onset of disease symptoms and a milder clinical course characterized by later loss of ambulation than patients with no remaining protein expression. These data are especially relevant at present, as genetic therapies are under development and

interventional clinical trials in patients with other types of sarcoglycanopathy are being designed.^{36–38}

Sarcoglycanopathies, as a group, are one of the most common recessive LGMD^{6,39,40}; however, delta-sarcoglycanopathy (LGMDR6) was supposed to be a very rare disease. In recent years, a series of studies have analysed large cohorts of patients with undiagnosed genetic muscle diseases using genes panels and/or whole exome sequencing. The frequency of LGMDR6 in these studies is very low or absent.^{3,6,34,40} Furthermore, published LGMDR6 reports so far have just included a few cases or isolated patients.^{12,13,41} A recent publication analysing a large cohort of European sarcoglycanopathies showed that only 1.5% of the cases were delta-sarcoglycanopathy.⁸ This previous evidence confirms that delta-sarcoglycanopathy can be considered an ultra-rare disease that is defined as having a prevalence lower than 20 patients per million of population or one case per 50000 inhabitants. In the case of delta-sarcoglycanopathy, the prevalence could be much lower probably in the order of one case per million of inhabitants. We do not have a clear explanation why patients with delta-sarcoglycanopathy are so infrequent compared to patients with other forms of

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

Table 2 Clinical and genetic features.c.699 + 1G>T

Pt	Mutation	Age at last evaluation	Age of onset	WCB, age	Distal weakness	Cardiopathy, age	NIV, age	Muscle biopsy	IHQ/IF	Protein expression
1	c.657delC, p.(Thr220Profs*6)	21	7	Yes, 15	Yes	No	No	No		Yes
2	c.657delC, p.(Thr220Profs*6)	8	5	No	No	No	No	No	–	Yes ^a
3	c.657delC, p.(Thr220Profs*6)	27	8	Yes, 15	Yes	No	No	Yes		Yes
4	c.657delC, p.(Thr220Profs*6)	17	6	Yes, 10	Yes	No	No	Yes		Yes
5	c.657delC, p.(Thr220Profs*6)	22	5	Yes, 14	Yes	Yes, 17	Yes, 18	Yes		Yes
6	c.1_3del, p.(Met1del)	5	–	–	–	–	–	–	–	Yes ^a
7	c.1_3del, p.(Met1del)	25	23	No	No	No	No	No	–	Yes ^a
8	c.1_3del, p.(Met1del)	11	7	No	Yes	No	No	No	–	Yes ^a
9	c.1_3del, p.(Met1del)	37	24	No	No	No	No	Yes	↓	Yes
10	c.(3_4-52)_187_193-1del, p.(Met2_1Ile64del)	5	3	No	No	No	No	Yes		Yes
11	c.(3_4-52)_187_193-1del, p.(Met2_1Ile64del)	4	–	–	–	–	–	Yes		Yes
12	c.353-357del, p.(Thr195Serfs*17)	19	2	Yes, 11	Unknown	Yes, 12	No	Yes	–	No
13	c.353-357del, p.(Thr195Serfs*17)	24	9	Yes, 15	Yes	No	Yes, 23	No	–	Yes
14	c.568G>T, p.(Glu190*)	11	4	Yes, 9	Yes	No	No	Yes	–	No ^a
15	c.568G>T, p.(Glu190*)	16	5	Yes, 10	Yes	No	No	Yes	–	No
16	c.422dupT, p.(Thr143Asnfs*13)	10	5	No	Yes	No	No	No	–	No ^a
17	c.289C>T, p.(Arg97*)	13	3	Yes, 10	Yes	No	No	No	–	No ^a
18	c.248-249delCT, p.(Ser83*)	11	4	Yes, 10	Yes	Yes, unknown	No	No	–	No ^a
19	c.89G>A, p.(Trp30*)	29	2	Yes, 9	Unknown	Yes, 19	Yes, 13	Yes	–	No
20	43	3	Yes, 12	Yes, 11	Yes, 24	Unknown	Unknown	Yes	–	No
21	c.593G>C, p.(Arg198Pro)	–	4	Yes, 15	Unknown	Unknown	Unknown	Yes		Yes
22	c.575+1G>T	50	22	Yes, 37	Unknown	Unknown	Unknown	Yes		Yes
23	c.-519_502del, p.0	17	9	No	Yes	No	No	Yes		Yes

IHQ/IF = immunohistochemistry or immunofluorescence detection of protein expression of the whole sarco(mer)myosin complex on muscle biopsies; NIV = non-invasive ventilation required and age at which was started; Pt = patient; WCB = age at which patients were wheelchair-bound. Patients 6 and 11 were asymptomatic at the last assessment.
^aIdentifies patients whose protein expression in the muscle was predicted.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

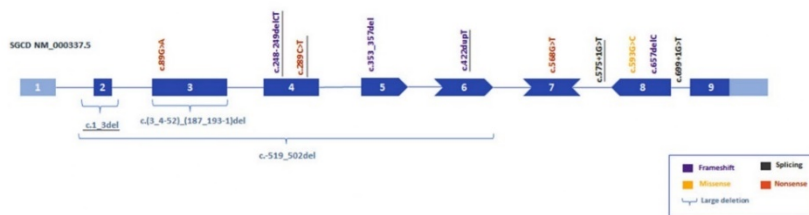


Figure 4 Distribution of the pathogenic variants found in our cohort of patients in the SGCD gene. The graph shows the distribution of the pathogenic variants identified in the patients that participated in the study. Novel variants not previously described are underlined. Bottom right: The legend describes the type of mutation.

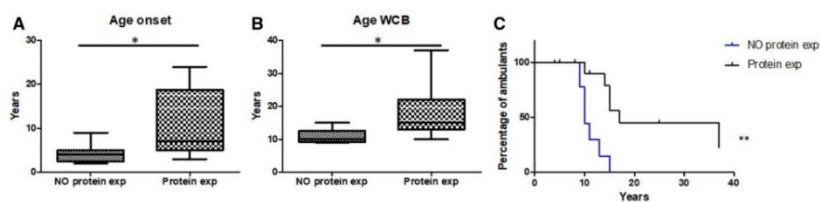


Figure 5 Influence of remaining protein expression. (A) Age of onset of patients with residual protein expression and patient with no protein expression. (B) Age of loss of ambulation of patients with residual protein expression and patient with no protein expression. Mann-Whitney test, * $P < 0.05$. (C) Kaplan-Meier estimates influence of remaining protein expression in age at wheelchair for patients with residual protein expression and patient with no protein expression. Mantel-Cox, ** $P < 0.001$. exp = expression; WCB = wheelchair-bound.

sarcoglycanopathy. One potential explanation could be that mutations in this gene may be lethal during foetal development. If that were the case, this could be more probably related to a cardiac problem than to a skeletal muscle problem as there are no patients with congenital myopathy described so far. On the contrary, it is well known that mutations in the SGCD gene can be associated to developmental problems of the heart in preclinical animal models, such as zebrafish, and also to progressive cardiomyopathy both in humans and animal models.^{42–45} From a functional point of view, both the beta and the delta subunits are the core of the sarcoglycan complex suggesting that lack of beta-sarcoglycan should be as deleterious as the delta subunit for development, but patients with mutations in the SGCB are much more frequent than patients with mutations in the SGCD gene.^{46–48} Another reason could be that SGCD is devoid of sequence more prone to mutate compared to other sarcoglycan genes, but we observed that mutations in the SGCD were located in all the exons, same as the other sarcoglycan genes, suggesting that no particular exons are lethal if mutated.⁸

LGMDs produced by mutations in SGCA, SGCB and SGCG genes have been classically associated with a rapid progression of muscle weakness leading to severe disability, loss of ambulation in the second decade of life and frequently presenting cardiac and respiratory involvement.^{8,49} However, disease progression can be more heterogeneous as several patients, especially those with mutations in the SGCA gene, have a later onset of the disease and can lose ambulation later in life or even remain ambulant.^{8,16,18} To broaden the clinical presentation, patients with alpha-sarcoglycanopathy and isolated hyperCKaemia have been described.⁵⁰ In contrast, patients with beta and gamma sarcoglycanopathies have in general a more homogeneous clinical picture with an early loss of ambulation.^{5,18,49,51} Our data shows that delta-sarcoglycanopathy is similar to other sarcoglycanopathies, with early onset in

the first decade of life, rapid progression and loss of ambulation in the second decade of life in a high percentage of cases. However, we have observed that residual protein expression could influence clinical progression and severity of the disease. Indeed, 77.8% of patients with no remaining protein expression and 87.5% of patients with symptoms onset before the age of 5 years were wheelchair-bound at the age of 15 years. On the other hand, 21.4% of patients with residual protein expression and 25% of patients with symptom onset after the age of 5 years lose ambulation before adolescence. Moreover, only 42.9% of patients with residual protein expression ended up in a wheelchair and in all cases after the age of 10 years. These data support that residual protein expression is associated with a later onset of the disease and better prognosis as is shown in Fig. 3. This finding was also described for alpha, beta and gamma sarcoglycanopathies. However, despite the fact that patients with residual protein expression can have a milder disease progression, this disease is extremely severe as 91.3% of the patients were wheelchair-bound before the age of 18 years.

Beta and delta-sarcoglycan subunits form the core of the sarcoglycan complex and therefore are essential for its assembly.⁴⁷ Mutations in the SGCD gene should therefore translate into a complete disruption of the complex leading to absence of expression of all sarcoglycan subunits in the muscle membrane and, consequently, to a more fragile membrane suffering more damage after every contraction, as has been described in the murine model of the disease.^{48,52} In fact, the delta-sarcoglycan murine model is characterized by severe muscle weakness and cardiac involvement.^{13,53,54} However, in this cohort some of the patients for whom a muscle biopsy was available (8 of 14) did have residual protein expression of the sarcoglycan subunits identified by immunohistochemistry. These patients presented with a later

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

onset and less severe disease, suggesting that residual expression of the different components of the complex was enough to produce a better prognosis.

All patients were homozygous for one pathogenic variant and 87% had a history of consanguinity in the family. The most frequent types of mutation were frameshift mutations (up to 39.1% of the patients); however, 30.4% of patients carried a large deletion affecting one or more exons, which might be missed by Sanger sequencing and could only be confirmed by a quantitative technique such as multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). It is therefore important to use MLPA in those cases with a high suspicion of the disease based on clinical and/or muscle biopsy data if Sanger sequencing does not identify any pathogenic mutation.^{55,56}

Cardiac and respiratory involvement requiring ventilatory support is frequent in patients with sarcoglycanopathy.^{8,57,58} However, there are differences in the frequency and the type of cardiac or respiratory involvement depending on the mutated gene. For example, it is known that cardiac involvement in the form of a cardiomyopathy is more frequent in patients with beta-sarcoglycanopathy, than in patients with alpha or gamma-sarcoglycanopathy.^{8,49,57,59} Loss of delta-sarcoglycan is associated with cardiomyopathy in several preclinical animal models. For example, the different BIO14.6 hamster strains that harbour a deletion in the *SGCD* gene can develop either dilated or hypertrophic cardiomyopathy.⁶⁰ In mice, delta-sarcoglycan deficiency leads to cardiomyopathy that is aggravated as a result of coronary artery vascular irregularities probably as a consequence of the absence of delta-sarcoglycan in the smooth muscle.⁶¹ Delta-sarcoglycan is key for normal cardiac development in zebrafish, leading to left-right asymmetry of the heart and disorganization of the intracellular myofibrils.^{42,62} There has been a long discussion related with the existence of isolated dominant cardiomyopathy produced by heterozygous mutations in the *SGCD* gene. Tsubata et al.⁶³ found a single missense mutation (c.451T>G, p.Ser151Ala) associated with severe dominant cardiomyopathy in a family with three patients carrying this mutation. However, the pathogenic relevance of the p.Ser151Ala variant was challenged when this mutation was discovered in a large consanguineous family homozygous for p.Ala131Pro suffering from *LGMDR6/2F* but lacking any signs of cardiac disease in family members carrying the p.Ser151Ala mutation.⁶⁴ Additionally, the knock-in of p.Ser151Ala caused a rather mild phenotype of cardiomyopathy in mice.⁴⁵ Based on these data, the pathogenic potential of the p.Ser151Ala missense mutation to cause familial cardiomyopathy is unlikely. Surprisingly, we have only observed cardiac involvement in five patients in our cohort (23.8%), which was not related to a longer disease duration or with the level of residual protein expression. None of the patients had previous history of coronary heart disease. These data indicate that, in humans, delta-sarcoglycan deficiency is not always associated to cardiac problems, although a longer follow-up of the patients included here is needed to confirm that they do not develop cardiac problems with age. Respiratory insufficiency requiring ventilatory support was only observed in four patients (19.0%) and was also not related with a longer disease duration or remaining protein expression. These data confirm that periodic assessment of cardiac and respiratory involvement is needed in all cases regardless of a patient's age and the clinical status.

Our study has some limitations. First, data were collected retrospectively and there were some missing data in all cases. Second, quantification of protein expression was carried out through immunofluorescence performed at each centre with different antibodies and techniques including immunohistochemistry or immunofluorescence. Quantification of protein expression using western blot would have been better and could have helped us to

identify a cut-off point predicting a more severe progression, as has been described in other types of sarcoglycanopathy.⁸ Moreover, for some patients, protein expression was estimated based on the results observed in patients sharing the same mutations in whom protein expression was studied in muscle biopsy. Although it is probable that protein expression is similar between patients with the same mutations, this is speculative and therefore these results should be interpreted cautiously. Despite our effort in contacting as many neuromuscular units as possible, we could have missed some delta-sarcoglycanopathy patients for inclusion into our study. An international registry for patients with mutations in the sarcoglycan genes, specifically in this case for patients with mutations in the *SGCD* gene could be useful to identify more patients. However, our series is the largest described so far and includes patients from different countries and ethnicities although there were no patients from Africa or South-East Asia.

In conclusion, our study provides new and relevant information that widens the knowledge on the clinical and genetic features of patients with mutations in the *SGCD* gene. We have identified that residual protein expression is associated with a later onset of disease and milder phenotype with later loss of ambulation. These data should be useful for the design of natural history studies and for clinical trial design, including gene replacement therapies, that are currently under development for other types of sarcoglycanopathy.

Funding

This investigation was sponsored by a grant from the Spanish Ministry of Health, Fondos FEDER-ISCIII P118/01525 to J.D.-M. J.A.P. was supported by the 'Rio Hortega' grant (CM19/00178), Acción Estratégica de Salud (EAS), Instituto de Salud Carlos III (Spain). B.M. and K.H. were supported by grants NKFIH 119540 and EFOP-3.6.1-16-2016-00004. L.G.-Q. and P.G. received funding from FIS P18/01585, funded by ISCIII and FEDER, 'Una manera de hacer Europa'.

Competing interests

All authors report no competing interests.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

1. Straub V, Murphy A, Udd B; LGMD workshop study group. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(8):702–710.
2. Winckler PB, da Silva AMS, Coimbra-Neto AR, et al. Clinicogenetic lessons from 370 patients with autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Clin Genet.* 2019;96(4):341–353.
3. Ten Dam L, Frankhuizen WS, Linssen WHJP, et al. Autosomal recessive limb-girdle and Miyoshi muscular dystrophies in the Netherlands: The clinical and molecular spectrum of 244 patients. *Clin Genet.* 2019;96(2):126–133.
4. Xie Z, Hou Y, Yu M, et al. Clinical and genetic spectrum of sarcoglycanopathies in a large cohort of Chinese patients. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1):43.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

- Chakravorty S, Nallamilli BRR, Khadilkar SV, et al. Clinical and genomic evaluation of 207 genetic myopathies in the Indian subcontinent. *Front Neurol*. 2020;11:559327.
- Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RCM, Marie SK, Oliveira ASB, Zatz M. Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J Neurol Sci*. 1999;164(1):44–49.
- Ginjaar HB, Van Der Kooij AJ, Geelie H, et al. Sarcoglycanopathies in Dutch patients with autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *J Neurol*. 2000;247(7):524–529.
- Alonso-Pérez J, González-Quereda L, Bello L, et al. New genotype-phenotype correlations in a large European cohort of patients with sarcoglycanopathy. *Brain*. 2020;143(9):2696–2708.
- Nigro V, Piluso G, Belsito A, et al. Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet*. 1996;5(8):1179–1186.
- Jung D, Duclos F, Apostol B, et al. Characterization of δ -sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J Biol Chem*. 1996;271(50):32321–32329.
- Nigro V, de Sá Moreira E, Piluso G, et al. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet*. 1996;14(2):195–198.
- Younus M, Ahmad F, Malik E, et al. SGCD homozygous nonsense mutation (p.Arg97*) causing limb-girdle muscular dystrophy type 2F (LGMD2F) in a consanguineous family, a case report. *Front Genet*. 2018;9:727.
- Diñçer P, Bönemann CG, Erdir Aker Ö, et al. A homozygous nonsense mutation in δ -sarcoglycan exon 3 in a case of LGMD2F. *Neuromuscul Disord*. 2000;10(4-5):247–250.
- Bevilacqua JA, Guecaimburu Ehuette M, D R, Perma A, et al. The Latin American experience with a next generation sequencing genetic panel for recessive limb-girdle muscular weakness and Pompe disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15(1):11.
- Trabelsi M, Kavian N, Daoud F, et al. Revised spectrum of mutations in sarcoglycanopathies. *Eur J Hum Genet*. 2008;16(7):793–803.
- Gonzalez-Quereda L, Gallardo E, Töpf A, et al. A new mutation of the SCGA gene is the cause of a late onset mild phenotype limb girdle muscular dystrophy type 2D with axial involvement. *Neuromuscul Disord*. 2018;28(8):633–638.
- Oliveira Santos M, Coelho P, Roque R, Conceição I. Very late-onset limb-girdle muscular dystrophy type 2D: A milder form with a normal muscle biopsy. *J Clin Neurosci*. 2020;72:471–473.
- Tarnopolsky M, Hoffman E, Giri M, Shoffner J, Brady L. Alpha-sarcoglycanopathy presenting as exercise intolerance and rhabdomyolysis in two adults. *Neuromuscul Disord*. 2015;25(12):952–954.
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al.; ESC Scientific Document Group. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2016;37(27):2129–2200m.
- Lipshultz SE, Law YM, Asante-Korang A, et al. Cardiomyopathy in children: Classification and diagnosis: A scientific statement from the American Heart Association. 2019;140(1).
- Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. SIFT missense predictions for genomes. *Nat Protoc*. 2016;11(1):1–9.
- Tang H, Thomas PD. PANTHER-PSEP: Predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. *Bioinformatics*. 2016;32(14):2230–2232.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248–249.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. Mutationtaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11(4):361–362.
- Steinhaus R, Proft S, Schuelke M, Schwarz JM, Seelow D, Cooper DN. OUP accepted manuscript. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W446.
- Møller LB, Tümer Z, Lund C, et al. Similar splice-site mutations of the ATP7a gene lead to different phenotypes: Classical Menkes disease or occipital horn syndrome. *Am J Hum Genet*. 2000;66(4):1211–1220.
- Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing. *J Pathol*. 2010;220(2):152–163.
- Diaz-Manera J, Alejaldre A, González L, et al. Muscle imaging in muscle dystrophies produced by mutations in the EMD and LMNA genes. *Neuromuscul Disord*. 2016;26(1):33–40.
- Ghaoui R, Cooper ST, Lek M, et al. Use of whole-exome sequencing for diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy: Outcomes and lessons learned. *JAMA Neurol*. 2015;72(12):1424–1432.
- Nallamilli BRR, Chakravorty S, Kesari A, et al. Genetic landscape and novel disease mechanisms from a large LGMD cohort of 4656 patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018;5(12):1574–1587.
- Savarese M, Fruscio GD, Magri F, et al. The genetic basis of undiagnosed muscular dystrophies and myopathies: Results from 504 patients. *Neurology*. 2016;87(1):71–76.
- Beecroft SJ, Yau KS, Allcock RJN, et al. Targeted gene panel use in 2249 neuromuscular patients: The Australasian referral center experience. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020;7(3):353–362.
- Gonzalez-Quereda L, Rodriguez MJ, Diaz-Manera J, et al. Targeted next-generation sequencing in a large cohort of genetically undiagnosed patients with neuromuscular disorders in Spain. 2020;11(5):539–512.
- Töpf A, Johnson K, Bates A, et al.; MYO-SEQ consortium. Sequential targeted exome sequencing of 1001 patients affected by unexplained limb-girdle weakness. *Genet Med*. 2020;22(9):1478–1488.
- Boito C, Fanin M, Siciliano G, Angelini C, Pegoraro E. Novel sarcoglycan gene mutations in a large cohort of Italian patients. *J Med Genet*. 2003;40(5):e67.
- Allamand V, Donahue KM, Straub V, Davissou RL, Davidson BL, Campbell KP. Early adenovirus-mediated gene transfer effectively prevents muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Gene Ther*. 2000;7(16):1385–1391.
- Pozsgai ER, Griffin DA, Heller KN, Mendell JR, Rodino-Klapac LR. Systemic AAV-mediated β -sarcoaglycan delivery targeting cardiac and skeletal muscle ameliorates histological and functional deficits in LGMD2E mice. *Mol Ther*. 2017;25(4):855–869.
- Israeli D, Cossette J, Corre G, et al. An AAV-SGCC dose-response study in a γ -sarcoglycanopathy mouse model in the context of mechanical stress. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2019;13:494–502.
- Liu W, Pajusalu S, Lake NJ, et al. Estimating prevalence for limb-girdle muscular dystrophy based on public sequencing databases. *Genet Med*. 2019;21(11):2512–2520.
- Fanin M, Nascimbeni AC, Aurino S, et al. Frequency of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology*. 2009;72(16):1432–1435.
- Passos-Bueno MR, Vainzof M, Moreira ES, Zatz M. Seven autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Brazilian population: From LGMD2A to LGMD2G. *Am J Med Genet*. 1999;82(5):392–398.
- Cheng L, Guo XF, Yang XY, et al. Δ -Sarcoglycan is necessary for early heart and muscle development in Zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344(4):1290–1299.
- Matsunari H, Honda M, Watanabe M, et al. Pigs with δ -sarcoglycan deficiency exhibit traits of genetic cardiomyopathy. *Lab Invest*. 2020;100(6):887–899.
- Sandonà D, Betto R. Sarcoglycanopathies: Molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e28.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

606 | BRAIN 2022; 145; 596–606

J. Alonso-Pérez et al.

45. Rutschow D, Bauer R, Göhringer C, et al. S151A δ -sarcoglycan mutation causes a mild phenotype of cardiomyopathy in mice. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(1):119–125.
46. Taracki H, Berger J. The sarcoglycan complex in skeletal muscle. *Front Biosci - Landmark.* 2016;21(4):744–756.
47. Draviam RA, Shand SH, Watkins SC. The β - δ -core of sarcoglycan is essential for deposition at the plasma membrane. *Muscle and Nerve.* 2006;34(6):691–701.
48. Shi W, Chen Z, Schottenfeld J, Stahl RC, Kunkel LM, Chan Y-M. Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan. *Muscle Nerve.* 2004;29(3):409–419.
49. Semplicini C, Vissing J, Dahlqvist JR, et al. Clinical and genetic spectrum in limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Neurology.* 2015;84(17):1772–1781.
50. Dosi C, Rubegni A, Cassandrini D, et al. Alpha-sarcoglycanopathy presenting as myalgia and hyperCKemia in two adults with a long-term follow-up. Case reports. *Acta Myol.* 2020;39(4): 218–221.
51. Cantero D, Hernández-Lain A, Martínez JFG, et al. Milder forms of α -sarcoglycanopathies diagnosed in adulthood by NGS analysis. *J Neurol Sci.* 2018;394:63–67.
52. Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle and Nerve.* 2005;32(5):563–576.
53. van Putten M, Lloyd EM, de Greef JC, Raz V, Willmann R, Grounds MD. Mouse models for muscular dystrophies: An overview. *Dis Model Mech.* 2020;13(2).
54. Straub V, Duclos F, Venzke DP, et al. Molecular pathogenesis of muscle degeneration in the δ -sarcoglycan-deficient hamster. *Am J Pathol.* 1998;153(5):1623–1630.
55. White SJ, Uitte de Willige S, Verbove D, et al. Sarcoglycanopathies and the risk of undetected deletion alleles in diagnosis. *Hum Mutat.* 2005;26(1):59.
56. Wildförster V, Dekomien G. Detecting copy number variations in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies using a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay. *Mol Cell Probes.* 2009;23(1):55–59.
57. Politano L, Nigro V, Passamano L, et al. Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies. *Neuromuscul Disord.* 2001;11(2):178–185.
58. Schade van Westrum SM, Dekker LRC, De Voogt WG, et al. Cardiac involvement in Dutch patients with sarcoglycanopathy: A cross-sectional cohort and follow-up study. *Muscle and Nerve.* 2014;50(6):909–913.
59. Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, et al. Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve.* 1999;22(4):473–479.
60. Sakamoto A, Ono K, Abe M, et al. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, δ -sarcoglycan, in hamster: An animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):13873–13878.
61. Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, et al. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: A novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell.* 1999;98(4):465–474.
62. Guyon JR, Mosley AN, Jun SJ, et al. δ -Sarcoglycan is required for early zebrafish muscle organization. *Exp Cell Res.* 2005;304(1): 105–115.
63. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, et al. Mutations in the human δ -sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2000;106(5):655–662.
64. Goehring C, Rutschow D, Bauer R, et al. Prevention of cardiomyopathy in δ -sarcoglycan knockout mice after systemic transfer of targeted adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc Res.* 2009;82(3):404–410.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

4.2.1. Material suplementario

cDNA (Chr5(GRCh37), NM_000337.5)	Protein	N	Mutation type	CADD	REVEL	DANN	Mutation Taster	Polyphen-2
c.657delC	p.Thr220Profs*6	5	Frameshift	
c.1_3del	p.Met1deI	4	Frameshift deletion	
c.4_192del	p.Met2_Ile64del	2	In frame
c.568G>T	p.Glu190*	2	Nonsense	51	.	0.995	A	.
c.354_358del	p.Thr119Serfs*17	1	Frameshift
c.593G>C	p.Arg198Pro	1	Missense	35	0.953	0.998	D	
c.289C>T	p.Arg97*	1	Nonsense	41	.	0.998	D	0.999
c.89G>A	p.Trp30*	1	Nonsense	39	.	0.996	A	
c.575+1G>T	p.?	1	Splicing	25.9	.	0.995	D	
c.422dup	p.Thr143Asnfs*13	1	Frameshift	
c.248_249del	p.Ser83*	1	Nonsense
c.699+1G>T	p.?	1	Splicing	26.2	0.556	0.996	D	
c.-519_502del	p.?	1	Frameshift					

Supplemental table 1: Prediction of pathogeny of mutations identified in the cohort. The table displays all variants identified in the patients of the cohort in the *SGCD* gene and their expected effect on protein as well as the number of patients harbouring the mutation (N), the mutation type and the results of the pathogenicity scores using the following prediction in Silico tools CADD, REVEL, DANN, Mutation Taster and Polyphen-2. For CADD a value higher than 20 is considered deleterious. In REVEL, scores higher than 0.5 are considered "likely disease causing". Using DANN scores ranges from 0 to 1, the higher the value the more likely the mutation to be deleterious. Mutation Taster provides 5 categories being D: disease causing, A: disease causing automatic, N: polymorphism and P: polymorphism automatic. Using Polyphen-2 values greater than 0.908 are considered "probably damaging".

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

4.3. Artículo 3

Nintedanib Reduces Muscle Fibrosis and Improves Muscle Function of the Alpha-Sarcoglycan-Deficient Mice.

Alonso-Pérez J, Carrasco-Rozas A, Borrell-Pages M, Fernández-Simón E, Piñol-Jurado P, Badimon L, Wollin L, Lleixà C, Gallardo E, Olivé M, Díaz-Manera J, Suárez-Calvet X.

Biomedicines. 2022 Oct 19;10(10):2629. doi: 10.3390/biomedicines10102629. PMID: 36289891; PMCID: PMC9599168.



Article

Nintedanib Reduces Muscle Fibrosis and Improves Muscle Function of the Alpha-Sarcoglycan-Deficient Mice

Jorge Alonso-Pérez ^{1,2}, Ana Carrasco-Rozas ^{1,2}, Maria Borrell-Pages ^{3,4}, Esther Fernández-Simón ⁵, Patricia Piñol-Jurado ⁵, Lina Badimon ^{3,4}, Lutz Wollin ⁶, Cinta Lleixà ^{1,2}, Eduard Gallardo ^{1,2,7}, Montse Olivé ^{1,2,7}, Jordi Díaz-Manera ^{1,2,5,7,*} and Xavier Suárez-Calvet ^{1,2,7,*}

- 1 Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB SANT PAU), 08041 Barcelona, Spain
 - 2 Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08041 Barcelona, Spain
 - 3 Cardiovascular Program ICCV, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Research Institute, IIB-Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain
 - 4 Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Cardiovasculares (CIBER-CV), Instituto de Salud Carlos III, 28222 Madrid, Spain
 - 5 The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre, Newcastle University and Newcastle Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle upon Tyne NE1 3BZ, UK
 - 6 Boehringer Ingelheim, 88400 Biberach, Germany
 - 7 Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, 28222 Madrid, Spain
- * Correspondence: jordi.diaz-manera@newcastle.ac.uk (J.D.-M.); xsuarez@santpau.cat (X.S.-C.)
† These authors contributed equally to this work.

Citation: Alonso-Pérez, J.; Carrasco-Rozas, A.; Borrell-Pages, M.; Fernández-Simón, E.; Piñol-Jurado, P.; Badimon, L.; Wollin, L.; Lleixà, C.; Gallardo, E.; Olivé, M.; et al. Nintedanib Reduces Muscle Fibrosis and Improves Muscle Function of the Alpha-Sarcoglycan-Deficient Mice. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2629. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102629>

Academic Editor: France Piétri-Rouxel

Received: 9 September 2022
Accepted: 15 October 2022
Published: 19 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Sarcoglycanopathies are a group of recessive limb-girdle muscular dystrophies, characterized by progressive muscle weakness. Sarcoglycan deficiency produces instability of the sarcolemma during muscle contraction, leading to continuous muscle fiber injury eventually producing fiber loss and replacement by fibro-adipose tissue. Therapeutic strategies aiming to reduce fibro-adipose expansion could be effective in muscular dystrophies. We report the positive effect of nintedanib in a murine model of alpha-sarcoglycanopathy. We treated 14 *Sgca*^{-/-} mice, six weeks old, with nintedanib 50 mg/kg every 12 h for 10 weeks and compared muscle function and histology with 14 *Sgca*^{-/-} mice treated with vehicle and six wild-type littermate mice. Muscle function was assessed using a treadmill and grip strength. A cardiac evaluation was performed by echocardiography and histological study. Structural analysis of the muscles, including a detailed study of the fibrotic and inflammatory processes, was performed using conventional staining and immunofluorescence. In addition, proteomics and transcriptomics studies were carried out. Nintedanib was well tolerated by the animals treated, although we observed weight loss. *Sgca*^{-/-} mice treated with nintedanib covered a longer distance on the treadmill, compared with non-treated *Sgca*^{-/-} mice, and showed higher strength in the grip test. Moreover, nintedanib improved the muscle architecture of treated mice, reducing the degenerative area and the fibrotic reaction that was associated with a reversion of the cytokine expression profile. Nintedanib improved muscle function and muscle architecture by reducing muscle fibrosis and degeneration and reverting the chronic inflammatory environment suggesting that it could be a useful therapy for patients with alpha-sarcoglycanopathy.

Keywords: sarcoglycanopathy; *Sgca*; muscular dystrophy; fibrosis; nintedanib; mice

1. Introduction

Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a heterogeneous group of genetic diseases affecting skeletal muscle leading to progressive muscle weakness and irreversible disability [1]. Pathogenic variants in more than 30 genes have been described as the cause of LGMD, being the sarcoglycanopathies one of the most frequent forms, especially in the

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

pediatric population [2–7]. There are four sarcoglycan genes: SGCA, SGCB, SGCD and SGCG, that encode for the alpha-, beta-, delta- and gamma-sarcoglycan protein, respectively, causing four recessive LGMD (LGMDR 3 to 6). Alpha-sarcoglycanopathy (LGMDR3), together with gamma-sarcoglycanopathy (LGMDR5), are the most frequent forms of sarcoglycanopathy, although depending on the population studied, the frequency of the type of sarcoglycanopathy may be different [4,7–9].

Sarcoglycans are transmembrane glycoproteins that form a tetrameric complex across the cell membrane of skeletal and cardiac muscle fibers [10–12]. This complex plays an important role in maintaining membrane integrity during the contraction and relaxation of skeletal muscle through its association with the dystroglycan complex, which links the subsarcolemmal protein dystrophin to the basement membrane [12,13]. Pathogenic variants in any of the four sarcoglycan genes disrupt the whole complex, leading to a loss of muscle membrane integrity and its rupture after each muscle contraction [13,14].

The process of muscle fiber degeneration in muscular dystrophies has been well characterized [15]. It has been reported and is well-accepted that muscle membrane instability leads to continuous muscle fiber damage, leading to several cycles of myofiber degeneration and regeneration. This process produces a modification of the muscle microenvironment both at a cellular and molecular level. On the one hand, there is a continuous activation of satellite cells, that aim to regenerate the injured muscle fibers, but on the other hand, there is a persistent infiltration of inflammatory profibrotic cells, mainly M2 macrophages, which release several cytokines orchestrating the degenerative process [16–18]. It has been suggested that these cytokines, mainly TGF- β and CTGF, among many others, activate the proliferation and differentiation of fibroadipogenic progenitor cells (FAPs), which are key in the expansion of the fibrotic and adipose tissue replacing muscle fibers [19]. The expansion of fibrotic and adipose tissue has negative consequences for the muscle, including their lack of contractile properties leading to muscle weakness and contractions and the impaired satellite cells' ability to efficiently regenerate the damaged muscles. Eventually, the majority of muscle fibers are lost, and the skeletal muscles are replaced by fibrotic and adipose tissue [18,20].

Among the therapeutic strategies being developed for patients with muscular dystrophies, drugs interfering with the expansion of fibro-adipose tissue have been already proposed. For example, drugs decreasing TGF- β activity have been shown to reduce the amount of fibrous tissue but also to increase inflammatory infiltrates in the muscles of murine models of muscular dystrophies [21,22]. These initial results promoted research to explore the role of other growth factors on muscle fibrosis and treatments that counteract [23–27]. Alternatively, interfering with the chronic inflammatory process that enhances the expansion of fibrotic tissue has also been proposed as a therapeutic option [26,28–30]. In this sense, treatment with corticosteroids slows down disease progression and improves survival in patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD) and is considered part of the standard of care for these patients [31]. More recently, drugs blocking the P2X7 purinoreceptor, which is over-expressed in dystrophic muscle and plays a role in the induction of immune response, have been shown to reduce the inflammatory response and consequently muscle fibrosis in mdx and Sgca murine models [32].

Within the different growth factors that could be involved in the fibrotic process in muscular dystrophies, the family of platelet-derived growth factors (PDGF) has centered our interest in the last few years. We demonstrated that PDGF-AA is increased in muscle samples of patients with DMD and PDGF-AA enhances fibroblast and FAP cell proliferation, migration and collagen expression [23,24]. The PDGF receptor has been targeted with different treatments, including imatinib and crenolanib which are tyrosine kinase inhibitors (TKi), with a positive effect in reducing fibrosis in the muscles, but leading to severe adverse effects [33,34]. Nintedanib is a second-generation TKi targeting PDGF α and β receptors (PDGFRA and PDGFRB), fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2 and 3 and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 1–3 [35]. The anti-fibrotic activity of nintedanib has been demonstrated *in vitro* in primary lung fibroblasts from patients with

idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) but also in muscle fibroblasts from DMD and in dermal fibroblasts from patients with systemic sclerosis, and in vivo in animal models of several fibrotic diseases [24,36,37]. Moreover, nintedanib is approved for the treatment of IPF, which is characterized by fibrosis of the lungs [38–40].

In this study, we evaluated the effect of nintedanib on muscle fibrosis and modulation of the inflammatory response as well as on motor function in a mouse model of alpha-sarcoglycanopathy.

2. Materials and Methods

2.1. Mouse Model

Six-week-old B6.129S6-Sgcatm2Kcam/J mice (JAX stock #008275) [41] ($n = 14$, 7 male and 7 female) were treated with 50 mg/kg of Nintedanib (from now on, Sgca^{-/-}-T) (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) or vehicle (from now on, Sgca^{-/-}-NT; $n = 14$, 8 male and 6 female). The concentration of Nintedanib (50 mg/kg twice daily) was chosen based on previous in vivo studies, in which this dose was chosen for its optimal efficacy in mice [37,42]. Mice were treated every 12 h for 10 weeks. Six C57BL6 healthy mice were also included as controls (from now on Wt; $n = 6$, 4 male and 2 female). Nintedanib was solubilized in sterile ultra-pure water (Braun, Rubi, Spain) and administered by gavage. Functional motor and echocardiographic studies were performed in all animals of the three groups before starting treatment (baseline), in the middle of the treatment period (week 5) and at the end of treatment (week 10). At 16 weeks of age animals were euthanized and the quadriceps, gastrocnemius, triceps and heart muscles were collected and processed for analysis (Figure 1A). All animal procedures were performed according to the National Institute of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals [43] and were approved by the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Animal Ethics Committee. To control the safety of the drug, weight control was performed by monitoring every two days. Progressive weight loss or loss of more than 2 g of weight in successive controls was established as a criterion for discontinuation of treatment.

2.2. In Vivo Muscle Function

The effect of the treatment with nintedanib on the maximal running capability of mice was assessed using a treadmill (Columbus Instruments Exer 3/6 Treadmill, Columbus, OH, USA) following the standard guidelines proposed by TREAT-NMD. In summary, after the acclimatation period, mice were placed on the treadmill at a starting running speed of 5 m/min accelerating 1.5 m/min until reaching a final velocity of 36 m/min. The test was finished when mice became exhausted, defined as the inability of mice to run for 10 s despite gentle push with the hand in the running direction, or if the mice touched the end of the belt more than 40 times. This protocol was adapted from TREAT-NMD guidelines (<https://treat-nmd.org/resources-support/research-overview/preclinical-research/experimental-protocols-for-dmd-animal-models/>; accessed on 9 September 2022) and from previously published works [44,45]. Maximum grip strength in the forelimbs was assessed using a grip strength meter (Columbus Instruments Grip Strength Meter, Columbus, OH, USA). Five measurements were recorded per animal and time point. The three highest values were selected and normalized for body weight (Newtons/grams).

2.3. Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed using the Vevo 2100 ultrasound system (Visualsonics, Toronto, Canada) equipped with a high-frequency (30 MHz) linear array transducer. Animals were placed supine on an electrical heating pad at 37 °C under light isoflurane anesthesia (2% isoflurane). Continual ECG monitoring was obtained via limb electrodes. Two-dimensional and M-mode images were obtained in parasternal long-axis and short-axis views, respectively. Careful attention was paid to image depth, width and gain settings, in order to optimize image quality. All views were digitally

stored in cine loops consisting of 300 frames. Measurements of LV interventricular septal thickness (IVS), LV internal dimensions (LVID) and the thickness of the LV posterior wall (LVPW) and the LV anterior wall (LVAW) at diastole and systole (IVSd, LVIDd, LVPWd, LVAWd and IVSs, LVIDs, LVPWs, LVAWs, respectively) were obtained. Any images obtained with suboptimal physiological parameters were excluded from the analysis. Subsequent analysis was performed by an experienced cardiologist blind to genotype and treatment. Ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), stroke volume (μL) and cardiac output were determined.

2.4. Histology and Immunofluorescence

Frozen muscle sections of $7\ \mu\text{m}$ were obtained using a Leica cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). For the evaluation of the compromise along each muscle, the following procedure was performed. Starting from the central segment of each muscle, 60–80 slices were obtained that were distributed both for histology, immunofluorescence and Fast Green–Sirius Red studies, so that a representation of various levels of each muscle was obtained with the aim of improving the interpretation of global involvement of each muscle.

For histological evaluation sections of the quadriceps, gastrocnemius, triceps and heart were stained with hematoxylin and eosin (H-E) following standard protocol. The analysis of the H-E staining was performed by assessing the percentage of tissue affected by necrosis, fibrosis and inflammation evaluating the entire muscle section, as previously described [46,47]. For immunofluorescence studies, tissue sections were fixed with acetone for 5 min, washed with PBS and incubated with blocking solution (Cat. N° SC516214) (UltraCruz Blocking Reagent—Santa Cruz Biotech) for 30 min. Tissue sections were incubated with goat polyclonal anti-Collagen I-UNLB (Cat. N° 1441-01) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), goat polyclonal anti-PDGFR α (Cat. N° AF1062-SP) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), rat monoclonal anti-F4/80 BM8 (Cat. N° 14-4801-82) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). The Mouse on Mouse (M.O.M.[®]) Immunodetection Kit (BMK2202) (Vector Laboratories, Newark, CA, USA) was used for the immunofluorescence studies using mouse monoclonal anti-embryonic Myosin heavy chain (eMyHC) (Cat. N° F1.652) (DSHB, Houston, TX, USA). Appropriate Alexa-conjugated secondary antibodies were used at 1/400 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Images were obtained with an Olympus BX51 microscope coupled to a DP72 camera (Olympus, Tokyo, Japan). ImageJ software was used to quantify the positive area according to negative controls. A minimum of six independent fields per staining were quantified [48].

2.5. Fast Green-Sirius Red

Collagen content in quadriceps, gastrocnemius, triceps muscles and the heart was quantified by the Fast Green-Sirius Red (FG-SR) technique, as previously described [49,50]ss. Briefly, ten cryosections were collected in a microtube and sequentially incubated with a solution containing 0.1% Fast green in saturated picric acid (Cat. N° F7252-5G) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 min, washed with distilled water and incubated with 0.1% Fast green and 0.1% Sirius red (Cat. N° O0625) (Sigma, St. Louis, MO, USA) in saturated picric acid for 90 min. The sections were washed with distilled water and gently shaken in a solution of 0.1 M NaOH (Cat. N° 106462) (Merck, Burlington, Massachusetts, USA) in absolute methanol (1:1) (Cat. N° 67-56-1) (Sigma-Aldrich) for 20 min. Absorbance was measured in a spectrophotometer at 540 and 605 nm wavelengths. Total protein and collagen equivalences of the obtained absorbance values were calculated afterwards. Collagen values were expressed as the percentage of the total protein in the muscle sample.

2.6. Cytokine and Chemokine Arrays

We assessed the effect of nintedanib on the concentration of several cytokines and chemokines involved in the muscle inflammatory process by using the Proteome Profiler Mouse Cytokine Antibody Array Kit (Cat. N° ARY006) (R&D Systems) which, simultaneously, detects 40 cytokines, chemokines and acute phase proteins (Table S1). We assessed the concentration of these molecules in muscle samples of four *Sgca*^{-/-}T mice, four *Sgca*^{-/-}NT mice and three Wt mice that were randomly selected. A fragment of the quadriceps muscle was disrupted using TissueRuptor II (QIAGEN, Germantown, MD, USA), incubated with RIPA lysis and a protein extraction buffer (Cat. N° R0278-50ML) (Sigma, St. Louis, MO, USA), containing protease inhibitor cocktail (Cat. N° P8340-1ML) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and quantified using Protein Assay Reagent B (Cat. N° 500-0114) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), according to manufacturer's recommendations. A total of 100 µg of protein lysate per animal was assayed. Data were expressed as a fold change compared to the Wt group. The protein network for bioinformatics analysis of the modulated cytokines was generated using the STRING® version 11.5 platform (ELIXIR, Hinxton, Cambridgeshire, UK) [51]. Data generated by the STRING analysis, including the Reactome® (version 82) pathways (ELIXIR, Hinxton, Cambridgeshire, UK), were adjusted by using the false discovery rate (FDR).

2.7. Gene Expression Profiling

The effect of nintedanib on the expression of fibrosis-related genes was assessed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) using the TaqMan® Array Mouse Fibrosis (Cat. N° 4413255) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) which allows the analysis of 84 fibrosis-related genes and 12 endogenous gene candidates (Table S2). We isolated a total RNA from the same mouse muscle samples, randomly selected for the array studies. Briefly, RNA was extracted from quadriceps muscle from each included animal using TRIzol™ Reagent (Cat. N° 15596018) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) in conjunction with the PureLink™ RNA Mini Kit (Cat. N° 12183018A) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Contaminating DNA was digested with PureLink® DNase (Cat. N° 12185010) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). RNA was quantified using a nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). In all samples, 6 µg of total RNA was reverse-transcribed to complementary DNA (cDNA) using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Cat. N° 4368814) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). RT-qPCR was performed using the Fast TaqMan® Universal PCR Master Mix (Cat. N° 4352042) (Applied Biosystems) and a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Relative quantification was performed using the comparative Ct method with the Sequence Detection System (SDS) software (Applied Biosystems) [52]. A *Tbp* gene was used as an endogenous control as it showed stable expression across the different experimental groups (Figure S1).

2.8. Statistical Analysis

Quantitative variables were analyzed using the Shapiro–Wilk test to verify their normal distribution. Comparison between the different subgroups of mice was performed using a one-way ANOVA test. When ANOVA revealed significant differences, the Tukey post hoc test was performed. The statistical analyses were calculated using GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Nintedanib Improves Muscle Endurance and Strength in *Sgca*^{-/-} Mice

We evaluated the effect of nintedanib on muscle function using two different tests. The treadmill test is considered a muscle endurance test that evaluates the maximum running capability. At baseline, when the mice were 6 weeks old and before starting the

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

treatment, no statistically significant differences were observed in the distance covered by *Sgca*^{-/-}T, *Sgca*^{-/-}NT and Wt mice. At 11 weeks of age, Wt mice showed a greater increase in the distance covered, compared with the *Sgca*^{-/-}NT or the *Sgca*^{-/-}T mice. However, at that time point, there were already statistically significant differences in the running distance between *Sgca*^{-/-}T and *Sgca*^{-/-}NT mice (83.3 vs. 34.1 m, two-way ANOVA test–Tukey test, $p < 0.001$). At 16 weeks, after 10 weeks of treatment, the differences between *Sgca*^{-/-}T and *Sgca*^{-/-}NT were bigger (108.9 vs. 41.9 m, two-way ANOVA test–Tukey test, $p < 0.001$) (Figure 1B).

To assess muscle strength, we evaluated the maximum grip strength in the forelimbs. At baseline, there were no differences amongst groups. At 11 weeks, after 5 weeks of treatment, we observed a 1.2-fold reduction in muscle strength in *Sgca*^{-/-}NT mice, compared to *Sgca*^{-/-}T mice (two-way ANOVA test–Tukey test, $p = 0.005$). At that time point, there were no significant differences in grip strength between the Wt and *Sgca*^{-/-}T groups (two-way ANOVA test–Tukey test, $p = 0.165$). Similarly, at 16 weeks *Sgca*^{-/-}NT mice continued to show a 1.2-fold significant reduction in muscle strength compared to *Sgca*^{-/-}T mice (two-way ANOVA test–Tukey test, $p = 0.016$). Finally, non-significant differences were observed between *Sgca*^{-/-}T mice and Wt mice, although muscle strength was lower in *Sgca*^{-/-}T mice (two-way ANOVA test–Tukey test, $p = 0.25$). (Figure 1B).

No significant difference was observed between *Sgca*^{-/-}NT, *Sgca*^{-/-}T and Wt mice in weight gain after 10 weeks of treatment (two-way ANOVA test–Tukey test, $p = 0.10$), however, a greater weight gain was observed in *Sgca*^{-/-}NT compared to *Sgca*^{-/-}T mice (29.9% vs. 23.3%) (Figure S2).

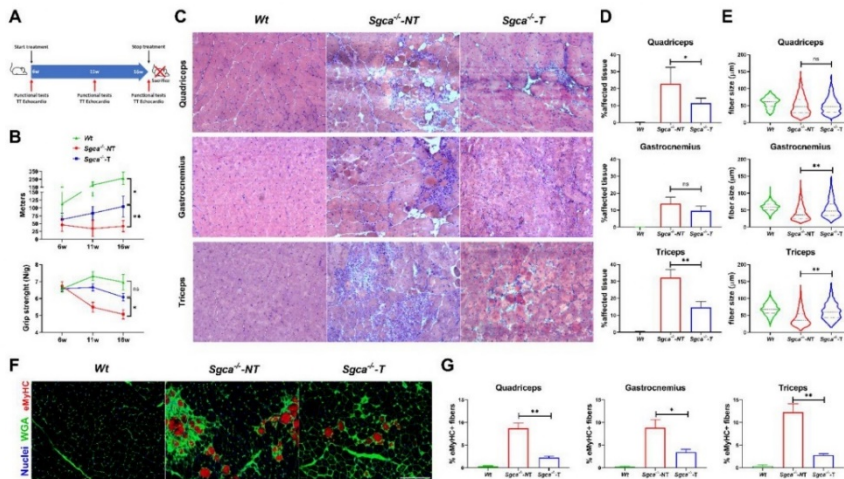


Figure 1. Effect of nintedanib on muscle function and architecture (A) Scheme of the experimental design and the treatment of mice with nintedanib. (B) Results of the muscle functional tests at the different time points. Top panel, treadmill test showing a significant improvement of the covered distance of *Sgca*^{-/-}T compared to *Sgca*^{-/-}NT. Bottom panel, grip strength test showing that muscle strength significantly improved after treatment with nintedanib. (C) Representative pictures of the hematoxylin and eosin (H-E) staining of muscle sections from quadriceps, gastrocnemius and triceps of all *Wt*, *Sgca*^{-/-}NT and *Sgca*^{-/-}T mice. (D) Histological assessment of the affected muscle tissue including muscle necrosis, fibrosis and inflammation in *Wt*, *Sgca*^{-/-}NT and *Sgca*^{-/-}T mice. (E) Cross-sectional muscle fiber area quantification in muscle sections from quadriceps, gastrocnemius and

triceps. (F,G) Effect of nintedanib on the number of regenerating muscle fibers. Representative images of eMyHC staining are shown (F) and the percentage eMyHC positive fibers over total fibers are shown (G). TT: Transthoracic. Genetic background mouse strain C57Bl₁. (Wt); $n = 6$, no-treated Sgca^{-/-} mice (Sgca^{-/-}-NT), $n = 14$; nintedanib-treated Sgca^{-/-} mice (Sgca^{-/-}-T). Data are expressed as means \pm SD. w = weeks; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$. Scale bar = 200 μ m.

3.2. Effects of Nintedanib on Cardiac Function and Ventricular Remodeling in Wt and Sgca^{-/-} Mice

Diastolic and systolic functions were assessed by echocardiography at baseline, five and 10 weeks of treatment. At 10 weeks of treatment, when the animals were 16 weeks old, we observed differences in the systolic function of Sgca^{-/-}-NT mice compared to Wt mice. However, at that time point, Sgca^{-/-}-T mice showed similar systolic functions as untreated Sgca^{-/-}-NT mice. Left ventricle (LV) wall thickening assesses global LV function in the absence of abnormal wall motion. Interestingly, the LV anterior wall of Sgca^{-/-}-NT mice was thicker than Wt littermates, and this morphologic trait was mitigated in Sgca^{-/-}-T mice, suggesting a potential role of nintedanib in the cardiac ventricle wall size (Figure S3A). However, functional analysis of the heart by the analyses of the ejection (EF%) and shortening fraction (FS%) showed that both Sgca^{-/-}-T and Sgca^{-/-}-NT mice have worse performances than their Wt littermates, suggesting that Sgca^{-/-} null mice develop a cardiac dysfunction early in their life. Despite these alterations at the functional level, we did not find structural differences in heart sections stained with H-E between Wt and Sgca^{-/-}-NT nor an increase in collagen in the hearts of Wt, Sgca^{-/-}-T or Sgca^{-/-}-NT mice. (Figure S3B).

3.3. Nintedanib Improves Skeletal Muscle Architecture

We assessed the effect of 10 weeks of nintedanib treatment on muscle architecture by quantifying the amount of tissue affected, including areas of necrosis, fibrosis and inflammation by H-E staining, as previously described [46,47] (Figure 1C). We found a significant reduction in the percentage of affected tissue between the Sgca^{-/-}-NT and Sgca^{-/-}-T mice in the quadriceps (ANOVA test–Tukey test, $p = 0.02$) and triceps (ANOVA test–Tukey test, $p < 0.001$) muscles. A tendency towards a reduced affected tissue was also observed in the gastrocnemius (ANOVA test–Tukey test, $p = 0.09$) (Figure 1D). Significant differences in fiber size between the Sgca^{-/-}-NT and Sgca^{-/-}-T mice were found in the gastrocnemius (Mann–Whitney test, $p < 0.001$) and triceps (Mann–Whitney test, $p < 0.001$) (Figure 1E). In detail, muscle fiber size was more homogeneous, and fibers tended to be smaller. To investigate the effect of nintedanib in muscle regeneration, we quantified the number of fibers expressing eMyHC, a marker of regenerative muscle fiber, per every 100 muscle fibers, and observed a significant decrease in the percentage of eMyHC + fibers in all muscles assessed in Sgca^{-/-}-T, compared with Sgca^{-/-}-NT mice (ANOVA test–Tukey test, $p < 0.001$) (Figure 1F,G).

3.4. Nintedanib Reduces Muscle Fibrosis in Sgca^{-/-} Mice

We quantified the total collagen content in the muscle in relation to the total protein content by the Fast Green–Sirius Red technique [49,50]. We observed a significant reduction in the collagen/total protein ratio in quadriceps (ANOVA test–Tukey test, $p = 0.002$), gastrocnemius (ANOVA test–Tukey test, $p < 0.001$) and triceps (ANOVA test–Tukey test, $p < 0.001$) of Sgca^{-/-}-T mice versus Sgca^{-/-}-NT mice (Figure 2A).

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

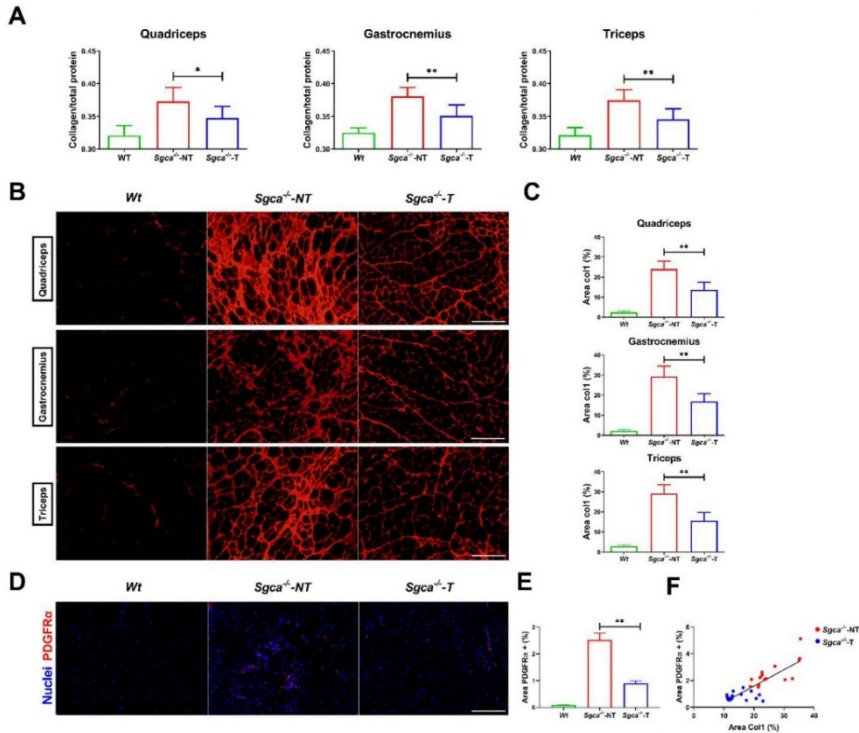


Figure 2. Nintedanib reduces muscle fibrosis in *Sgca*^{-/-} mice. (A) Nintedanib-treated mice showed a significant reduction in the total collagen analysis by Fast Green technique in quadriceps, gastrocnemius and triceps. (B,C) Analysis of the collagen I area by immunofluorescence of muscle sections demonstrated a significant reduction in quadriceps, gastrocnemius and triceps after treatment with nintedanib. Genetic background mouse strain C57BL (*Wt*); n = 6, non-treated *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}NT), n = 14; nintedanib-treated *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}T). (D,E) Analysis of the amount of FAPs cells in *Wt*, *Sgca*^{-/-}NT and *Sgca*^{-/-}T mice by PDGFRα immunofluorescence. A representative image is shown. (F) Correlation analysis between PDGFRα area and Collagen I in all muscles analyzed (quadriceps, gastrocnemius and triceps). Results of (D,E) are from randomized samples of *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}NT), n = 5; and nintedanib-treated *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}T), n = 5. Col1: Collagen I. Data are expressed as means ± SD. * p < 0.05 and ** p < 0.001. Scale bar = 200 μm.

Then, we analyzed the area occupied by Collagen-I using IF in muscle sections (Figure 2B). We observed an increase in the Collagen-I immunolabelled area of 21.3% in the quadriceps, 26.5% in the gastrocnemius and 25.6% in the triceps in *Sgca*^{-/-}NT mice compared to aged-matched *Wt* mice. Nintedanib significantly reduced the Collagen-I area in the quadriceps (-10.2%), gastrocnemius (-12.5%) and triceps (-13.0%) of *Sgca*^{-/-}T mice compared with *Sgca*^{-/-}NT mice (Figure 2C).

We assessed the effect of nintedanib on the PDGFRα area using IF which is a well-known marker of FAPs. As expected, we observed an increase in the percentage of the PDGFRα positive area in the *Sgca*^{-/-}NT mice compared to *Wt* (2.5% vs. 0.1) (Figure 2D,E).

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

Nintedanib significantly reduced the PDGFR α positive area in *Sgca*^{-/-}T compared to *Sgca*^{-/-}NT mice in quadriceps (ANOVA test–Tukey test, $p < 0.001$), gastrocnemius (ANOVA test–Tukey test, $p = 0.001$) and triceps (ANOVA test–Tukey test, $p = 0.02$). Moreover, we observed a significant correlation between the fibrotic Collagen-I and PDGFR α positive area (Pearson correlation, $p < 0.001$, $R^2 = 0.67$) (Figure 2F).

To examine further the role of nintedanib on muscle fibrosis in *Sgca*^{-/-} mice, we performed experiments at the protein and transcriptional level. We confirmed the antifibrotic effect of nintedanib at the transcriptional level by assessing expression levels of a large panel of extracellular matrix and fibrosis-related genes. We observed a generalized reduction in the expression of the genes involved in fibrosis between *Sgca*^{-/-}T and *Sgca*^{-/-}NT mice (Figure 3A). In detail, a significant upregulation (>1.3 fold-change) in 46 out of 84 genes analyzed was found in *Sgca*^{-/-}NT mice compared to Wt mice, which was significantly reduced in 31 genes after treatment with nintedanib. The genes that showed a decreased expression after nintedanib treatments were *Ccl3*, *Mmp13*, *Ccl12*, *Mmp8*, *Timp1*, *IL10*, *Mmp3*, *Ccr2*, *Serpine1*, *Col3a1*, *Tgfb1*, *Tnf*, *Col1a2*, *Cxcr4*, *Mmp2*, *Lox*, *Acta2*, *Thbs1*, *Il13*, *Serpinh1*, *Thbs2*, *Plat*, *Tgfb2*, *Stat6*, *Hgav*, *Timp2*, *Ilk*, *Akt1*, *Hgb1*, *Stat1* and *Nfkb1* (Figure 3B). To better understand the fibrotic molecular pathways modulated by nintedanib, we analyzed our results using Reactome® software and found that matrix metalloproteinases, molecules involved in the non-integrin membrane and an extracellular matrix interactions, molecules involved in extracellular matrix organization and collagen degradation and PDGF signaling-related molecules were the main cellular processes modulated by nintedanib treatment (Figure 3C).

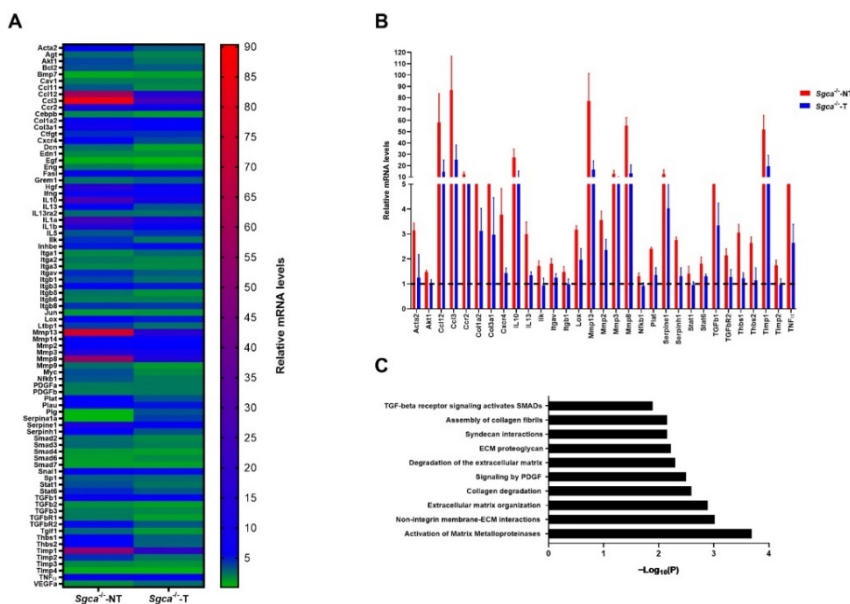


Figure 3. Nintedanib reduces gene expression of fibrosis-related genes in muscle (A) Heatmap of relative mRNA expression of 84 analyzed genes. The color gradient represents the relative $\Delta\Delta Ct$ value. (B) Schematic representation of the overexpressed genes in the *Sgca*^{-/-} mice that are

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

significantly reduced after treatment with nintedanib. (C) Schematic representation of Reactome® pathways that are significantly reduced in nintedanib-treated mice. Genetic background mouse strain C57Bl. (Wt); $n = 3$, no-treated $Sgca^+$ mice ($Sgca^+$ -NT), $n = 4$; nintedanib-treated $Sgca^+$ mice ($Sgca^+$ -T), $n = 4$. Data are expressed as means \pm SD and *Tbp* gene was used as endogenous control.

3.5. Nintedanib Modulates Chronic Muscle Inflammation in the $Sgca^+$ Mice

The presence of inflammatory infiltrates is a hallmark of the muscle degeneration processes in muscular dystrophies. To evaluate the role of nintedanib in this process we first assessed the macrophagic infiltration in muscles by F4/80 antibody staining, a well-known marker of murine macrophages. We observed a reduction in the F4/80 staining between the $Sgca^+$ -T and $Sgca^+$ -NT mice in all muscles, although these differences significantly only reached the triceps (ANOVA test–Tukey test, $p = 0.02$). A mild correlation between the percentage of Collagen-I immunolabeling and F4/80 positivity was observed (Pearson correlation, $p = 0.003$, $R^2 = 0.27$) (Figure 4A). In addition, we assessed the expression of 40 cytokines and chemokines involved in the inflammatory process in muscle samples and observed a generalized reduction in the expression of several cytokines and chemokines (Figure 4B). In detail, in the $Sgca^+$ -NT mice 32 out of 40 cytokines and chemokines analyzed were significantly upregulated (>1.3 -fold change) compared to Wt mice. Nintedanib treatment resulted in a significant reduction in 27 out of these 32 upregulated cytokines including TIMP-1, CXCL9, CCL2, CCL3, M-CSF, IL-5, IL-17, CXCL1, CXCL2, IL-1b, GM-CSF, CXCL11, IL-12, IL-13, IL-4, IFN- γ , CXCL10, IL-6, CXCL13, IL-7, CCL11, IL-3, TREM-1, TNF- α , G-CSF, IL-10 and CCL17 (Figure 4C). The functional and physical relationship of these cytokines based on fusion and neighborhood evidence, and the existing databases after the bioinformatics analysis (STRING®) indicated that most of the downregulated cytokines are involved in chemokine receptors bind chemokines, cytokine signaling in immune system pathway, signaling by interleukins, Immune System, G alpha (i) signaling events, signal transduction and other interleukin signaling pathways (Figure 4D,E). These pathways are involved in the regulation of the biological process of immune response, general inflammatory response, cellular response to cytokine stimulus, cytokine-mediated signaling pathway, immune system process and defense response (Figure 4F).

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

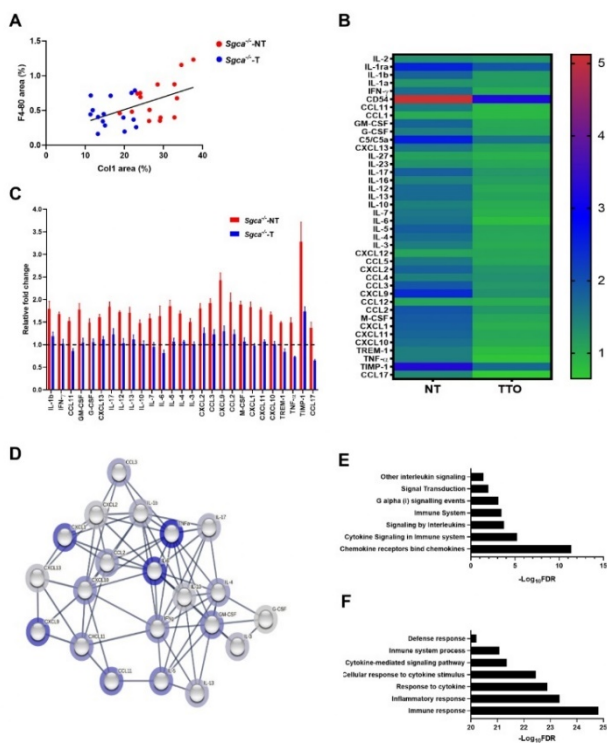


Figure 4. Effect of nintedanib on muscle inflammation in *Sgca*^{-/-} mice. (A) A positive correlation was observed between the quantity of infiltrating macrophages (F4-80 positive area) and collagen I (Col1 positive area) in all muscle analyzed (quadriceps, gastrocnemius and triceps) from randomized samples of *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}-NT), *n* = 5; and nintedanib-treated *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}-T), *n* = 5. (B) Heatmap representation of the expression of 40 inflammatory mediators in the muscle of all groups of animals relative to the Wt mice. (C) Significantly reduced inflammatory molecules after treatment with nintedanib. Red bar corresponds to untreated mice. Blue bar corresponds to nintedanib-treated mice. (D) Functional annotation of inflammatory molecules analyzed. Lines in the network represent the cytokine interactions. Halo color is based on fold change of protein expression in *Sgca*^{-/-} mice relative to *Sgca*^{-/-} nintedanib-treated mice. (E,F) Schematic representation of Reactome® pathways (E) and biological processes related to cytokine modulation (F) that are significantly reduced in nintedanib-treated mice. Genetic background mouse strain C57BL (*Wt*); *n* = 3, nontreated *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}-NT), *n* = 4; nintedanib-treated *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}-T), *n* = 4. Data are expressed as means ± SD.

4. Discussion

We report the positive therapeutic effect of nintedanib in a murine model of alpha-sarcoglycan-deficient muscular dystrophy. Our results demonstrate that nintedanib reduces muscle fibrosis and modifies the existing proinflammatory muscle microenvironment, leading to improved muscle endurance and strength and attenuating the dystrophic phenotype of the mice. These data are especially relevant at present, as gene delivery-

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

based therapies are under development and interventional clinical trials in patients with alpha-sarcoglycanopathies are being planned [53–55]. In this scenario, drugs reverting the profibrotic muscle microenvironment could be prescribed alone or in combination with gene therapies to preserve the muscle structure in patients with muscular dystrophies.

In muscular dystrophies, there are continuous episodes of muscle degeneration and regeneration leading to persistent infiltration of inflammatory cells [17,18]. It has been hypothesized that inflammatory cells release multiple cytokines and growth factors that contribute to the fibrotic process by activating FAPs cells and fibroblasts resident in the skeletal muscle [17,19,34,56]. This mechanism is common to many muscular dystrophies but also to other myopathies, especially when the muscle fiber membrane is fragile, as is the case of sarcoglycanopathies or DMD. If successful, the new gene delivery strategies under development will provide a healthy copy of the missing gene to several muscle fibers, targeting the primary molecular defect. However, the increase in fibrotic and tissue replacement and loss of muscle fibers hinders the efficacy of gene therapies prompting the research in combined treatments with pro-regenerative and/or antifibrotic drugs that could maintain the muscle architecture. Nintedanib modulates FGF, PDGF and VEGF receptors involved in the complex molecular network orchestrating the fibrotic process in muscular dystrophies. It also inhibits fibroblast proliferation and migration *in vitro* and reduces fibrosis in animal models of pulmonary fibrosis or systemic sclerosis [36,37]. We have already shown that nintedanib reduces the proliferation and migration of fibroblasts obtained from DMD patients' muscle samples and demonstrated an antifibrotic effect in 10-month-old mdx mice [24]. However, major functional changes were not found, prompting us to test nintedanib in a more severe murine model that better reflects the human disease pathology. We are now showing that nintedanib reduces fibrosis and modulates inflammation in the *Sgca*^{-/-} mice, improving the muscle strength. These results suggest that nintedanib could be considered as a potential effective antifibrotic therapy for patients with muscular dystrophies and tested in clinical trials.

Sgca^{-/-} mice show a more severe muscle phenotype than mdx mice. Indeed, natural history studies in *Sgca*^{-/-} mice show that the muscle function is already impaired at 8 weeks and a severe muscle impairment is detectable at 14 to 16 weeks [46,47]. These results were confirmed in our study. We observed early impairment of muscle function tests at an age of 11 weeks, which progressed in the non-treated mice until 16 weeks of age. Nintedanib treatment slowed down the progressive muscle impairment and the treated mice displayed a better functional outcome than age-matched not treated animals. However, nintedanib treatment did not abrogate muscle impairment completely to the control level. This improvement was associated with a better-preserved muscle architecture consisting of a lower number of necrotic fibers and a reduced number of regenerative fibers, less fibrosis and inflammation.

In recent years, FAPs cells are considered to be key in muscle fibrosis and adipogenesis, but they could also have a role in orchestrating the whole degenerative process by regulating satellite cell or macrophage's function. In this sense, the number of FAPs increases in muscle samples of patients with muscular dystrophies and correlates with the fibrotic area of the muscles affected [57]. We have observed a reduction in the number of cells expressing PDGFR α , which is a well-accepted canonical marker of FAPs cells [34,58], associated with an 11.9% reduction in the collagen-stained area in *Sgca*^{-/-}-treated mice compared to untreated mice.

In addition to the histologic studies, we assessed the expression levels of 84 genes involved in the fibrotic process. Our results suggest that nintedanib has an impact on several pathways involved in fibrosis, not only the PDGF pathway. For instance, *Col1a2* and *Col3a1*, the two main components of the extracellular matrix, and *TGF β 1* and *TGF β 2*, central components of the TGF- β pathway [21,59], are decreased in treated animals' muscle samples. Several metalloproteinases, but also the tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 (*TIMP1* and *TIMP2*), which participate in the remodeling process of the extracellular matrix and have been shown to be upregulated in muscles and plasma from

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

patients with DMD [60], were also decreased after nintedanib treatment. This data suggests that the inhibition of the PDGFR- α by nintedanib reduced the increase in muscle fibrotic expansion. Indeed, we have recently observed that PDGF-AA increases proliferation, migration and collagen expression by FAPs [23]. Reducing the activation of FAPs could result in a reduced fibrotic reaction and a more conserved muscle architecture with less necrotic fibers and regenerative fibers [57,61]. In addition, in this study, we observed a reduction in the expression of some genes that are also involved in inflammation. For example, a massive reduction in the expression of CCL3 and IL-13 was observed. CCL3 has been considered a macrophage chemoattractant [62] and IL-13 has been associated with the change of macrophage phenotype towards macrophage M2 profibrotic [20]. This could suggest that nintedanib, through its main antifibrotic role, can also modulate chronic inflammation secondary to chronic muscle damage that occurs in muscular dystrophies.

We assessed the expression levels of 40 cytokines and chemokines involved in the inflammatory process observing a reduction in the expression of several of these. For example, we observed a substantial reduction in the expression of CCL2, CCL3, CXCL10 and CXCL11 which are involved in the chemotaxis of immune cells [62]. Moreover, we observed a reduction in IL-4 and IL-13 cytokines associated with the switch of the macrophage phenotype towards an M2 profibrotic status [20]. This reinforces the hypothesis that a reduction in the fibrotic process could lead to related inflammatory activity resulting in more preserved muscle structure. The levels of molecules involved with satellite-cell proliferation and differentiation, such as TNF α or IL-6, were also modulated after treatment with nintedanib, suggesting that the structural changes observed could also modulate the regenerative capacity of the muscles [20]. This potential anti-inflammatory effect of nintedanib has also been described in animal models of lung fibrosis and systemic sclerosis [42,63]. However, our data suggest that nintedanib cannot completely prevent macrophages infiltration in the muscle as we did not observe a significant reduction in the number of cells infiltrating the muscle in treated mice.

The assessment of the *in vivo* effect of drugs requires mouse models that resemble human disease as closely as possible. The murine model of *Sgca*^{-/-} displays a severe phenotype with clear muscle weakness already at 8 weeks that progressed over time [46,47]. At baseline, when the animals were 6 weeks of age, we did not observe significant differences in the muscle function tests between *Wt* and *Sgca*^{-/-} mice. However, at 11 weeks of age, we already observed a decline in muscle function, which was more evident at 16 weeks of age. Nintedanib improved functional muscle capacity assessed both by the treadmill and grip strength tests. However, nintedanib was not able to completely revert the pathogenic phenotype, suggesting that the degenerative process of the muscle is still active. These results raise the question of whether treating patients with an antifibrotic treatment is sufficient to completely change the disease's natural history or whether the treatment just delays the progression of the disease. In our opinion, antifibrotic therapy could probably be considered as combined therapy with the new gene-delivery therapies or even as a treatment prior to gene therapy to condition muscle tissue for gene delivery. Recent results disclosed by companies running gene therapy clinical trials with DMD and sarcoglycan patients show that not all fibers express the transgene after treatment both in preclinical animal models and in patients. These findings suggest that various muscle fibers will continue to deteriorate, activating satellite cells that will proliferate and lead to loss of the transgene. Eventually, by the fusion of these satellite cells with the damaged myofibers, the expression of the transgene in the muscle is diluted. Therefore, it is possible that the fibrotic process will remain active supporting the use of combined therapeutic strategies using gene therapy and antifibrotic drugs. In agreement with this hypothesis, the combination of gene therapy using recombinant adeno-associated virus (rAAV) with antifibrotic or anti-inflammatory drugs, such as myostatin inhibitors, drugs modulating the neuronal nitric oxide synthase, microRNA-29 or VEGF expression, have shown better results than rAAV gene therapy alone [26,64–66]. This combined treatment seems to be

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

more effective if administered early, probably because there is still a relatively preserved muscle environment resulting in better efficacy of the treatment [66].

In conclusion, treatment with nintedanib results in a functional muscle improvement and an attenuated muscle fibrosis and inflammation in *Sgca*^{-/-} mice. These results suggest that nintedanib could be considered as a potential therapy for patients with muscular dystrophies to be tested in clinical trials.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10102629/s1>: Table S1. List of the 40 Cytokines, chemokines and acute phase proteins analyzed.; Table S2. List of the 84 fibrosis-related genes and 12 endogenous gene candidates analyzed.; Figure S1. Schematic representation of the Ct value of *Tbp* gene expression.; Figure S2. Schematic representation of weight gain after 10 weeks of treatment.; Figure S3. Cardiac performance analysis in *Sgca*^{-/-} mice.

Author Contributions: Conceptualization, J.A.-P., M.B.-P., X.S.-C. and J.D.-M.; methodology, J.A.-P., A.C.-R., X.S.-C. and J.D.-M.; validation, J.A.-P. and X.S.-C.; formal analysis, J.A.-P. and X.S.-C.; investigation, J.A.-P., X.S.-C. and J.D.-M.; resources, X.S.-C. and J.D.-M.; writing—original draft preparation, J.A.-P., X.S.-C., M.B.-P. and J.D.-M.; writing—review and editing, J.A.-P., A.C.-R., M.B.-P., E.F.-S., P.P.-J., L.B., L.W., C.L., E.G., M.O., J.D.-M. and X.S.-C.; visualization, J.A.-P., A.C.-R., M.B.-P., E.F.-S., P.P.-J., L.B., L.W., C.L., E.G., M.O., J.D.-M. and X.S.-C.; supervision, J.D.-M. and X.S.-C.; funding acquisition, J.D.-M. and X.S.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This investigation was sponsored by a grant from the Spanish Ministry of Health, Fondos FEDER-ISCIII PI18/01525 to Prof. Jordi Díaz-Manera and Dr. X. Suárez-Calvet, grant from the Academy of Medical Sciences Professorship Scheme APR4/1007 to Prof. Jordi Díaz-Manera and grant from the MRC (MR/W019086/1) to Prof. Jordi Díaz-Manera. J. Alonso-Pérez was supported by the “Rio Hortega” grant (CM19/00178), Acción Estratégica de Salud (EAS), Instituto de Salud Carlos III (Spain) and co-funded by ERDF/ESF, “investing in your future”. X. Suárez-Calvet was supported by Instituto de Salud Carlos III (Sara Borrell fellowship, CD18/00195) and co-funded by European Regional Development Fund (ERDF)/European Social Fund (ESF), “investing in your future”. M. Borrell-Pages was supported by the Instituto de Salud Carlos III, FIS2020-01282. The study was partly funded by Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany. The authors did not receive payment related to the development of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Institut de Recerca Sant Pau Hospital (protocol code FUE-2018-00802669 and 20-02-2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors, upon reasonable request.

Acknowledgments: We thank Sonia Huertas and Sandra Cabanillas for excellent animal handling and care. J. Alonso-Pérez, E. Gallardo, M. Olivé and J. Díaz-Manera are members of the European Reference Network for Neuromuscular Diseases.

Conflicts of Interest: L.W. is an employee of Boehringer Ingelheim, the marketing authorization holder of nintedanib explored in this study. The authors declare no conflict of interest.

Disclosures: All authors report no relevant disclosures. The authors met criteria for authorship as recommended by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Boehringer Ingelheim was given the opportunity to review the manuscript for medical and scientific accuracy as well as intellectual property considerations.

References

1. Straub, V.; Murphy, A.; Udd, B. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification Naarden, The Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscul. Disord.* **2018**, *28*, 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.05.007>.
2. Vainzof, M.; Passos-Bueno, M.R.; Pavanello, R.C.M.; Marie, S.K.; Oliveira, A.S.B.; Zatz, M. Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J. Neurol. Sci.* **1999**, *164*, 44–49. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(99\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(99)00040-4).
3. Winckler, P.B.; da Silva, A.M.S.; Coimbra-Neto, A.R.; Carvalho, E.; Cavalcanti, E.B.U.; Sobreira, C.F.R.; Marrone, C.D.; Machado-Costa, M.C.; Carvalho, A.A.S.; Feio, R.H.F.; et al. Clinicogenetic lessons from 370 patients with autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Clin. Genet.* **2019**, *96*, 341–353. <https://doi.org/10.1111/cge.13597>.
4. Alonso-Pérez, J.; González-Quereda, L.; Bello, L.; Guglieri, M.; Straub, V.; Gallano, P.; Semplicini, C.; Pegoraro, E.; Zangaro, V.; Nascimento, A.; et al. New genotype-phenotype correlations in a large European cohort of patients with sarcoglycanopathy. *Brain* **2020**, *143*, 2696–2708. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa228>.
5. Alonso-Pérez, J.; González-Quereda, L.; Bruno, C.; Panicucci, C.; Alavi, A.; Nafissi, S.; Nilipour, Y.; Zanoteli, E.; Ishii, L.M.D.A.; Melegh, B.; et al. Clinical and genetic spectrum of a large cohort of patients with δ -sarcoglycan muscular dystrophy. *Brain* **2022**, *145*, 596–606. <https://doi.org/10.1093/brain/awab301>.
6. ten Dam, L.; Frankhuizen, W.S.; Linsen, W.H.J.P.; Straathof, C.S.; Niks, E.H.; Faber, K.; Fock, A.; Kuks, J.B.; Brusse, E.; de Co, R.; et al. Autosomal recessive limb-girdle and Miyoshi muscular dystrophies in the Netherlands: The clinical and molecular spectrum of 244 patients. *Clin. Genet.* **2019**, *96*, 126–133. <https://doi.org/10.1111/cge.13544>.
7. Xie, Z.; Hou, Y.; Yu, M.; Liu, Y.; Fan, Y.; Zhang, W.; Wang, Z.; Xiong, H.; Yuan, Y. Clinical and genetic spectrum of sarcoglycanopathies in a large cohort of Chinese patients. *Orphanet J. Rare Dis.* **2019**, *14*, 43. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1021-9>.
8. Ginjaar, H.B.; Van Der Kooij, A.J.; Ceelie, H.; Kneppers, A.L.J.; Van Meegen, M.; Barth, P.G.; Busch, H.F.M.; Wokke, J.H.J.; Anderson, L.V.B.; Bönnemann, C.G.; et al. Sarcoglycanopathies in Dutch patients with autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *J. Neurol.* **2000**, *247*, 524–529. <https://doi.org/10.1007/s004150070151>.
9. Alavi, A.; Esmacili, S.; Nilipour, Y.; Nafissi, S.; Tonekaboni, S.H.; Zamani, G.; Ashrafi, M.R.; Kahrizi, K.; Najmabadi, H.; Jazayeri, F. IGM2E is the most common type of sarcoglycanopathies in the Iranian population. *J. Neurogenet.* **2017**, *31*, 161–169. <https://doi.org/10.1080/01677063.2017.1346093>.
10. Ervasti, J.M.; Ohlendieck, K.; Kahl, S.D.; Gaver, M.G.; Campbell, K.P. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* **1990**, *345*, 315–319. <https://doi.org/10.1038/345315a0>.
11. Chan, Y.M.; Bönnemann, C.G.; Lidov, H.G.W.; Kunkel, L.M. Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 2033–2044. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.7.2033>.
12. Taracki, H.; Berger, J. The sarcoglycan complex in skeletal muscle. *Front. Biosci.-Landmark* **2016**, *21*, 744–756. <https://doi.org/10.2741/4418>.
13. Ozawa, E.; Mizuno, Y.; Hagiwara, Y.; Sasaoka, T.; Yoshida, M. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve* **2005**, *32*, 563–576. <https://doi.org/10.1002/mus.20349>.
14. Lim, L.E.; Campbell, K.P. The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* **1998**, Oct; *11*, (5): 443–452.
15. Wallace, G.Q.; McNally, E.M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu. Rev. Physiol.* **2009**, *71*, 37–57. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163216>.
16. Serrano, A.L.; Muñoz-Cánoves, P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 3050–3058. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.035>.
17. Serrano, A.L.; Muñoz-Cánoves, P. Fibrosis development in early-onset muscular dystrophies: Mechanisms and translational implications. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *64*, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2016.09.013>.
18. Mahdy, M.A.A. Skeletal muscle fibrosis: An overview. *Cell Tissue Res.* **2019**, *375*, 575–588. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2955-2>.
19. Molina, T.; Fabre, P.; Dumont, N.A. Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis, regeneration and diseases. *Open Biol.* **2021**, *11*, 210110. <https://doi.org/10.1098/rsob.210110>.
20. Smith, I.R.; Barton, E.R. Regulation of fibrosis in muscular dystrophy. *Matrix Biol.* **2018**, *68–69*, 602–615. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.014>.
21. Abrigo, J.; Simon, F.; Cabrera, D.; Cordova, G.; Trollet, C.; Cabello-Verrugio, C. Central Role of Transforming Growth Factor Type Beta 1 in Skeletal Muscle Dysfunctions: An Update on Therapeutic Strategies. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2017**, *19*, 1189–1200. <https://doi.org/10.2174/1389203718666171117101916>.
22. Xu, D.; Li, S.; Wang, L.; Jiang, J.; Zhao, L.; Huang, X.; Sun, Z.; Li, C.; Sun, L.; Li, X.; et al. TAK1 inhibition improves myoblast differentiation and alleviates fibrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **2021**, *12*, 192–208. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12650>.
23. Fernández-Simón, E.; Suárez-Calvet, X.; Carrasco-Rozas, A.; Piñol-Jurado, P.; López-Fernández, S.; Pons, G.; Bech Serra, J.J.; de la Torre, C.; de Luna, N.; Gallardo, E.; et al. RhoA/ROCK2 signalling is enhanced by PDGF-AA in fibro-adipogenic progenitor cells: Implications for Duchenne muscular dystrophy. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **2022**, *13*, 1373–1384. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12923>.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

24. Piñol-Jurado, P.; Suárez-Calvet, X.; Fernández-Simón, E.; Gallardo, E.; De La Oliva, N.; Martínez-Muriana, A.; Gómez-Gálvez, P.; Escudero, L.M.; Pérez-Peiró, M.; Wollin, L.; et al. Nintedanib decreases muscle fibrosis and improves muscle function in a murine model of dystrophinopathy. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 776. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0792-6>.
25. Górecki, D.C. P2X7 purinoceptor as a therapeutic target in muscular dystrophies. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2019**, *47*, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.02.003>.
26. Xin, C.; Chu, X.; Wei, W.; Kuang, B.; Wang, Y.; Tang, Y.; Chen, J.; You, H.; Li, C.; Wang, B. Combined gene therapy via VEGF and mini-dystrophin synergistically improves pathologies in temporalis muscle of dystrophin/utrophin double knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* **2021**, *30*, 1349–1359. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab120>.
27. Demonbreun, A.R.; Fallon, K.S.; Oosterbaan, C.C.; Vaught, L.A.; Reiser, N.L.; Bogdanovic, E.; Velez, M.P.; Salamone, I.M.; Page, P.G.T.; Hadzazy, M.; et al. Anti-latent TGFβ binding protein 4 antibody improves muscle function and reduces muscle fibrosis in muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabf0376. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf0376>.
28. Hamoudi, D.; Marcadet, L.; Piette Boulanger, A.; Yagita, H.; Bouredji, Z.; Argaw, A.; Frenette, J. An anti-RANKL treatment reduces muscle inflammation and dysfunction and strengthens bone in dystrophic mice. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, *28*, 3101–3112. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz124>.
29. Tulangekar, A.; Sztal, T.E. Inflammation in duchenne muscular dystrophy—exploring the role of neutrophils in muscle damage and regeneration. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1366. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101366>.
30. Gazzero, E.; Baldassari, S.; Assereto, S.; Fruscione, F.; Pistorio, A.; Panicucci, C.; Volpi, S.; Perruzza, L.; Fiorillo, C.; Minetti, C.; et al. Enhancement of muscle T regulatory cells and improvement of muscular dystrophic process in mdx mice by blockade of extracellular ATP/P2X axis. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 3349–3360. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.08.010>.
31. Szabo, S.M.; Sallhany, R.M.; Deighton, A.; Harwood, M.; Mah, J.; Gooch, K.L. The clinical course of Duchenne muscular dystrophy in the corticosteroid treatment era: A systematic literature review. *Orphanet J. Rare Dis.* **2021**, *16*, 237. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01862-w>.
32. Raffaghello, L.; Principi, E.; Baratto, S.; Panicucci, C.; Pintus, S.; Antonini, F.; Del Zotto, G.; Benzi, A.; Bruzzone, S.; Scudieri, P.; et al. P2X7 Receptor Antagonist Reduces Fibrosis and Inflammation in a Mouse Model of Alpha-Sarcoglycan Muscular Dystrophy. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 89. <https://doi.org/10.3390/ph15010089>.
33. Huang, P.; Zhao, X.S.; Fields, M.; Ransohoff, R.M.; Zhou, L. Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice. *FASEB J.* **2009**, *23*, 2539–2548. <https://doi.org/10.1096/fj.09-129833>.
34. Ieronimakis, N.; Hays, A.; Prasad, A.; Janebodin, K.; Duffield, J.S.; Reyes, M. PDGFRα signaling promotes fibrogenic responses in collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J. Pathol.* **2016**, *240*, 410–424. <https://doi.org/10.1002/path.4801>.
35. Hilberg, F.; Roth, G.J.; Krssak, M.; Kautschitsch, S.; Sommergruber, W.; Tontsch-Grunt, U.; Garin-Chesa, P.; Bader, G.; Zoepfel, A.; Quant, J.; et al. BIBF 1120: Triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 4774–4782. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6307>.
36. Hostettler, K.E.; Zhong, J.; Papakonstantinou, E.; Karakioulakis, G.; Tamm, M.; Seidel, P.; Sun, Q.; Mandal, J.; Lardinois, D.; Iambers, C.; et al. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* **2014**, *15*, 157. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0157-3>.
37. Huang, J.; Beyer, C.; Palumbo-Zerr, K.; Zhang, Y.; Rammig, A.; Distler, A.; Gelse, K.; Distler, O.; Schett, G.; Wollin, L.; et al. Nintedanib inhibits fibroblast activation and ameliorates fibrosis in preclinical models of systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **2016**, *75*, 883–890. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-207109>.
38. Wollin, L.; Wex, E.; Pautsch, A.; Schnapp, G.; Hostettler, K.E.; Stowasser, S.; Kolb, M. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **2015**, *45*, 1434–1445. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174914>.
39. Yoon, H.Y.; Park, S.; Kim, D.S.; Song, J.W. Efficacy and safety of nintedanib in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* **2018**, *19*, 203. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0907-8>.
40. Richeldi, L.; Kolb, M.; Joneau, S.; Wuyts, W.A.; Schinzel, B.; Stowasser, S.; Quaresma, M.; Raghu, G. Efficacy and safety of nintedanib in patients with advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm. Med.* **2020**, *20*, 3. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-1030-4>.
41. Kobuke, K.; Piccolo, F.; Garringer, K.W.; Moore, S.A.; Sweezer, E.; Yang, B.; Campbell, K.P. A common disease-associated missense mutation in alpha-sarcoglycan fails to cause muscular dystrophy in mice. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 1201–1213. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn009>.
42. Huang, J.; Maier, C.; Zhang, Y.; Soare, A.; Dees, C.; Beyer, C.; Harre, U.; Chen, C.W.; Distler, O.; Schett, G.; et al. Nintedanib inhibits macrophage activation and ameliorates vascular and fibrotic manifestations in the Fra2 mouse model of systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, *76*, 1941–1948. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210823>.
43. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed.; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 2011; ISBN 978-0-309-15400-0.
44. Castro, B.; Kuang, S. Evaluation of Muscle Performance in Mice by Treadmill Exhaustion Test and Whole-limb Grip Strength Assay. *Bio-Protocol* **2017**, *7*, e2237. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2237>.
45. Aartsma-Rus, A.; van Putten, M. Assessing functional performance in the Mdx mouse model. *J. Vis. Exp.* **2014**, *85*, e51303. <https://doi.org/10.3791/51303>.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

46. Pasteuning-Vuhman, S.; Putker, K.; Tanganyika-De Winter, C.L.; Boertje-Van Der Meulen, J.W.; Van Vliet, L.; Overzier, M.; Plomp, J.J.; Aartsma-Rus, A.; Van Putten, M. Natural disease history of mouse models for limb girdle muscular dystrophy types 2D and 2F. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e182704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182704>.
47. Verhaar, I.E.C.; Putker, K.; van de Vijver, D.; Tanganyika-De Winter, C.L.; Pasteuning-Vuhman, S.; Plomp, J.J.; Aartsma-Rus, A.M.; Van Putten, M. Cross-sectional study into age-related pathology of mouse models for limb girdle muscular dystrophy types 2D and 2F. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e220665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220665>.
48. Schindelin, J.; Arganda-Carrera, I.; Frise, E.; Verena, K.; Mark, L.; Tobias, P.; Stephan, P.; Curtis, R.; Stephan, S.; Benjamin, S.; et al. Fiji—An Open platform for biological image analysis. *Nat. Methods* **2009**, *9*, 676–682.
49. Houghton, P.E.; Keeper, K.A.; Diegelmann, R.; Krummel, T.M. A simple method to assess the relative amount of collagen deposition in wounded fetal mouse limbs. *Wound Repair Regen.* **1996**, *4*, 489–495. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1996.40414.x>.
50. Ardite, E.; Perdiguero, E.; Vidal, B.; Gutarra, S.; Serrano, A.L.; Muñoz-Cánoves, P. PAI-1-regulated miR-21 defines a novel age-associated fibrogenic pathway in muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **2012**, *196*, 163–175. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105013>.
51. von Mering, C.; Jensen, L.J.; Kuhn, M.; Chaffron, S.; Doerks, T.; Krüger, B.; Snel, B.; Bork, P. STRING 7—Recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 358–362. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl825>.
52. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta-Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
53. Mendell, J.R.; Chicoine, L.G.; Al-Zaidy, S.A.; Sahenk, Z.; Lehman, K.; Lowes, L.; Miller, N.; Alfano, L.; Galliers, B.; Lewis, S.; et al. Gene Delivery for Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2D by Isolated Limb Infusion. *Hum. Gene Ther.* **2019**, *30*, 794–801. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.006>.
54. Mendell, J.R.; Rodino-klapac, L.R.; Rosales-quintero, X.; Kota, J.; Coley, B.D.; Galloway, G.; Josepha, M.; Lewis, S.; Malik, V.; Shilling, C.; et al. LGMD 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann. Neurol.* **2018**, *66*, 290–297. <https://doi.org/10.1002/ana.21732>.
55. Griffin, D.A.; Pozsgai, E.R.; Heller, K.N.; Potter, R.A.; Peterson, E.I.; Rodino-Klapac, L.R. Preclinical Systemic Delivery of Adeno-Associated a-Sarcoglycan Gene Transfer for Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Hum. Gene Ther.* **2021**, *32*, 390–404. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.199>.
56. Joe, A.W.B.; Yi, L.; Natarajan, A.; Le Grand, F.; So, L.; Wang, J.; Rudnicki, M.A.; Rossi, F.M. V Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 153–163. <https://doi.org/10.1038/ncb2015>.
57. Contreras, O.; Rossi, F.M.; Theret, M. Origins, Potency and Heterogeneity of Skeletal Muscle Fibro-Adipogenic Progenitors—Time for new definitions. *Skelet. Muscle* **2021**, *11*, 16.
58. Contreras, O.; Rebolledo, D.L.; Oyarzún, J.E.; Olguín, H.C.; Brandan, E. Connective tissue cells expressing fibro/adipogenic progenitor markers increase under chronic damage: Relevance in fibroblast-myofibroblast differentiation and skeletal muscle fibrosis. *Cell Tissue Res.* **2016**, *364*, 647–660. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2343-0>.
59. Meng, X.M.; Nikolic-Paterson, D.J.; Ian, H.Y. TGF- β : The master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **2016**, *12*, 325–338. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>.
60. Sun, G.; Haginoya, K.; Chiba, Y.; Uematsu, M.; Hino-Fukuyo, N.; Tanaka, S.; Onuma, A.; Iinuma, K.; Tsuchiya, S. Elevated plasma levels of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and their overexpression in muscle in human and mouse muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* **2010**, *297*, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.06.031>.
61. Giuliani, G.; Rosina, M.; Reggio, A. Signaling pathways regulating the fate of fibro/adipogenic progenitors (FAPs) in skeletal muscle regeneration and disease. *FEBS J.* **2021**, *11*, 16. <https://doi.org/10.1111/febs.16080>.
62. Xiao, W.; Liu, Y.; Luo, B.; Zhao, L.; Liu, X.; Zeng, Z.; Chen, P. Time-dependent gene expression analysis after mouse skeletal muscle contusion. *J. Sport Health Sci.* **2016**, *5*, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2016.01.017>.
63. Wollin, L.; Maillet, I.; Quesniaux, V.; Holweg, A.; Ryffel, B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the Tyrosine Kinase inhibitor Nintedanib in Experimental Models of Lung Fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2014**, *349*, 209–220. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208223>.
64. Hoogaars, W.M.H.; Mouisel, E.; Pasternack, A.; Hulmi, J.J.; Relizani, K.; Schuelke, M.; Schirwis, E.; Garcia, L.; Ritvos, O.; Ferry, A.; et al. Combined effect of AAV-U7-induced dystrophin exon skipping and soluble activin type IIB receptor in mdx mice. *Hum. Gene Ther.* **2012**, *23*, 1269–1279. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.056>.
65. Zhang, Y.; Yue, Y.; Li, L.; Hakim, C.H.; Zhang, K.; Thomas, G.D.; Duan, D. Dual AAV therapy ameliorates exercise-induced muscle injury and functional ischemia in murine models of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 3720–3729. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt224>.
66. Heller, K.N.; Mendell, J.T.; Mendell, J.R.; Rodino-Klapac, L.R. MicroRNA-29 overexpression by adeno-associated virus suppresses fibrosis and restores muscle function in combination with micro-dystrophin. *JCI Insight* **2017**, *2*, e93309. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93309>.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

4.3.1. Material suplementario

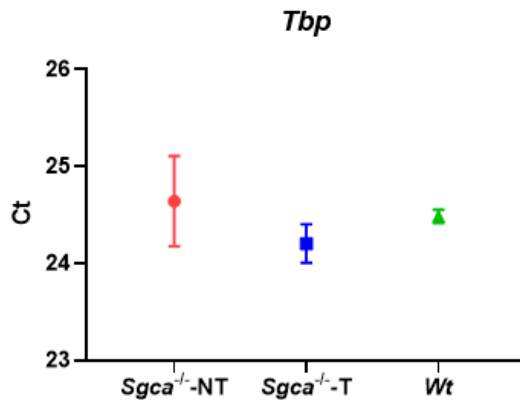


Figure S1. Schematic representation of the Ct value of *Tbp* gene expression. Genetic background mouse strain C57BL (*Wt*); n =3, no-treated *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}-NT), n =4; nintedanib-treated *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}-T), n =4. Data are expressed as means ± SD.

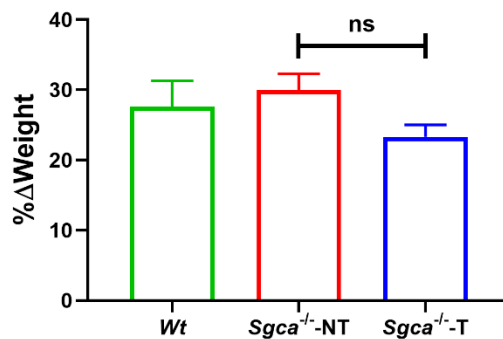


Figure S2. Schematic representation of weight gain after 10 weeks of treatment. Genetic background mouse strain C57BL (*Wt*); n =6, no-treated *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}-NT), n =14; nintedanib-treated *Sgca*^{-/-} mice (*Sgca*^{-/-}-T), n =14. Data are expressed as means ± SD. ns: not significant.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

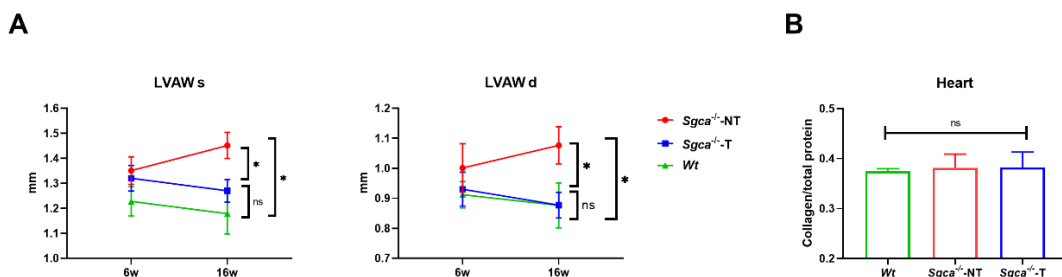


Figure S3. Cardiac performance analysis in *Sgca*^{-/-} mice. A) Graphic representation of the variation of the thickness of the LVAW in systole (left) and in diastole (right) from the beginning (6w) to the end (16w) of the treatment with nintedanib. **B)** Quantification of total collagen by FastGreen-Sirius Red technique, through a schematic representation in heart. s: systole; d: diastole. Data are expressed as means \pm SD. * $p < 0.05$; ns: not significant.

Name			
CXCL131	IL-1ra	IL-16	CXCL9
C5a	IL-2	IL-17	CCL3
G-CSF	IL-3	IL-23	CCL4
GM-CSF	IL-4	IL-27	CXCL2
CCL1	IL-5	CXCL10	CCL5
CCL11	IL-6	CXCL11	CXCL12
ICAM-1	IL-7	CXCL1	CCL17
IFN-gamma	IL-10	M-CSF	TIMP-1
IL-1 alpha	IL-12	CCL2	TNF-alpha
IL-1 beta	IL-13	CCL12	TREM-1

Table S1. List of the 40 Cytokines, chemokines and acute phase proteins analyzed.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

Name	Acession Number	Name	Acession Number	Name	Acession Number
Acta2	Mm00725412_s1	Itga1	Mm01306375_m1	Smad7	Mm00484742_m1
Agt	Mm00599662_m1	Itga2	Mm00434371_m1	Snai1	Mm00441533_g1
Akt1	Mm01331626_m1	Itga3	Mm00442910_m1	Sp1	Mm00489039_m1
Bcl2	Mm00477631_m1	Itgav	Mm00434486_m1	Stat1	Mm00439531_m1
Bmp7	Mm00432102_m1	Itgb1	Mm01253230_m1	Stat6	Mm01160477_m1
Cav1	Mm00483057_m1	Itgb3	Mm00443980_m1	Tgfb1	Mm01178820_m1
Ccl11	Mm00441238_m1	Itgb5	Mm00439825_m1	Tgfb2	Mm00436955_m1
Ccl12	Mm01617100_m1	Itgb6	Mm01269869_m1	Tgfb3	Mm00436960_m1
Ccl3	Mm00441259_g1	Itgb8	Mm00623991_m1	Tgfbr1	Mm00436964_m1
Ccr2	Mm00438270_m1	Jun	Mm00495062_s1	Tgfbr2	Mm00436977_m1
Col3a1	Mm01254476_m1	Lox	Mm00495386_m1	Tgif1	Mm01227699_m1
Cebpb	Mm00843434_s1	Ltbp1	Mm00498255_m1	Thbs1	Mm00449032_g1
Col1a2	Mm00483888_m1	Mmp13	Mm00439491_m1	Thbs2	Mm01279240_m1
Col3a1	Mm01254476_m1	Mmp14	Mm00485054_m1	Timp1	Mm00441818_m1
Ctgf	Mm01192932_g1	Mmp1a	Mm00473485_m1	Timp2	Mm00441825_m1
Cxcr4	Mm01996749_s1	Mmp2	Mm00439498_m1	Timp3	Mm00441826_m1
Dcn	Mm00514535_m1	Mmp3	Mm00440295_m1	Timp4	Mm01184417_m1
Edn1	Mm00438656_m1	Mmp8	Mm00439509_m1	Tnf	Mm00443258_m1
Egf	Mm00438696_m1	Mmp9	Mm00442991_m1	Vegfa	Mm01281449_m1
Eng	Mm00468256_m1	Myc	Mm00487804_m1	18s rRNA	Hs99999901_s1
Fasl	Mm00438864_m1	Nfkb1	Mm00476361_m1	Gapdh	Mm99999915_g1
Grem1	Mm00488615_s1	Pdgfa	Mm01205760_m1	Hprt	Mm00446968_m1
Hgf	Mm01135193_m1	Pdgfb	Mm00440677_m1	Gusb	Mm00446953_m1
Ifng	Mm01168134_m1	Plat	Mm00476931_m1	Actb	Mm00607939_s1
IL10	Mm00439614_m1	Plau	Mm01274460_g1	B2m	Mm00437762_m1
IL13	Mm00434204_m1	Plg	Mm00447087_m1	Hmbs	Mm00660262_g1
IL13ra	Mm00515166_m1	Serpina1a	Mm02748447_g1	Ipo8	Mm01255158_m1
IL1a	Mm00439620_m1	Serpine1	Mm00435860_m1	Pgk1	Mm00435617_m1
IL1b	Mm00434228_m1	Serpinh1	Mm00438058_g1	Rplp2	Mm00782638_s1
IL4	Mm00445259_m1	Smad2	Mm00487530_m1	Tbp	Mm00446973_m1
IL5	Mm00439646_m1	Smad3	Mm01170760_m1	Tfrc	Mm00441941_m1
Ilk	Mm01274281_g1	Smad4	Mm03023996_m1		
Inhbe	Mm00434340_g1	Smad6	Mm00484738_m1		

Supplemental Table 2. List of the 84 fibrosis-related genes and 12 endogenous gene candidates analyzed. Endogenous control genes are in b

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

En el trabajo realizado en esta tesis se han explorado factores pronósticos y de evolución de enfermedad, así como las características fenotípicas y genéticas de los diferentes tipos de sarcoglicanopatías. Además, se ha analizado el potencial anti-fibrótico del inhibidor tirosina cinasa nintedanib en un modelo murino de alfa-sarcoglicanopatía.

La distrofia muscular por déficit de sarcoglicano, o sarcoglicanopatías, son una de las causas más frecuentes de LGMD de herencia autosómica recesiva (5,14). Clásicamente este tipo de distrofias musculares se han asociado a un fenotipo grave con un inicio precoz, durante la primera infancia, con una debilidad muscular progresiva que genera una discapacidad grave con una pérdida de deambulación precoz. Sin embargo, más recientemente se han descrito varios casos de pacientes con diferentes tipos de sarcoglicanopatías que presentan un inicio fenotipo más leve y un inicio de la enfermedad más tardío. No se conoce con exactitud los factores que pudieran estar implicados en esta variabilidad fenotípica, del mismo modo, aunque fenotípicamente los distintos de sarcoglicanopatías pueden ser similares, no se conoce si existen diferencias entre los diferentes tipos.

El objetivo del primer estudio recogido en el artículo 1 fue describir las características clínicas y genéticas de los diferentes tipos de sarcoglicanopatías, así como investigar posibles correlaciones entre el genotipo y fenotipo, e identificar posibles factores pronósticos que influyen en la progresión de la enfermedad. Para ello se contactó con un total de 33 centros europeos referentes en enfermedades neuromusculares procedentes de 13 países diferentes. Se recopilaron datos demográficos, clínicos, genéticos y de biopsia muscular de los pacientes con sarcoglicanopatías en seguimiento en dichos centros. Tras el filtrado de datos, se obtuvieron datos de un total de 396 pacientes con sarcoglicanopatías, de los cuales 159 pacientes padecían una α -SG, 73 pacientes una β -SG, 157 pacientes una γ -SG y sólo 7 pacientes estaban afectados por una δ -SG. Debido al bajo número de paciente con δ -SG, no se pudieron realizar más análisis sobre estos pacientes en este primer trabajo de esta tesis.

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

Desde el punto de vista de la edad de inicio de los síntomas se observaron diferencias entre los distintos tipos de sarcoglicanopatías. De este modo, se observó que el debut de la enfermedad era similar en los pacientes con β -SG (media: 5,8; rango: 1–22 años) y γ -SG (5,8; 1-20 años), mientras que los pacientes con α -SG la enfermedad comenzaba de forma más tardía (10,2; 1–45 años). El síntoma de inicio más frecuente fue la debilidad muscular proximal de las extremidades inferiores en la mitad de los pacientes, aunque hay que considerar que aproximadamente el 25% de los pacientes comenzaron la enfermedad con mialgias o hiperckemia asintomática.

Analizando el conjunto de cada grupo de pacientes, no se observaron diferencias en la edad de pérdida de deambulaci3n entre los diferentes tipos de sarcoglicanopatías, aunque sí se observó una tendencia no significativa en una pérdida de deambulaci3n más temprana en los pacientes con β -SG y γ -SG, respecto a los pacientes con α -SG. Observamos una correlaci3n positiva ($r = 0,61$, $p < 0.001$) entre la edad de inicio de la enfermedad y la edad de pérdida de deambulaci3n. Por este motivo, decidimos clasificar a los pacientes según la edad de inicio de la enfermedad, diferenciando los pacientes que comenzaban los síntomas antes o después de los 10 años. De este modo, se observó que existían diferencias significativas en la progresi3n de la enfermedad, tanto cuando se analizaban todos los tipos de sarcoglicanopatías de forma conjunta, como cuando se analizada cada subtipo de forma independiente. Así, los pacientes cuya enfermedad comenzaba antes de los 10 años de edad presentaban un peor pron3stico con una pérdida de deambulaci3n precoz, en la mayoría de los casos antes de los 18 años de edad. Además, observamos que en 20 pacientes la enfermedad comenzó más allá de los 18 años y ninguno perdi3 la deambulaci3n durante el seguimiento.

Otro aspecto analizado en este estudio fue la afectaci3n cardíaca y la necesidad de soporte ventilatorio en los pacientes. La afectaci3n cardíaca estaba presente en el 19% del total de los pacientes, siendo mucho más frecuente en los pacientes con β -SG (41,1%), respecto a los pacientes con α -SG o γ -SG. Estos datos confirman que la

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

afectación cardíaca es relativamente frecuente en los pacientes con β -SG, como se había documentado previamente en algunos estudios donde se estimaba una incidencia de hasta el 63% de los casos (213). Respecto a la afectación respiratoria, el 25% del total de los pacientes requerían soporte ventilatorio sin observarse diferencias entre los diferentes tipos de sarcoglicanopatías. Tanto la afectación cardíaca como respiratoria no se asociaron a la edad de inicio, edad de pérdida de deambulaci3n o expresi3n residual de prote3na, sin embargo, si se asociaron a una mayor duraci3n de la enfermedad, por lo que un control peri3dico de la funci3n card3aca y respiratoria resulta fundamental en el seguimiento de estos pacientes.

Desde el punto de vista gen3tico se identificaron un total de 131 variantes patog3nicas en todos los pacientes, destacando que la mayor3a de las mutaciones se concentraban en 2 o 3 exones. Por ejemplo, en los pacientes con α -SG m3s del 60% de los pacientes ten3an mutaciones en los exones 3, 6 o 7; en los pacientes con β -SG m3s del 75% de los pacientes ten3an una mutaci3n en los exones 3 o 4; y en los pacientes con γ -SG los exones 6 y 8 aglutinaban m3s del 70% de las mutaciones. Tambi3n en cada tipo de sarcoglicanopat3a destacan en frecuencia una o dos mutaciones sobre el resto, as3 en los α -SG la mutaci3n p.(Arg77Cys) estaba presente en el 47,2% de los pacientes, en los β -SG la mutaci3n p.(Ser114Phe) se encontraba en el 41,1% de los pacientes, mientras que en los pacientes con γ -SG el 69,4% de los pacientes eran portadores de la mutaci3n p.(Phe175Leufs*20) o de la mutaci3n p.(Arg284Cys). Estos resultados son de vital importancia a la hora de poder interpretar y de optimizar el estudio gen3tico de los pacientes con sarcoglicanopat3as.

Para estudiar la posible correlaci3n genotipo-fenotipo en los pacientes con sarcoglicanopat3as, en este trabajo estudiamos el impacto de la mutaci3n en la expresi3n de prote3na evaluada en las biopsias musculares de los pacientes participantes. De esta manera, se comprob3 que una expresi3n de prote3na de 27,5% era el punto de corte 3ptimo, con una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 100%, para predecir la

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

pérdida de deambulación antes de los 18 años. Por este motivo, se clasificaron a los pacientes entre los que tenían una ausencia de expresión de proteína residual, una expresión <30% o una expresión >30%. Se observó que existen diferencias significativas en la edad de inicio, la edad de pérdida de evolución y la rapidez hasta alcanzar la silla de ruedas entre los pacientes con ausencia o una expresión de proteína <30% en relación con los pacientes con una expresión de proteína >30%. Al analizar la influencia de la expresión de proteína en cada tipo de sarcoglicanopatía, observamos que la expresión de proteína está fuertemente asociada a la pérdida de deambulación en los pacientes con α -SG, donde una expresión <30% es suficiente para cambiar la evolución de la enfermedad. Sin embargo, en pacientes con β -SG se observó una tendencia no significativa en la edad de pérdida de deambulación en relación con el nivel de expresión de proteína, aunque los pacientes con una expresión >30% mantenían la deambulación por un periodo más prologando que los pacientes con ausencia o con una expresión <30% donde la progresión de la enfermedad es similar. Algo similar ocurría en los pacientes con γ -SG donde la progresión de la enfermedad y la edad de pérdida de deambulación era similar en los pacientes en los que no hay expresión de proteína residual o ésta es <30%, sin embargo si se observó una diferencia significativa en los pacientes con una expresión de proteína residual >30% quienes presentaban un mejor pronóstico de enfermedad con una pérdida de deambulación más tardía.

Como resumen en este estudio, que corresponde con el artículo 1, se describieron las características clínicas, genéticas y de progresión de la enfermedad de la mayor serie de sarcoglicanopatías publicada hasta el momento. Además, se observó que existen algunas diferencias fenotípicas entre los distintos tipos de sarcoglicanopatías y se identificó que la edad de inicio menor de <10 años y una expresión de proteína residual menor del 30% son factores pronósticos independientes que se asocian a un una mayor gravedad y un peor pronóstico de la enfermedad con una pérdida de deambulación precoz antes de los 18 años.

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

En el anterior estudio no se pudo evaluar las características clínicas y genéticas de los pacientes con δ -SG debido al bajo número de pacientes que estaban presentes en la cohorte del estudio del artículo 1. Como se ha comentado previamente, la δ -SG es el tipo de sarcoglicanopatía menos frecuente siendo casi inexistente en muchas regiones. La información disponible sobre las características clínicas y de progresión de la enfermedad de los pacientes con δ -SG es limitada y se basa en reportes de casos de pacientes individuales o en pequeñas cohortes. En nuestro estudio realizado a nivel europeo, recogido en el artículo 1, con una cohorte inicial de más de 400 pacientes, únicamente se identificaron un total de 7 pacientes. Por este motivo decidimos realizar un nuevo estudio ampliando la población diana en busca de conseguir una serie mayor de pacientes con δ -SG. Los resultados de este segundo objetivo están recogidos en el artículo 2.

El objetivo de este segundo estudio realizado, recogido en el artículo 2, fue describir las características clínicas y genéticas, así como identificar posibles factores pronósticos que puedan influir en la progresión de la enfermedad en los pacientes con δ -SG. Para poder conseguir la información del máximo número posible de pacientes, se contactó con un total 128 centros especializados en enfermedades neuromusculares tanto pediátricos como de adultos, procedentes de un total de 38 países alrededor del mundo. Además, se contactó con los centros en los que habían realizado estudios de grandes cohortes de pacientes con enfermedades neuromusculares sin diagnóstico genético en los que se había realizado estudios de NGS. En total se revisaron datos de aproximadamente 10000 pacientes y se obtuvieron de un total de 30 pacientes con mutaciones en *SGCD*, el gen responsable de la δ -SG, aunque finalmente sólo se pudieron incluir 23 pacientes en nuestro estudio. Esto pone de manifiesto que la δ -SG es una enfermedad extremadamente rara, pudiéndose considerar una enfermedad ultra-rara, que, aunque no existe una definición exacta, se considera a una enfermedad con una prevalencia menor de 20 casos por millón de habitantes (214) o incluso mucho menor como parece

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

ser el caso de las δ -SG donde según nuestro estudio la prevalencia es menor a un caso cada millón de habitantes.

En el análisis de la información recogida de los 23 pacientes, llamada la atención el alto grado de consanguinidad (87%) que existía en las familias. Esto pone de manifiesto que la incidencia de la δ -SG estaría restringida a pequeñas poblaciones con alto grado de consanguinidad. Como se ha comentado previamente en la introducción de esta tesis, en la actualidad el abordaje diagnóstico de los pacientes con LGMD se suele realizar mediante estudios de NGS en el que se analizan varios genes de forma simultánea incluidos los 4 genes del SG. Esto puede ser especialmente útil en enfermedades con muy baja prevalencia como es el caso de las δ -SG. Este efecto del uso de las nuevas técnicas genética en el proceso diagnóstico de los pacientes, lo pudimos comprobar en nuestro estudio, dado que en los pacientes que comenzaron sus síntomas posteriormente al año 2010, cuando se comenzaron a utilizar estas técnicas, el retraso diagnóstico disminuyó de forma considerable desde los 10 años de la época de estudios genéticos convencionales, hasta los 2 años en la era de NGS.

Los resultados de nuestro estudio mostraron que la δ -SG es una enfermedad muy grave con una edad media de inicio de los síntomas de 5 años, la cual, aunque se aproxima a las β -SG y δ -SG, es inferior al resto de sarcoglicanopatías según pudimos constatar en el estudio previo representado en el artículo 1. También la edad media de pérdida de deambulación fue de 12 años, más precoz que el resto de las sarcoglicanopatías, siendo necesario el uso de puntos de apoyo para deambular desde los 10 años. Además, la progresión de la enfermedad también fue rápida dado que el tiempo medio desde el inicio de los síntomas hasta la pérdida de la deambulación fue de sólo 7 años. Otro dato que pone de manifiesto la severidad de la enfermedad es la presencia de debilidad distal en casi el 60% de los pacientes, incluso en estadios iniciales de la enfermedad, lo cual es muy poco frecuente en el resto de sarcoglicanopatías y generalmente sólo aparece en estadios finales o avanzados de la enfermedad. También se evaluó la afectación cardíaca,

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

la cual estaba presente en el 23,8% de los pacientes, así como la función respiratoria, donde el 19% de los pacientes requerían de soporte ventilatorio.

Desde el punto de vista genético destacó el hecho de que todos los pacientes eran homocigotos para una mutación en el gen *SGCD*, lo cual está en relación con el hecho de la mayoría de los pacientes tuvieran historia de consanguinidad en la familia. Al contrario de lo que ocurría con el resto de sarcoglicanopatías, las mutaciones se distribuyeron por todo el gen sin existir algún exón predominante sobre el resto. Sí que destacaba el porcentaje elevado de mutaciones tipo deleciones, algunas de las cuales eran grandes deleciones. Es importante tener en consideración que estas grandes deleciones no se pueden identificar correctamente en los estudios genéticos de NGS siendo necesario el uso de otras técnicas genética como el MLPA.

Al igual que ocurría con el resto de sarcoglicanopatías, decidimos evaluar si la expresión de proteína residual influía en la progresión en la severidad de la enfermedad. Nuestro estudio mostró que los pacientes sin expresión de proteína residual de ningún componente del complejo de sarcoglicano tenían un inicio de la enfermedad más precoz (4,1 versus 10,3 años), así como una pérdida de deambulación más temprana (10,9 versus 17,3) que los pacientes con algún grado de expresión residual de proteína, los cuales mantienen la deambulación por un período mayor. Por lo tanto, aunque observamos en este estudio que la δ -SG es una enfermedad más grave que el resto de los sarcoglicanopatías, de hecho, el 91,3% de los pacientes pierden la deambulación antes de los 18 años, existen pacientes con un fenotipo algo más leve con una pérdida de deambulación más tardía, y que, al igual que ocurre con el resto de las sarcoglicanopatías, generalmente se asocian a tener los niveles de expresión residual de las proteínas del complejo de sarcoglicano.

Los dos primeros estudios realizados, y resumidos en los artículos 1 y 2, nos aportaron información muy útil sobre las características clínicas, genéticas y de progresión de la enfermedad en los diferentes tipos de sarcoglicanopatías, estableciendo además varios

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

factores pronósticos independientes, como la edad de inicio o el porcentaje de expresión de proteína residual, que influyen de manera significativa en la evolución de la enfermedad en estos pacientes. Sin embargo, estos factores no son capaces de predecir la progresión y degeneración muscular de la totalidad de los pacientes, dado que identificamos pacientes con expresión residual de proteína que tenían un inicio de la enfermedad temprano y una pérdida de deambulación precoz, y al contrario, pacientes sin expresión residual de proteína que tenían un inicio tardío de la enfermedad y mantenían la deambulación durante un mayor tiempo. Esto nos hizo pensar que deben existir otros factores involucrados en el proceso de degeneración y fibrosis muscular progresiva que ocurre en los pacientes con sarcoglicanopatías. Por este motivo, decidimos realizar un tercer estudio en el que nos propusimos evaluar si bloquear el proceso de fibrosis muscular progresiva, mediante el fármaco nintedanib, pudiera ser eficaz en favorecer una menor progresión de la enfermedad. Los resultados de este tercer estudio están recogidos en el artículo 3.

El objetivo de este tercer estudio fue evaluar la eficacia de nintedanib en reducir la fibrosis muscular y mejorar la función muscular en el ratón *Sgca*^{-/-}, un modelo murino de α -SG. Para lograr este objetivo se trataron 14 ratones *Sgca*^{-/-} (*Sgca*^{-/-}-T) de 6 semanas de edad con nintedanib 50 mg/kg/día durante 10 semanas a través de *gavage*, y se compararon con 14 animales *Sgca*^{-/-} no tratados (*Sgca*^{-/-}-NT) y 6 ratones *Wt* de la cepa C57BL6. En los 3 grupos de ratones, antes de iniciar el tratamiento, tras 5 semanas de tratamiento y tras las 10 semanas de tratamiento con nintedanib, se les realizaron pruebas físicas evaluando la resistencia muscular, a través de la medición de la capacidad de carrera máxima usando un *treadmill*; así como la fuerza muscular valorando la fuerza de agarre de las extremidades anteriores. El tratamiento con nintedanib mostró diferencias entre el grupo *Sgca*^{-/-}-T y *Sgca*^{-/-}-NT desde la semana 5 de tratamiento tanto en el *treadmill* como en la prueba de fuerza de agarre, diferencias que se mantuvieron hasta el final de tratamiento a las 10 semanas. De forma llamativa, la fuerza de agarre llegó a normalizarse en los ratones *SGCA*^{-/-}-T, equiparándose a los valores obtenidos por

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

los ratones *Wt*. También se realizó un estudio de la función cardíaca mediante ecocardiografía, como parte de las pruebas realizadas a los 3 grupos de ratones durante el tratamiento. De los resultados del estudio con ecocardiografía, cabe destacar que observamos un detrimento de la función de la función sistólica de los ratones *Sgca*^{-/-}-NT en relación con *Wt*, que es un hecho que no se había documentado previamente en este modelo murino, lo que podría ser debido a que no se había realizado un estudio de ecocardiografía previamente en este modelo murino (43,210). Esta alteración de la función sistólica fue revertida tras las 10 semanas de tratamiento con nintedanib en los *Sgca*^{-/-}-T hasta valores similares a los ratones *Wt*. Otra alteración ecocardiográfica que se objetivó en nuestro estudio fue el engrosamiento de la pared anterior del ventrículo izquierdo (VI) en los ratones *Sgca*^{-/-}-NT en relación con los ratones *Wt*, engrosamiento que era menor en los ratones tratados. Sin embargo, a pesar de estas alteraciones encontradas a nivel funcional a nivel histológico y de fibrosis muscular no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos.

Una vez finalizadas las 10 semanas de tratamiento con nintedanib, se eutanasiaron todos los animales y se extrajeron los músculos cuádriceps, gemelo y tríceps para su análisis y la realización de los estudios que se expondrán a continuación. En primer lugar, el análisis histológico mediante la tinción de hematoxilina-eosina (H-E) mostró en los ratones *Sgca*^{-/-}-T una reducción del porcentaje de tejido afectado, es decir con áreas de necrosis, fibrosis e inflamación, en los 3 músculos analizados respecto a los ratones *Sgca*^{-/-}-NT, aunque las diferencias sólo fueron significativas en el cuádriceps y el tríceps. Del mismo modo, se observaron diferencias significativas entre los ratones tratados y no tratados en el tamaño de las fibras musculares, de forma que el tamaño las fibras musculares en los ratones tratados tendía a ser más homogéneo como ocurre en los ratones *Wt*. Para investigar el efecto de nintedanib en la regeneración muscular, se realizó un estudio de inmunofluorescencia (IF) usando el anticuerpo contra la cadena pesada de miosina embrionaria (eMyHC), que es un marcador temprano de regeneración de la fibra muscular. Se observó que el número de fibras positivas para eMyHC aumentaba

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

consideradamente en los ratones *Sgca*^{-/-}-NT lo cual disminuía de forma significativa en los ratones *Sgca*^{-/-}-T en todos los músculos evaluados.

Para analizar el efecto de nintedanib en la fibrosis muscular del ratón *Sgca*^{-/-} se realizaron los siguientes experimentos. En primer lugar, cuantificamos el contenido total de colágeno, uno de los principales componentes de la fibrosis muscular, usando la técnica *Fast Green-Sirius Red*. Observamos que en los ratones *Sgca*^{-/-}-T se producía una reducción significativa del porcentaje de colágeno respecto a los ratones *Sgca*^{-/-}-NT en todos los músculos analizados. Además, mediante técnica de IF también se observó una reducción entre el 10-13% del porcentaje de Colágeno-I en los diferentes músculos analizados en los ratones *Sgca*^{-/-}-T respecto a los ratones no tratados. Como se ha comentado previamente en la introducción de esta tesis, las células FAPs son uno de los principales responsables del proceso de fibrosis muscular en las distrofias musculares como es el caso de las sarcoglicanopatías. Las células FAPs expresan en su membrana el marcador PDGFR α , el cual fue analizado en nuestro estudio mediante IF. En los ratones *Sgca*^{-/-}-NT el porcentaje de área positiva para PDGFR α estaba considerablemente aumentada respecto al ratón *Wt*, y este aumento se disminuía tras el tratamiento con nintedanib. Por lo tanto, el efecto antifibrótico de nintedanib podría estar condicionado por la modulación de las células FAPs, de hecho, observamos una correlación positiva entre la cantidad de colágeno-I y el área positiva para PDGFR α , de modo que los ratones tratados eran los que tenían un menor porcentaje de colágeno-I y de área de PDGFR α . Estos estudios pusieron de manifiesto la capacidad de nintedanib en reducir la fibrosis muscular en el modelo *Sgca*^{-/-}; sin embargo, para profundizar en este concepto, se confirmaron estos hallazgos con un estudio a nivel transcripcional mediante el análisis de expresión génica en un panel de 84 genes de la matriz extracelular y genes relacionados con la fibrosis. Se observó que en el ratón *Sgca*^{-/-}-NT existía una sobreexpresión de 46 de los 84 genes analizados, de los cuales en 31 genes se reducía de forma significativa la expresión génica tras el tratamiento con nintedanib, incluso hasta niveles basales en algunos casos. Estos 31 genes estaban fundamentalmente

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

relacionados con la activación de las metaloproteasas de matriz y con moléculas involucradas en la organización de la matriz extracelular y la degradación del colágeno, así como con la señalización de PDGF.

Una vez demostrado el papel de nintedanib mejorando la función motora y reduciendo la fibrosis muscular, nos planteamos si también pudiera tener un papel en modular el proceso de inflamación crónica presente en las distrofias musculares como se ha comentado en la introducción de esta tesis. De este modo, en primer lugar realizamos un estudio de IF usando anticuerpos contra el marcador F4/80, que es un marcador conocido de macrófagos murinos. Se observó una reducción de la positividad del F4/80 en los ratones *Sgca*^{-/-}-T respecto a los ratones *Sgca*^{-/-}-NT, aunque esta reducción sólo fue significativa en el triceps. También observamos una correlación leve entre el porcentaje de colágeno-I y de F4/80, siendo los ratones no tratados los que presentaban una mayor positividad para ambos marcadores. En el proceso de fibrosis y el estado de inflamación muscular crónica presente en las distrofias musculares, están involucradas múltiples citoquinas y factores de crecimiento. Por este motivo, decidimos evaluar la expresión de 40 citocinas y quimionas implicadas en este proceso de inflamación muscular. En el ratón *Sgca*^{-/-}-NT se observó una sobreexpresión de 32 de las 40 citocinas analizadas, observándose una reducción significativa de la expresión en 27 de ellas. Estas citoquinas estaban principalmente involucradas procesos de señalización e interacción con otras citoquinas e interleucinas, y por lo tanto de mediar la cascada de señalización que finaliza en la fibrosis muscular en las sarcoglicanopatías.

Por lo tanto, en este tercer proyecto recogido en el artículo 3, hemos demostrado que nintedanib mejora la funcionalidad y fuerza muscular, y además reduce la fibrosis muscular y modifica el microambiente muscular inflamatorio preexistente en un modelo murino de α -SG. Esto podría implicar que modular el complejo sistema de degeneración y fibrosis muscular que ocurre en las sarcoglicanopatías a través del tratamiento con nintedanib, podría tener un efecto positivo en las sarcoglicanopatías influyendo en la

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

evolución y progresión de la enfermedad, tal y como ocurría con la edad de inicio o el porcentaje de expresión de proteína residual, según pudimos comprobar tras los resultados del primer y segundo estudio de esta tesis. Además, los resultados obtenidos en este tercer proyecto, posiciona a nintedanib como una posible opción de tratamiento a explorar su eficacia en pacientes con sarcoglicanopatías u otras distrofias musculares que compartan el mismo mecanismo fisiopatológico.

6. RESUMEN GLOBAL DE DISCUSION

6. RESUMEN GLOBAL DE DISCUSIÓN

En esta tesis hemos realizado un total de 3 proyectos en los que se han analizado varios aspectos de las sarcoglicanopatías. En el primer y segundo proyecto, hemos analizado los datos clínicos, genéticos y de progresión de enfermedad de pacientes afectados de cada uno de los 4 tipos de sarcoglicanopatías gracias al análisis de las cohortes de pacientes más grandes descritas hasta el momento. Esto nos ha permitido identificar las características propias de cada tipo de sarcoglicanopatía, así como establecer relaciones genotipo-fenotipo e identificar factores pronósticos involucrados en la gravedad y en la progresión de la enfermedad. En el tercer proyecto, hemos demostrado que el fármaco nintedanib es capaz de interferir en el proceso de degeneración y fibrosis muscular, mejorando la funcionalidad y el fenotipo distrófico de un modelo murino de α -SG.

En la primera parte de nuestro trabajo, recogido en el artículo 1, se analizaron los datos clínicos, genéticos y de expresión de proteínas de la mayor cohorte de pacientes con sarcoglicanopatías descrita hasta ahora. El análisis de esta cohorte internacional ayudó a revelar información que puede ser crucial para establecer un pronóstico adecuado en los pacientes con sarcoglicanopatías. Como se ha comentado, las sarcoglicanopatías clásicamente se consideraban una enfermedad grave con progresión rápida de la debilidad muscular dando lugar a una discapacidad grave con una pérdida de deambulación precoz. Sin embargo, se han descrito varios casos en los que el inicio de la enfermedad es más tardío y el fenotipo es más leve, lo que implica que la progresión de la enfermedad no es homogénea dado que hay pacientes que nunca han perdido la deambulación o con un inicio de la enfermedad en la tercera o cuarta década de la vida. En la actualidad, no se conoce con exactitud el motivo de esta heterogeneidad fenotípica de los pacientes con sarcoglicanopatías. En este estudio se evidenciaron una serie de factores que podrían influir en la progresión de la enfermedad, como puede ser el tipo de sarcoglicanopatía, la edad de inicio o la expresión residual de proteína. Por ejemplo, hemos demostrado que los pacientes con β -SG y, sobre todo, con γ -SG tienen un fenotipo más severo que los pacientes con α -SG, dado en el caso de los β -SG y γ -SG el 87% y 87,2% de los pacientes, respectivamente, comienzan la enfermedad antes de los

6. RESUMEN GLOBAL DE DISCUSIÓN

10 años y el 78,4% y 84,4%, respectivamente, pierden la deambulaci3n antes de los 18 a3os. Por el contrario, en los pacientes con α -SG s3lo el 32% comienzan la enfermedad antes de los 10 a3os de edad y s3lo el 56,3% de ellos pierden la deambulaci3n antes de los 18 a3os. Otro factor que observamos en nuestro estudio y que est3 relacionado con la evoluci3n y progresi3n de la enfermedad como un factor de riesgo independiente, fue la expresi3n de prote3na residual de sarcoglicano en el m3sculo esquel3tico. Estudios previos suger3an que la ausencia de expresi3n de prote3na se podr3a asociar a un fenotipo m3s grave (34,215), sin embargo se desconoc3a el efecto de la expresi3n residual de prote3na. En nuestro estudio hemos demostrado que la progresi3n de la enfermedad en los pacientes con α -SG est3 altamente influenciada por el porcentaje de expresi3n de prote3na residual, dado que una expresi3n de prote3na residual <30% es suficiente para cambiar radicalmente el pron3stico y alargar sustancialmente el tiempo de deambulaci3n. Sin embargo, en los pacientes con β -SG y γ -SG observamos que para cambiar la progresi3n de la enfermedad es necesario unos niveles de expresi3n de prote3na de al menos del 30%. Estos datos son especialmente importantes en la actualidad, ya que est3n en marcha y se est3n dise3ando varios ensayos cl3nicos de terapia g3nica en los distintos tipos de sarcoglicanopat3as, y en el dise3o y elaboraci3n de los mismos deber3an de tener en consideraci3n, a parte de otros factores, tanto la edad de inicio de la enfermedad como los niveles de expresi3n de prote3na tanto basales como los obtenidos con el tratamiento.

El hecho de que los pacientes con expresi3n residual de prote3na tengan un fenotipo de enfermedad m3s leve y con un mejor pron3stico, podr3a ser debido a que, c3mo se ha comentado previamente en la introducci3n, la expresi3n de prote3na residual sea a expensas de una prote3na disfuncionante que evade el sistema de control de calidad del ER siendo capaz de formar el complejo de SG. Esta prote3na, aunque sea disfuncionante, ser3a capaz de anclar otras prote3nas del DGC y dar cierto soporte estructural al sarcolema. Sin embargo, hay recordar que las sarcoglicanopat3as es una patolog3a heterog3nea y eso mismo lo hemos comprobamos en nuestro estudio, dado que hemos

6. RESUMEN GLOBAL DE DISCUSIÓN

visto que hay algunos pacientes con niveles de expresión de proteína >30% o con una edad de inicio >10 años con una pérdida de deambulación precoz, por lo que también hay que considerar otros factores que pudieran estar involucrados en la progresión de la enfermedad como factores epigenéticos o genes modificadores que podrían condicionar una mayor degeneración del tejido muscular y sustitución por tejido fibroadipogénico.

Los resultados obtenidos en el primer proyecto, recogido en el artículo 1, sólo se pudieron analizar los datos recogidos de los pacientes con α -SG, β -SG y γ -SG. Sin embargo, sólo el 1,5% de todos los pacientes de la cohorte europea en la que se basa este estudio, estaban afectados de una δ -SG. Debido al bajo número de pacientes con δ -SG, no pudimos sacar conclusiones adecuadas en este primer proyecto. Esto nos impulsó a elaborar un segundo proyecto de investigación que se engloba dentro del artículo 2.

En la segunda parte de nuestro trabajo, recogido en el artículo 2, se analizaron los datos clínicos, genéticos y de historia natural de la mayor serie descrita hasta el momento de pacientes con δ -SG. Para realizar este trabajo, dada la baja frecuencia de esta patología, fue crucial la colaboración internacional entre médicos de un total de 30 países distribuidos en diferentes continentes alrededor del mundo. La δ -SG es considerada una enfermedad ultra-rara y por lo tanto el conocimiento que se tiene sobre ella es escaso. Fruto de esta colaboración internacional se pudo aumentar el conocimiento actual sobre las δ -SG y además establecer posibles factores pronóstico. En este sentido, en nuestro trabajo se demostró que los pacientes donde existía expresión de proteína residual tenían un inicio más tardío de los síntomas y una evolución más leve, caracterizada por una pérdida de la deambulación más tardía que los pacientes en los que no existe expresión de proteína residual. En este trabajo hemos comprobado que fenotípicamente, la δ -SG es una enfermedad muy grave con un inicio de la enfermedad muy precoz durante la primera infancia, una progresión rápida y una pérdida de la deambulación sobre la segunda década de la vida, sobre todo en los pacientes sin expresión de proteína

6. RESUMEN GLOBAL DE DISCUSIÓN

residual donde en el 77,8% de los casos pierden la deambulación antes de los 15 años de vida. Al contrario, sólo el 42,9% de los pacientes con expresión residual de proteína perdieron la deambulación y en todos los casos fue a una edad superior a los 10 años. Estos datos apoyan que la expresión residual de proteína es un factor pronóstico que condiciona la evolución de la enfermedad, al igual que ocurre con el resto de sarcoglicanopatías como describimos en el estudio recogido en el artículo 1. Sin embargo, hay que considerar que nuestro estudio también mostró que, a pesar de que los niveles de expresión de proteína residual se asocian a un mejor pronóstico, la δ -SG es una enfermedad extremadamente grave dado que el 91,3% de los pacientes están en silla de ruedas antes de los 18 años y además muchos pacientes llegan a desarrollar debilidad distal desde etapas tempranas de la enfermedad, algo que por ejemplo no ocurre en el resto de los tipos de sarcoglicanopatías hasta etapas avanzadas de la enfermedad.

Los datos reportados estudios realizados que se recogen en el artículo 1 y en el artículo 2, proporcionan y amplían el conocimiento sobre las características clínicas y genéticas de los pacientes con mutaciones en cualquiera de los cuatro tipos de sarcoglicanopatías, y aportan informaciones relevantes sobre factores pronósticos que condicionan la evolución de la enfermedad, como son la edad de inicio y la expresión residual de la proteína. Como se ha comentado previamente, el conocimiento de factores puede ser de gran utilidad a la hora de desarrollar y evaluar la eficacia de los nuevos ensayos clínicos de terapia génica que se están desarrollando actualmente en estos pacientes. De este modo, nuestros datos podría ser de ayuda a la hora de seleccionar los pacientes candidatos a participar en estos ensayos de forma que si seleccionan pacientes con una expresión proteína residual ausente, o $<30\%$ en el caso de los pacientes con β -SG y γ -SG, la eficacia del fármaco debe ser evaluada de forma independiente de los pacientes con un inicio tardío de la enfermedad o con una expresión de proteína residual $>30\%$ dado que estos pacientes tienen un curso mucho más benigno con una pérdida de deambulación más tardía, por lo que la posible eficacia

6. RESUMEN GLOBAL DE DISCUSIÓN

del fármaco podría estar enmascarada por la historia natural de la enfermedad en estos pacientes. Sin embargo, hay que considerar que los nuevos tratamientos de terapia génica únicamente se consiguen que el rAAV infecte en torno el 70-75% de las fibras musculares. Esto implica que el resto de las fibras musculares siguen teniendo el gen mutado original, y se seguirán degenerando, activando el proceso de activación de las CS para finalmente producir una nueva fibra muscular regenerante. Además, estas nuevas fibras regeneradas tampoco tendrán la copia sana del gen aportada por el rAAV y, en consecuencia, se continuarían sucediendo ciclos de degeneración-regeneración muscular que provocarán, como se ha comentado previamente, una sustitución progresiva del tejido muscular por un tejido fibro-adiposo. Por este motivo, el uso de otro tipo de terapias que modulen la degeneración y fibrosis muscular, que se producen en las sarcoglicanopatías, podría ser de utilidad en este tipo de pacientes.

Por lo comentado en el párrafo anterior, nos planteamos realizar un tercer estudio cuyos resultados se recogen en el artículo 3. En este tercer estudio se reportó la eficacia de nintedanib en un modelo murino de α -SG. Nintedanib es un inhibidor de tirosina cinasa de segunda generación que modula el receptor de PDGF, FGF y VEGF, que son, como se ha comentado previamente en la introducción de esta tesis, moléculas que están involucradas en la compleja red molecular de fibrosis muscular en las distrofias musculares. Nintedanib es un fármaco que está aprobado en la FPI y en la esclerosis sistémica, ambas enfermedades en las que, al igual que ocurre en las distrofias musculares, el proceso fibrótico es fundamental. Además, nuestro grupo previamente describió que nintedanib es eficaz en reducir la fibrosis muscular en el ratón *mdx*, un modelo murino de DMD. Los resultados de nuestro estudio en el modelo murino de α -SG mostraron que nintedanib es capaz de reducir la fibrosis muscular y modificar el microambiente muscular proinflamatorio existente, lo que conduce a una mejor resistencia y fuerza muscular en las pruebas físicas, así como una mejoría en el fenotipo distrófico de los ratones tratados respecto a los no tratados. Estos resultados sugieren

6. RESUMEN GLOBAL DE DISCUSIÓN

que nintedanib podría considerarse como una potencial terapia anti-fibrótica para pacientes con α -SG y con distrofias musculares en general.

En nuestro estudio hemos demostrado que nintedanib mejora la arquitectura de la fibra muscular, al reducir la cantidad de necrosis, inflamación y fibrosis muscular. Esta reducción de la fibrosis muscular, con una reducción de la cantidad de colágeno del 11,9% en el tejido muscular de los ratones tratados, se asoció además a una reducción del número de células FAPs, que son unas principales células implicadas en el proceso de fibrosis muscular. Además de los estudios histológicos, también hemos evaluado el poder antifibrótico de nintedanib evaluando la expresión génica de diversos genes relacionados a la fibrosis. Cabe destacar la reducción de la expresión en genes como Col1a2, Col3a1, TGFB1 y TGFB2 o varias MMPs y TIMP. Esto sugiere que nintedanib, a través del bloqueo de la vía de PDGFR, reduce la fibrosis muscular y modula el remodelamiento de la MEC favoreciendo así una arquitectura muscular más preservada. Esto también está en relación con el efecto observado de modulación del estado proinflamatorio en los ratones tratados con nintedanib. De hecho, en los ratones tratados se observó una reducción de múltiples citoquinas y de la expresión de diversos genes relacionados con la inflamación, tales como CCL2 o CCL3 que están involucrados en la quimiotaxis de las células inflamatorias hacia el tejido muscular; o de IL-4 o IL-13 que están relacionadas con el cambio de fenotipo del macrófago hacia el macrófago M2 o profibrótico. Aunque, según nuestro estudio, nintedanib no logra revertir totalmente la infiltración por macrófagos en el músculo, estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que una reducción en el proceso fibrótico podría conducir a menor activación de la actividad inflamatoria crónica, produciendo una mejoría del microambiente muscular así como una arquitectura muscular más preservada como observamos en los estudios histológicos. Los resultados a nivel histológico y de expresión génica, se asociaron a una mejoría del rendimiento muscular, al mejorar tanto las pruebas de resistencia como de fuerza muscular en los ratones tratados. Sin embargo, aunque nintedanib mejoró la capacidad muscular funcional de los ratones tratados, no logró revertir completamente

6. RESUMEN GLOBAL DE DISCUSIÓN

el fenotipo distrófico, lo que se sugiere que el proceso degenerativo y de fibrosis muscular progresiva continúa activo a pesar del tratamiento.

Como se comentó previamente, según los primeros datos de estudios previos en modelos preclínicos y clínicos preliminares emitidos de los primeros ensayos clínicos con terapia génica en pacientes con sarcoglicanopatías, no se logra que la totalidad de las fibras musculares expresen el transgén aportado por el rAAV. Esto sugiere que en las fibras musculares que no expresen el transgén, el proceso de degeneración-regeneración y fibrosis muscular progresiva seguirá activo. En el proceso de degeneración muscular se produce la activación y proliferación de las CS que, o se diferenciarán hasta generar una nueva fibra regenerada que tampoco tendrá el transgén; o bien se fusionará con otra miofibrilla dañada dando lugar a que la expresión del transgén se diluya. Por otro lado, el aumento de tejido fibrótico y el microambiente inflamatorio crónico también podría dificultar penetrancia del rAAV en el tejido muscular y la liberación del transgén en las fibras musculares restantes. Por lo comentado, disponer de un tratamiento, como nintedanib, que bloquee o module el proceso de fibrosis muscular podría ser de utilidad para podría facilitar la transfección del rAAV en las fibras musculares y así mejorar la efectividad del tratamiento de terapia génica. Según nuestros resultados, nintedanib probablemente retrase la progresión de la enfermedad y podría considerarse como un tratamiento combinado junto con los nuevos tratamientos de terapia génica, o incluso como un tratamiento previo con el objetivo de acondicionar el tejido muscular previo de la administración del rAAV de forma que se logre aumentar la infectividad y transmisión del transgén a las fibras musculares.

En conjunto, el proyecto de investigación que se ha realizado en esta tesis, y que se resumen en los 3 artículos publicados, ha logrado aumentar el conocimiento de las sarcoglicanopatías, identificando no sólo algunas diferencias clínicas y genéticas existentes entre los distintos tipos, hasta entonces no conocidas con exactitud, sino además ha logrado conocer la existencia de factores pronósticos que se relacionan con

6. RESUMEN GLOBAL DE DISCUSIÓN

la progresión de la enfermedad, como es la edad de inicio o la expresión de proteína residual, y su grado de influencia en los distintos tipos de sarcoglicanopatías. Además, hemos identificado un tratamiento, nintedanib, que es capaz de cambiar la evolución de la enfermedad en un modelo murino de α -SG, disminuyendo la fibrosis muscular, condicionando el microambiente muscular y mejorando la función motora de los ratones tratados. Estos hallazgos abren la puerta al desarrollo de ensayos clínicos en humanos como un posible tratamiento para este tipo de pacientes, ya sea sólo o en combinación con los nuevos tratamientos de terapia génica que se están desarrollando actualmente en las sarcoglicanopatías.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- Existen diferencias fenotípicas entre los 4 tipos de sarcoglicanopatías, de modo que las alfa-sarcoglicanopatías tienen un inicio de la enfermedad y una pérdida de la enfermedad más tardío. Por el contrario, las beta-sarcoglicanopatías y gamma-sarcoglicanopatías tienen un inicio de la enfermedad y pérdida de deambulación similar y más precoz que las alfa-sarcoglicanopatías. Por otro lado, la delta-sarcoglicanopatía es una enfermedad ultra-rara pero con un fenotipo mucho más grave que el resto de sarcoglicanopatías.
- La edad de inicio antes de los 10 años de edad y una expresión de proteína residual menor del 30% son factores de riesgo independiente de gravedad fenotípica y que condicionan una de pérdida de ambulación antes de los 18 años en los pacientes con alfa, beta y gamma-sarcoglicanopatía. La presencia de expresión de proteína residual también es un factor de riesgo independiente para la gravedad y pérdida de deambulación temprana en pacientes con delta-sarcoglicanopatía.
- El tratamiento con nintedanib mejora el fenotipo distrófico en un modelo murino de alfa-sarcoglicanopatía al reducir la fibrosis muscular y mejorar el microambiente inflamatorio crónico, dando lugar a una mejoría de la funcionalidad y fuerza muscular en las pruebas físicas.
- La disminución de la fibrosis muscular con nintedanib podría ser una opción terapéutica futura que permita modificar la evolución de la enfermedad en los pacientes con alfa-sarcoglicanopatías.

8. *LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS*

8. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Los resultados presentados en esta tesis son el punto de partida de varias líneas de investigación en el campo de las sarcoglicanopatías, algunas de las cuales ya están en marcha.

1. La identificación de factores pronósticos en los pacientes con sarcoglicanopatías es fundamental para mejorar el seguimiento y selección de los pacientes, así como en el conocimiento de los aspectos involucrados en la heterogeneidad de estos pacientes. En este sentido, la resonancia magnética muscular ha mostrado su utilidad tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de los pacientes con distrofias musculares u otras miopatías. Actualmente está en marcha un proyecto colaborativo prospectivo, durante 3 años, de evaluación de técnicas cuantificativas de resonancia magnética muscular y su correlación con pruebas físicas y biomarcadores séricos en pacientes con sarcoglicanopatías, tanto infantiles como adultos.
2. Derivado de los resultados de los trabajos recopilados en los artículos 1 y 2, se han obtenido los datos de las mutaciones de más de 400 pacientes con los distintos tipos de sarcoglicanopatías, muchas de las cuales no estaban descritas previamente en la literatura científica. Actualmente se está realizando un análisis más en profundidad de cada una de las mutaciones de todos los pacientes, con el objetivo de realizar estudios funcionales o análisis bioinformáticos que permitan tipificar con mayor exactitud este tipo de mutaciones. Esto favorecerá la interpretación de los resultados genéticos sobre todo en aquellos pacientes con un fenotipo atípico o en los que exista una expresión residual de varios sarcoglicanos.
3. Los resultados positivos obtenidos con nintedanib en un modelo murino de alfa-sarcoglicanopatía están en consonancia con los obtenidos por nuestro grupo en el ratón *mdx*, modelo murino de DMD. Tras haber demostrado la utilidad de este fármaco en dos modelos murinos de dos tipos diferentes de distrofias musculares, abre la puerta a plantear la realización de un ensayo clínico en

8. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

pacientes con alguna de este tipo de distrofias musculares, sobre todo teniendo en cuenta que nintedanib ha demostrado su seguridad en humanos dado que actualmente está aprobado para el tratamiento de la IPF, la EPI-SS y en pacientes con una enfermedad pulmonar intersticial fibrosante crónica.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Nagy H, Veerapaneni KD. Myopathy. In Treasure Island (FL); 2022.
2. Solano A, Playán A, Lopez-Perez M, Montoya J. Genetic diseases of human mitochondrial DNA [in Spanish]. *Salud Publica Mex.* 2001;43(2):1–11.
3. Barohn RJ, Dimachkie MM, Jackson CE. A pattern recognition approach to patients with a suspected myopathy. *Neurol Clin* [Internet]. 2014;32(3):569–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2014.04.008>
4. Dubowitz, V; Sewry, CA; Oldfors A. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. 4th ed. Saunder Elsevier, editor. 2011.
5. Angelini C. LGMD. identification, description and classification. *Acta Myol.* 2020;39(4):207–17.
6. Mercuri E, Bönnemann CG, Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet* [Internet]. 2019;394(10213):2025–38. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32910-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32910-1)
7. Wicklund BMP. *The Limb-Girdle Muscular Dystrophies*. 2019;1599–618.
8. Cohen E, Bonne G, Rivier F, Hamroun D. The 2022 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2021;31(12):1313–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.11.004>
9. Angelini C, Giaretta L, Marozzo R. An update on diagnostic options and considerations in limb-girdle dystrophies. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2018;18(9):693–703. Available from: <https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1508997>
10. Vainzof M, Souza LS, Gurgel-Giannetti J, Zatz M. Sarcoglycanopathies: an update. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2021;31(10):1021–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.07.014>
11. Georganopoulou DG, Moisiadis VG, Malik FA, Mohajer A, Dashevsky TM, Wu ST, et al. A Journey with LGMD: From Protein Abnormalities to Patient Impact. *Protein J* [Internet]. 2021;40(4):466–88. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10930-021-10006-9>
12. Winckler PB, da Silva AMS, Coimbra-Neto AR, Carvalho E, Cavalcanti EBU, Sobreira CFR, et al. Clinicogenetic lessons from 370 patients with autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Clin Genet.* 2019;96(4):341–53.
13. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RCM, Marie SK, Oliveira ASB, Zatz M. Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J Neurol Sci.* 1999;164(1):44–9.
14. Fanin M, Nascimbeni AC, Aurino S, Tasca E, Pegoraro E, Nigro V, et al. Frequency

9. BIBLIOGRAFÍA

- of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology*. 2009;72(16):1432–5.
15. El Kerch F, Ratbi I, Sbiti A, Laarabi FZ, Barkat A, Sefiani A. Carrier frequency of the c.525delT mutation in the SGCG gene and estimated prevalence of limb girdle muscular dystrophy type 2C among the moroccan population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014;18(4):253–6.
 16. Georgieva BG, Todorova A, Tournev I, Mitev V, Kremensky I. C283Y gamma-sarcoglycan gene mutation in the Bulgarian Roma (Gypsy) population: Prevalence study and carrier screening in a high-risk community. *Clin Genet*. 2004;66(5):467–72.
 17. Alavi A, Esmaeili S, Nilipour Y, Nafissi S, Tonekaboni SH, Zamani G, et al. LGMD2E is the most common type of sarcoglycanopathies in the Iranian population. *J Neurogenet* [Internet]. 2017;31(3):161–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/01677063.2017.1346093>
 18. Moreira ES, Vainzof M, Suzuki OT, Pavanello RC, Zatz M, Passos-Bueno MR. Genotype-phenotype correlations in 35 Brazilian families with sarcoglycanopathies including the description of three novel mutations. *J Med Genet*. 2003;40(2).
 19. Hack AA, Groh ME, McNally EM. Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc Res Tech*. 2000;48(3–4):167–80.
 20. Cantero D, Hernández-Lain A, Martínez JFG, Pérez MR, Ruano Y, Lleixà C, et al. Milder forms of α -sarcoglycanopathies diagnosed in adulthood by NGS analysis. *J Neurol Sci* [Internet]. 2018;394(May):63–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.08.026>
 21. Oliveira Santos M, Coelho P, Roque R, Conceição I. Very late-onset limb-girdle muscular dystrophy type 2D: A milder form with a normal muscle biopsy. *J Clin Neurosci* [Internet]. 2020;72(xxxx):471–3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.12.003>
 22. Gonzalez-Quereda L, Gallardo E, Töpf A, Alonso-Jimenez A, Straub V, Rodriguez MJ, et al. A new mutation of the SCGA gene is the cause of a late onset mild phenotype limb girdle muscular dystrophy type 2D with axial involvement. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2018;28(8):633–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.06.002>
 23. Dosi C, Rubegni A, Cassandrini D, Malandrini A, Maggi L, Donati MA, et al. Alpha-sarcoglycanopathy presenting as myalgia and hyperCKemia in two adults with a long-term follow-up. Case reports. *Acta Myol*. 2020;39(4):218–21.
 24. Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical

- spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology*. 1999 Jan;52(1):176–9.
25. Takano A, Bönnemann CG, Honda H, Sakai M, Feener CA, Kunkel LM, et al. Intrafamilial phenotypic variation in limb-girdle muscular dystrophy type 2C with compound heterozygous mutations. *Muscle Nerve*. 2000 May;23(5):807–10.
 26. Kirschner J, Lochmüller H. Sarcoglycanopathies. *Handb Clin Neurol*. 2011;101:41–6.
 27. Sandonà D, Betto R. Sarcoglycanopathies: Molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11(September):1–27.
 28. Captur G, Arbustini E, Bonne G, Syrris P, Mills K, Wahbi K, et al. Lamin and the heart. *Heart*. 2018;104(6):468–79.
 29. Kamdar F, Garry DJ. Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(21):2533–46.
 30. Politano L, Nigro V, Passamano L, Petretta V, Comi LI, Papparella S, et al. Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies. *Neuromuscul Disord*. 2001;11(2):178–85.
 31. Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA, et al. Heart Involvement in Muscular Dystrophies Due To. *Muscle Nerve* [Internet]. 1999;22(April):473–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-4598%28199904%2922%3A4%3C473%3A%3AAID-MUS8%3E3.0.CO%3B2-5>
 32. Fayssoil A, Oagna A, Chaffaut C, Chevret S, Guimarães-Costa R, Leturcq F, et al. Natural history of cardiac and respiratory involvement, prognosis and predictive factors for long-term survival in adult patients with limb girdle muscular dystrophies type 2C and 2D. *PLoS One*. 2016;11(4):1–14.
 33. Schade van Westrum SM, Dekker LRC, De Voogt WG, Wilde AAM, Ginjaar IB, De Visser M, et al. Cardiac involvement in Dutch patients with sarcoglycanopathy: A cross-sectional cohort and follow-up study. *Muscle and Nerve*. 2014;50(6):909–13.
 34. Semplicini C, Dahlqvist JR, Stojkovic T, Bello L, Ambrosio PD, Eymard B, et al. Clinical and genetic spectrum in limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Neurology* [Internet]. 2015;84(17):1772–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862795>
 35. Bauer R, Hudson J, Müller HD, Sommer C, Dekomien G, Bourke J, et al. Does δ -sarcoglycan-associated autosomal-dominant cardiomyopathy exist? *Eur J Hum Genet*. 2009;17(9):1148–53.
 36. Rutschow D, Bauer R, Göhringer C, Bekeredjian R, Schinkel S, Straub V, et al. S151A

9. BIBLIOGRAFÍA

- δ -sarcoglycan mutation causes a mild phenotype of cardiomyopathy in mice. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(1):119–25.
37. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, et al. Mutations in the human δ -sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2000;106(5):655–62.
 38. Kärkkäinen S, Miettinen R, Tuomainen P, Kärkkäinen P, Heliö T, Reissell E, et al. A novel mutation, Arg71Thr, in the δ -sarcoglycan gene is associated with dilated cardiomyopathy. *J Mol Med.* 2003;81(12):795–800.
 39. Sylvius N, Duboscq-Bidot L, Bouchier C, Charron P, Benaiche A, Sébillon P, et al. Mutational analysis of the β - and δ -sarcoglycan genes in a large number of patients with familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *Am J Med Genet.* 2003;120 A(1):8–12.
 40. Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, et al. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, δ -sarcoglycan, in hamster: An animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):13873–8.
 41. Matsunari H, Honda M, Watanabe M, Fukushima S, Suzuki K, Miyagawa S, et al. Pigs with δ -sarcoglycan deficiency exhibit traits of genetic cardiomyopathy. *Lab Investig* [Internet]. 2020;100(6):887–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41374-020-0406-7>
 42. Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, et al. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: A novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell.* 1999;98(4):465–74.
 43. Verhaart IEC, Putker K, van de Vijver D, Tanganyika-De Winter CL, Pasteuning-Vuhman S, Plomp JJ, et al. Cross-sectional study into age-related pathology of mouse models for limb girdle muscular dystrophy types 2D and 2F. *PLoS One.* 2019;14(8):1–19.
 44. Walter MC, Dekomien G, Schlotter-Weigel B, Reilich P, Pongratz D, Müller-Felber W, et al. Respiratory insufficiency as a presenting symptom of LGMD2D in adulthood. *Acta Myol myopathies cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol.* 2004 May;23(1):1–5.
 45. ten Dam L, Frankhuizen WS, Linssen WHJP, Straathof CS, Niks EH, Faber K, et al. Autosomal recessive limb-girdle and Miyoshi muscular dystrophies in the Netherlands: The clinical and molecular spectrum of 244 patients. *Clin Genet.* 2019;96(2):126–33.
 46. D’Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J*

- Rare Dis. 2011 Nov;6:71.
47. Kyriakides T, Angelini C, Schaefer J, Sacconi S, Siciliano G, Vilchez JJ, et al. EFNS guidelines on the diagnostic approach to pauci- or asymptomatic hyperCKemia. *Eur J Neurol*. 2010;17(6):767–73.
 48. Preston DC. *Electromyography and Neuromuscular Disorders: Clinical–Electrophysiologic Correlations*. 3th ed. Elsevier; 2013.
 49. Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K, et al. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurology*. 2008;71(10):758–65.
 50. Nuñez-Peralta C, Alonso-Pérez J, Díaz-Manera J. The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases. *Curr Opin Neurol*. 2020;33(5):611–20.
 51. Monforte M, Laschena F, Ottaviani P, Bagnato MR, Pichiecchio A, Tasca G, et al. Tracking muscle wasting and disease activity in facioscapulohumeral muscular dystrophy by qualitative longitudinal imaging. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2019;10(6):1258–65.
 52. Holm-Yildiz S, Witting N, de Stricker Borch J, Kass K, Khawajazada T, Krag T, et al. Muscle biopsy and MRI findings in ANO5-related myopathy. *Muscle Nerve*. 2021 Dec;64(6):743–8.
 53. Alonso-Jimenez A, Kroon RHMJM, Alejaldre-Monforte A, Nuñez-Peralta C, Horlings CGC, Van Engelen BGM, et al. Muscle MRI in a large cohort of patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90(5):576–85.
 54. Díaz-Manera J, Alejaldre A, González L, Olivé M, Gómez-Andrés D, Muelas N, et al. Muscle imaging in muscle dystrophies produced by mutations in the EMD and LMNA genes. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2016;26(1):33–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2015.10.001>
 55. Díaz-Manera J, Llauger J, Gallardo E, Illa I. Muscle MRI in muscular dystrophies. *Acta Myol myopathies cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol*. 2015;34(2–3):95–108.
 56. Chardon JW, Díaz-Manera J, Tasca G, Bönnemann CG, Gómez-Andrés D, Heerschap A, et al. MYO-MRI diagnostic protocols in genetic myopathies. *Neuromuscul Disord*. 2019;29(11):827–41.
 57. Mercuri E, Lampe A, Allsop J, Knight R, Pane M, Kinali M, et al. Muscle MRI in Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Neuromuscul Disord*. 2005;15(4):303–10.
 58. Tasca G, Monforte M, Díaz-Manera J, Brisca G, Semplicini C, D’Amico A, et al. MRI

9. BIBLIOGRAFÍA

- in sarcoglycanopathies: A large international cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(1):1–6.
59. Figueroa-Bonaparte S, Segovia S, Llauger J, Belmonte I, Pedrosa I, Alejaldre A, et al. Muscle MRI findings in childhood/adult onset pompe disease correlate with muscle function. *PLoS One*. 2016;11(10):1–19.
 60. Díaz-Manera J, Walter G, Straub V. Skeletal muscle magnetic resonance imaging in Pompe disease. *Muscle and Nerve*. 2021;63(5):640–50.
 61. Ansari B, Salort-Campana E, Ogier A, Le Troter PhD A, De Sainte Marie B, Guye M, et al. Quantitative muscle MRI study of patients with sporadic inclusion body myositis. *Muscle and Nerve*. 2020;61(4):496–503.
 62. Panicucci C, Baratto S, Raffaghello L, Tonin P, D'Amico A, Tasca G, et al. Muscle inflammatory pattern in alpha- and gamma-sarcoglycanopathies. *Clin Neuropathol*. 2021;40(6):310–8.
 63. Duggan DJ, Hoffman EP. Autosomal recessive muscular dystrophy and mutations of the sarcoglycan complex. *Neuromuscul Disord*. 1996;6(6):475–82.
 64. Duggan DJ, Gorospe JR, Fanin M, Hoffman EP, Angelini C. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N Engl J Med*. 1997 Feb;336(9):618–24.
 65. Gouveia TLF, Kossugue PM, Paim JF, Zatz M, Anderson LVB, Nigro V, et al. A new evidence for the maintenance of the sarcoglycan complex in muscle sarcolemma in spite of the primary absence of δ -SG protein. *J Mol Med*. 2007;85(4):415–20.
 66. Crosbie RH, Lim LE, Moore SA, Hirano M, Hays AP, Maybaum SW, et al. Molecular and genetic characterization of sarcospan: Insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum Mol Genet*. 2000;9(13):2019–28.
 67. Klinge L, Dekomien G, Aboumoussa A, Charlton R, Epplen JT, Barresi R, et al. Sarcoglycanopathies: Can muscle immunoanalysis predict the genotype? *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2008;18(12):934–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2008.08.003>
 68. Ginjaar HB, Van Der Kooi AJ, Ceelie H, Kneppers ALJ, Van Meegen M, Barth PG, et al. Sarcoglycanopathies in Dutch patients with autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *J Neurol*. 2000;247(7):524–9.
 69. Waite AJ, Carlisle FA, Chan YM, Blake DJ. Myoclonus dystonia and muscular dystrophy: ϵ -sarcoglycan is part of the dystrophin-associated protein complex in brain. *Mov Disord*. 2016;31(11):1694–703.
 70. Piccolo F, Jeanpierre M, Leturcq F, Dodé C, Azibi K, Toutain A, et al. A founder mutation in the γ -sarcoglycan gene of Gypsies possibly predating their migration

- out of India. *Hum Mol Genet.* 1996;5(12):2019–22.
71. Lasa A, Piccolo F, De Diego C, Jeanpierre M, Colomer J, Rodríguez MJ, et al. Severe limb girdle muscular dystrophy in Spanish gypsies: Further evidence for a founder mutation in the γ -sarcoglycan gene. *Eur J Hum Genet.* 1998;6(4):396–9.
 72. Duclos F, Broux O, Bourg N, Straub V, Feldman GL, Sunada Y, et al. β -sarcoglycan: Genomic analysis and identification of a novel missense mutation in the LGMD2E Amish isolate. *Neuromuscul Disord.* 1998;8(1):30–8.
 73. Carrié A, Piccolo F, Leturcq F, De Toma C, Azibi K, Beldjord C, et al. Mutational diversity and hot spots in the α -sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (LGMD2D). *J Med Genet.* 1997;34(6):470–5.
 74. Trabelsi M, Kaviani N, Daoud F, Commere V, Deburgrave N, Beugnet C, et al. Revised spectrum of mutations in sarcoglycanopathies. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(7):793–803.
 75. Tarakci H, Berger J. The sarcoglycan complex in skeletal muscle. *Front Biosci - Landmark.* 2016;21(4):744–56.
 76. Wilson DGS, Tinker A, Iskratsch T. The role of the dystrophin glycoprotein complex in muscle cell mechanotransduction. *Commun Biol.* 2022 Sep;5(1):1022.
 77. Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle and Nerve.* 2001;24(12):1575–94.
 78. Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle and Nerve.* 2005;32(5):563–76.
 79. Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K, et al. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet.* 2000;9(7):1033–40.
 80. Draviam RA, Shand SH, Watkins SC. The β - δ -core of sarcoglycan is essential for deposition at the plasma membrane. *Muscle and Nerve.* 2006;34(6):691–701.
 81. Shi W, Chen Z, Schottenfeld J, Stahl RC, Kunkel LM, Chan Y-M. Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan. *Muscle Nerve.* 2004 Mar;29(3):409–19.
 82. Albuquerque MAV, Abath-Neto O, Maximino JR, Chadi G, Zanoteli E, Reed UC. Clinical aspects of patients with sarcoglycanopathies under steroids therapy. *Arq Neuropsiquiatr.* 2014;72(10):768–72.
 83. Angelini C, Fanin M, Menegazzo E, Freda MP, Duggan DJ, Hoffman EP. Homozygous alpha-sarcoglycan mutation in two siblings: one asymptomatic and

9. BIBLIOGRAFÍA

- one steroid-responsive mild limb-girdle muscular dystrophy patient. *Muscle Nerve*. 1998 Jun;21(6):769–75.
84. Connolly AM, Pestronk A, Mehta S, Al-Lozi M. Primary alpha-sarcoglycan deficiency responsive to immunosuppression over three years. *Muscle Nerve*. 1998 Nov;21(11):1549–53.
85. Wong-Kisiel LC, Kuntz NL. Two siblings with limb-girdle muscular dystrophy type 2E responsive to deflazacort. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2010;20(2):122–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2009.11.005>
86. Fayssoil A, Nguyen LS, Ognà A, Meng P, Nardi O, Laforet P, et al. Effects of Home Mechanical Ventilation on Left Ventricular Function in Sarcoglycanopathies (Limb Girdle Muscular Dystrophies). *Am J Cardiol* [Internet]. 2018;122(2):353–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2018.04.001>
87. Bengtsson NE, Seto JT, Hall JK, Chamberlain JS, Odom GL. Progress and prospects of gene therapy clinical trials for the muscular dystrophies. *Hum Mol Genet*. 2016;25(R1):R9–17.
88. Allamand V, Donahue KM, Straub V, Davisson RL, Davidson BL, Campbell KP. Early adenovirus-mediated gene transfer effectively prevents muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Gene Ther*. 2000;7(16):1385–91.
89. Li J, Dressman D, Tsao YP, Sakamoto A, Hoffman EP, Xiao X. rAAV vector-mediated sarcoglycan gene transfer in a hamster model for limb girdle muscular dystrophy. *Gene Ther*. 1999;6(1):74–82.
90. Cordier L, Hack AA, Scott MO, Barton-Davis ER, Gao GP, Wilson JM, et al. Rescue of Skeletal Muscles of γ -Sarcoglycan-Deficient Mice with Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer. *Mol Ther*. 2000;1(2):119–29.
91. Pozsgai ER, Griffin DA, Heller KN, Mendell JR, Rodino-Klapac LR. β -Sarcoglycan gene transfer decreases fibrosis and restores force in LGMD2E mice. *Gene Ther*. 2016;23(1):57–66.
92. Griffin DA, Pozsgai ER, Heller KN, Potter RA, Peterson EL, Rodino-Klapac LR. Preclinical Systemic Delivery of Adeno-Associated α -Sarcoglycan Gene Transfer for Limb-Girdle Muscular Dystrophy. Vol. 32, *Human Gene Therapy*. 2021. p. 390–404.
93. Pozsgai ER, Griffin DA, Heller KN, Mendell JR, Rodino-Klapac LR. Systemic AAV-Mediated β -Sarcoglycan Delivery Targeting Cardiac and Skeletal Muscle Ameliorates Histological and Functional Deficits in LGMD2E Mice. *Mol Ther*. 2017;25(4):855–69.
94. Israeli D, Cosette J, Corre G, Amor F, Poupiot J, Stockholm D, et al. An AAV-SGCG Dose-Response Study in a γ -Sarcoglycanopathy Mouse Model in the Context of

- Mechanical Stress. *Mol Ther - Methods Clin Dev* [Internet]. 2019;13(June):494–502. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.04.007>
95. Goehringer C, Rutschow D, Bauer R, Schinkel S, Weichenhan D, Bekeredjian R, et al. Prevention of cardiomyopathy in δ -sarcoglycan knockout mice after systemic transfer of targeted adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc Res*. 2009;82(3):404–10.
 96. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Rosales-Quintero X, Kota J, Coley BD, Galloway G, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores α -sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol*. 2009;66(3):290–7.
 97. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Rosales XQ, Coley BD, Galloway G, Lewis S, et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol*. 2010;68(5):629–38.
 98. Herson S, Hentati F, Rigolet A, Behin A, Romero NB, Leturcq F, et al. A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1- γ -sarcoglycan gene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C. *Brain*. 2012;135(2):483–92.
 99. Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, Goodspeed K, Gray SJ, Kay CN, et al. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. *Mol Ther* [Internet]. 2021;29(2):464–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.12.007>
 100. Mendell JR, Chicoine LG, Al-Zaidy SA, Sahenk Z, Lehman K, Lowes L, et al. Gene Delivery for Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2D by Isolated Limb Infusion. *Hum Gene Ther*. 2019;30(7):794–801.
 101. Sarepta Therapeutics. Sarepta Therapeutics' Investigational Gene Therapy SRP-9003 for the Treatment of Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2E Shows Sustained Expression and Functional Improvements 2 Years After Administration. 2021; Available from: https://investorrelations.sarepta.com/news-releases/news-release-details/sarepta-therapeutics-investigational-gene-therapy-srp-9003-0?_ga=2.109803393.521978405.1616430462-690442133.1616430462
 102. Carotti M, Marsolier J, Soardi M, Bianchini E, Gomiero C, Fecchio C, et al. Repairing folding-defective α -sarcoglycan mutants by CFTR correctors, a potential therapy for limb-girdle muscular dystrophy 2D. *Hum Mol Genet*. 2018;27(6):969–84.
 103. Carotti M, Scano M, Fancello I, Richard I, Risato G, Bensalah M, et al. Combined use of CFTR correctors in LGMD2D myotubes improves sarcoglycan complex recovery. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5).
 104. Scano M, Benetollo A, Nogara L, Bondì M, Dalla Barba F, Soardi M, et al. CFTR corrector C17 is effective in muscular dystrophy, in vivo proof of concept in LGMDR3. *Hum Mol Genet*. 2022;31(4):499–509.

9. BIBLIOGRAFÍA

105. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behav Genet.* 2015;45(2):183–95.
106. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2020;12(1):1–46.
107. Dave HD, Shook M, Varacallo M. *Anatomy, Skeletal Muscle.* In Treasure Island (FL); 2022.
108. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: Biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33(5):745–64.
109. Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle and Nerve.* 2011;44(3):318–31.
110. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):209–38.
111. MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:493–5.
112. Katz B. The termination of the afferent nerve fibre in the muscle spindle of the frog. *Philos Trans R Soc L.* 1961;243:221–40.
113. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential ... [J Clin Invest. 2010] - PubMed result. *J Clin Invest* [Internet]. 2010;120(1):11–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051632%5Cnpapers3://publication/uuid/906207AB-C2A8-490C-9F9D-8C97F7ED6944>
114. Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle regeneration: Cellular and molecular events. *In Vivo (Brooklyn).* 2009;23(5):779–96.
115. Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16(5):525–32.
116. Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, et al. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol.* 2006;172(1):91–102.
117. Rudnicki MA, Le Grand F, McKinnell I, Kuang S. The molecular regulation of muscle stem cell function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008;73:323–31.
118. Chang NC, Rudnicki MA. Satellite Cells: The Architects of Skeletal Muscle [Internet]. 1st ed. Vol. 107, *Current Topics in Developmental Biology.* Elsevier Inc.; 2014. 161–181 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416022-4.00006-8>

119. Schmidt M, Schüler SC, Hüttner SS, von Eyss B, von Maltzahn J. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019;76(13):2559–70. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03093-6>
120. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(5).
121. Mashinchian O, Pisconti A, Le Moal E, Bentzinger CF. The Muscle Stem Cell Niche in Health and Disease [Internet]. 1st ed. Vol. 126, Current Topics in Developmental Biology. Elsevier Inc.; 2018. 23–65 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.08.003>
122. Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep* [Internet]. 2013;14(12):1062–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2013.182>
123. Joe AWB, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol*. 2010 Feb;12(2):153–63.
124. Uezumi A, Fukada SI, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2010;12(2):143–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2014>
125. Molina T, Fabre P, Dumont NA. Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis, regeneration and diseases. *Open Biol*. 2021;11(12):210110.
126. Petrilli LL, Spada F, Palma A, Reggio A, Rosina M, Gargioli C, et al. High-Dimensional Single-Cell Quantitative Profiling of Skeletal Muscle Cell Population Dynamics during Regeneration. *Cells*. 2020;9(7):13–6.
127. Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, Mueller AA, Deo RC, Locksley RM, et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* [Internet]. 2013;153(2):376–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.053>
128. Eisner C, Cummings M, Johnston G, Tung LW, Groppa E, Chang C, et al. Murine Tissue-Resident PDGFR α + Fibro-Adipogenic Progenitors Spontaneously Acquire Osteogenic Phenotype in an Altered Inflammatory Environment. *J Bone Miner Res*. 2020;35(8):1525–34.
129. Contreras O, Rossi FM, Theret M. Origins, Potency and Heterogeneity of Skeletal Muscle Fibro-Adipogenic Progenitors - time for new definitions. *Skelet Muscle*. 2021;Accepted:1–25.

9. BIBLIOGRAFÍA

130. Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Fibrosis development in early-onset muscular dystrophies: Mechanisms and translational implications. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;64:181–90.
131. Osses N, Brandan E. ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2002;282(2 51-2).
132. Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development.* 2011;138(17):3625–37.
133. Alameddine HS, Morgan JE. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Inflammation and Fibrosis of Skeletal Muscles. *J Neuromuscul Dis.* 2016;3(4):455–73.
134. Chen X, Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle. Vol. 3, *Cell Adhesion & Migration.* 2009. p. 337–41.
135. Mahdy MAA. Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell Tissue Res.* 2019;375(3):575–88.
136. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002;82(2):291–329.
137. Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL, et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle.* 2011;1(1):1–20.
138. Sun G, Haginoya K, Wu Y, Chiba Y, Nakanishi T, Onuma A, et al. Connective tissue growth factor is overexpressed in muscles of human muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 2008;267(1–2):48–56.
139. Sun G, Haginoya K, Dai H, Chiba Y, Uematsu M, Hino-Fukuyo N, et al. Intramuscular renin-angiotensin system is activated in human muscular dystrophy. *J Neurol Sci [Internet].* 2009;280(1–2):40–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2009.01.020>
140. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother [Internet].* 2017;94:317–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.091>
141. Spurney CF, Sali A, Gueron AD, Iantorno M, Yu Q, Gordish-Dressman H, et al. Losartan decreases cardiac muscle fibrosis and improves cardiac function in dystrophin-deficient mdx mice. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16(1):87–95.
142. Bish LT, Yarchoan M, Sleeper MM, Gazzara JA, Morine KJ, Acosta P, et al. Chronic losartan administration reduces mortality and preserves cardiac but not skeletal

- muscle function in dystrophic mice. *PLoS One*. 2011;6(6):1–6.
143. Allen HD, Flanigan KM, Thrush PT, Dvorchik I, Yin H, Canter C, et al. A randomized, double-blind trial of lisinopril and losartan for the treatment of cardiomyopathy in duchenne muscular dystrophy. *PLoS Curr*. 2013 Dec;5.
 144. Zhao Y, Haginoya K, Sun G, Dai H, Onuma A, linuma K. Platelet-derived growth factor and its receptors are related to the progression of human muscular dystrophy: An immunohistochemical study. *J Pathol*. 2003;201(1):149–59.
 145. Alonso-Jiménez A, Fernández-Simón E, Natera-de Benito D, Ortez C, García C, Montiel E, et al. Platelet Derived Growth Factor-AA Correlates With Muscle Function Tests and Quantitative Muscle Magnetic Resonance in Dystrophinopathies. *Front Neurol*. 2021;12:659922.
 146. Fernández-Simón E, Carrasco-Rozas A, Gallardo E, Figueroa-Bonaparte S, Belmonte I, Pedrosa I, et al. PDGF-BB serum levels are decreased in adult onset Pompe patients. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–10.
 147. Rosenbloom J, Mendoza FA, Jimenez SA. Strategies for anti-fibrotic therapies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2013;1832(7):1088–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.12.007>
 148. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;22(10):1276–312.
 149. Serrano AL, Mann CJ, Vidal B, Ardite E, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P. Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. Vol. 96, *Current Topics in Developmental Biology*. 2011. 167–201 p.
 150. Germani A, Di Carlo A, Mangoni A, Straino S, Giacinti C, Turrini P, et al. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. *Am J Pathol* [Internet]. 2003;163(4):1417–28. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63499-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63499-2)
 151. Gutpell KM, Hoffman LM. VEGF induces stress fiber formation in fibroblasts isolated from dystrophic muscle. *J Cell Commun Signal*. 2015;9(4):353–60.
 152. Karvinen H, Pasanen E, Rissanen TT, Korpisalo P, Vähäkangas E, Jazwa A, et al. Long-term VEGF-A expression promotes aberrant angiogenesis and fibrosis in skeletal muscle. *Gene Ther*. 2011;18(12):1166–72.
 153. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. Vol. 387, *Nature*. 1997. p. 83–90.
 154. Zhao BL, Kollias HD, Wagner KR. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem*. 2008;283(28):19371–8.
 155. Zhu J, Li Y, Shen W, Qiao C, Ambrosio F, Lavasani M, et al. Relationships between

9. BIBLIOGRAFÍA

- transforming growth factor- β 1, myostatin, and decorin: Implications for skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25852–63.
156. Walton KL, Johnson KE, Harrison CA. Targeting TGF- β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. *Front Pharmacol*. 2017;8(JUL).
 157. Taniguti APT, Pertille A, Matsumura CY, Neto HS, Marques MJ. Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdxmice by suramin, a TGF- β 1 blocker. *Muscle and Nerve*. 2011;43(1):82–7.
 158. De Oliveira Moreira D, Pereira JA, Taniguti APT, Matsumura CY, Ramos LAF, Areas MA, et al. Suramin attenuates dystrophin-deficient cardiomyopathy in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2013;48(6):911–9.
 159. Pagano AF, Arc-Chagnaud C, Brioché T, Chopard A, Py G. Muscle Resting and TGF- β Inhibitor Treatment Prevent Fatty Infiltration Following Skeletal Muscle Injury. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2019;53(1):62–75.
 160. Huebner KD, Jassal DS, Halevy O, Pines M, Anderson JE. Functional resolution of fibrosis in mdx mouse dystrophic heart and skeletal muscle by halofuginone. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2008;294(4).
 161. Morales MG, Gutierrez J, Cabello-Verrugio C, Cabrera D, Lipson KE, Goldschmeding R, et al. Reducing CTGF/CCN2 slows down mdx muscle dystrophy and improves cell therapy. *Hum Mol Genet*. 2013;22(24):4938–51.
 162. Richeldi L, Fernández Pérez ER, Costabel U, Albera C, Lederer DJ, Flaherty KR, et al. Pamrevlumab, an anti-connective tissue growth factor therapy, for idiopathic pulmonary fibrosis (PRAISE): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2020;8(1):25–33.
 163. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet*. 1997 Sep;17(1):71–4.
 164. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, et al. Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *N Engl J Med*. 2004;350(26):2682–8.
 165. Haidet AM, Rizo L, Handy C, Umapathi P, Eagle A, Shilling C, et al. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(11):4318–22.
 166. Kota J, Handy CR, Haidet AM, Montgomery CL, Eagle A, Rodino-Klapac LR, et al. Follistatin gene delivery enhances muscle growth and strength in nonhuman primates. *Sci Transl Med*. 2009;1(6):1–8.

167. Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP, et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther*. 2015;23(1):192–201.
168. Bartoli M, Poupiot J, Vulin A, Fougerousse F, Arandel L, Daniele N, et al. AAV-mediated delivery of a mutated myostatin propeptide ameliorates calpain 3 but not α -sarcoglycan deficiency. *Gene Ther*. 2007;14(9):733–40.
169. Bogdanovich S, McNally EM, Khurana TS. Myostatin blockade improves function but not histopathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy 2C. *Muscle and Nerve*. 2008;37(3):308–16.
170. Parsons SA, Millay DP, Sargent MA, McNally EM, Molkentin JD. Age-dependent effect of myostatin blockade on disease severity in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Pathol* [Internet]. 2006;168(6):1975–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.051316>
171. Li ZB, Zhang J, Wagner KR. Inhibition of myostatin reverses muscle fibrosis through apoptosis. *J Cell Sci*. 2012;125(17):3957–65.
172. Campbell C, McMillan HJ, Mah JK, Tarnopolsky M, Selby K, McClure T, et al. Myostatin inhibitor ACE-031 treatment of ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy: Results of a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Muscle and Nerve*. 2017;55(4):458–64.
173. Statland JM, Campbell C, Desai U, Karam C, Díaz-Manera J, Guptill JT, et al. Randomized phase 2 study of ACE-083, a muscle-promoting agent, in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle and Nerve*. 2022;66(1):50–62.
174. Queiroz AL, Dantas E, Ramsamooj S, Murthy A, Ahmed M, Zunica ERM, et al. Blocking ActRIIB and restoring appetite reverses cachexia and improves survival in mice with lung cancer. *Nat Commun*. 2022;13(1).
175. Lee SJ, Lehar A, Meir JU, Koch C, Morgan A, Warren LE, et al. Targeting myostatin/activin A protects against skeletal muscle and bone loss during spaceflight. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(38):23942–51.
176. Guérit E, Arts F, Dachy G, Boulouadnine B, Demoulin JB. PDGF receptor mutations in human diseases. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2021;78(8):3867–81. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03753-y>
177. Papadopoulos N, Lennartsson J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2018;62:75–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.007>
178. Huang P, Zhao XS, Fields M, Ransohoff RM, Zhou L. Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice . *FASEB J*. 2009;23(8):2539–48.

9. BIBLIOGRAFÍA

179. Bizario JC da S, Cerri DG, Rodrigues LC, Oliveira GLV, Nomizo A, de Araujo DD, et al. Imatinib mesylate ameliorates the dystrophic phenotype in exercised mdx mice. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2009;212(1–2):93–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.05.006>
180. Ito T, Ogawa R, Uezumi A, Ohtani T, Watanabe Y, Tsujikawa K, et al. Imatinib attenuates severe mouse dystrophy and inhibits proliferation and fibrosis-marker expression in muscle mesenchymal progenitors. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2013;23(4):349–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2012.10.025>
181. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med* [Internet]. 2015;21(7):786–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3869>
182. Ieronimakis N, Hays A, Prasad A, Janebodin K, Duffield JS, Reyes M. PDGFR α signalling promotes fibrogenic responses in collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J Pathol*. 2016 Dec;240(4):410–24.
183. Piñol-Jurado P, Suárez-Calvet X, Fernández-Simón E, Gallardo E, De La Oliva N, Martínez-Muriana A, et al. Nintedanib decreases muscle fibrosis and improves muscle function in a murine model of dystrophinopathy. *Cell Death Dis* [Internet]. 2018;9(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0792-6>
184. Rolfo C, Raez LE, Bronte G, Santos ES, Papadimitriou K, Buffoni L, et al. BIBF 1120/nintedanib: A new triple angiokinase inhibitor-directed therapy in patients with non-small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013;22(8):1081–8.
185. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(4):201–7.
186. Awasthi N, Schwarz RE. Profile of nintedanib in the treatment of solid tumors: the evidence to date. *Onco Targets Ther*. 2015;8:3691–701.
187. Caglevic C, Grassi M, Raez L, Listi A, Giallombardo M, Bustamante E, et al. Nintedanib in non-small cell lung cancer: From preclinical to approval. *Ther Adv Respir Dis*. 2015;9(4):164–72.
188. Chaudhary NI, Roth GJ, Hilberg F, Müller-Quernheim J, Prasse A, Zissel G, et al. Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur Respir J*. 2007;29(5):976–85.
189. Hostettler KE, Zhong J, Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Tamm M, Seidel P, et al. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2014;15(1):1–9.
190. Gabasa M, Ikemori R, Hilberg F, Reguart N, Alcaraz J. Nintedanib selectively

- inhibits the activation and tumour-promoting effects of fibroblasts from lung adenocarcinoma patients. *Br J Cancer* [Internet]. 2017;117(8):1128–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.270>
191. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370(22):2071–82.
 192. Richeldi L, Kolb M, Jouneau S, Wuyts WA, Schinzel B, Stowasser S, et al. Efficacy and safety of nintedanib in patients with advanced idiopathic pulmonary fibrosis. Vol. 20, *BMC Pulmonary Medicine*. 2020.
 193. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, Azuma A, Fischer A, Mayes MD, et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis–Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med*. 2019;380(26):2518–28.
 194. Kuwana M, Allanore Y, Denton CP, Distler JHW, Steen V, Khanna D, et al. Nintedanib in Patients With Systemic Sclerosis–Associated Interstitial Lung Disease: Subgroup Analyses by Autoantibody Status and Modified Rodnan Skin Thickness Score. *Arthritis Rheumatol*. 2022;74(3):518–26.
 195. Flaherty KR, Wells AU, Cottin V, Devaraj A, Walsh SLF, Inoue Y, et al. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *N Engl J Med*. 2019;381(18):1718–27.
 196. Umemura Y, Mitsuyama Y, Minami K, Nishida T, Watanabe A, Okada N, et al. Efficacy and safety of nintedanib for pulmonary fibrosis in severe pneumonia induced by COVID-19: An interventional study. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2021;108:454–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.05.055>
 197. Öztürk Akcora B, Storm G, Prakash J, Bansal R. Tyrosine kinase inhibitor BIBF1120 ameliorates inflammation, angiogenesis and fibrosis in CCl4-induced liver fibrogenesis mouse model. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(February):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44545>
 198. Wollin L, Togbe D, Ryffel B. Effects of Nintedanib in an Animal Model of Liver Fibrosis. *Biomed Res Int*. 2020;2020:3867198.
 199. Susutlertpanya W, Wakuda H, Otani N, Kuramoto T, Li L, Kuranari M, et al. Histological evaluation of nintedanib in non-alcoholic steatohepatitis mice. *Life Sci*. 2019;228(May):251–7.
 200. Liu F, Wang L, Qi H, Wang J, Wang Y, Jiang W, et al. Nintedanib, a triple tyrosine kinase inhibitor, attenuates renal fibrosis in chronic kidney disease. *Clin Sci*. 2017;131(16):2125–43.
 201. Jamadar A, Suma SM, Mathew S, Fields TA, Wallace DP, Calvet JP, et al. The tyrosine-kinase inhibitor Nintedanib ameliorates autosomal-dominant polycystic

9. BIBLIOGRAFÍA

- kidney disease. *Cell Death Dis.* 2021;12(10).
202. Cui B, Yu C, Zhang S, Hou X, Wang Y, Wang J, et al. Delayed Administration of Nintedanib Ameliorates Fibrosis Progression in CG-Induced Peritoneal Fibrosis Mouse Model. *Kidney Dis.* 2022;8(4):319–33.
203. HOMBURGER F, BAKER JR, NIXON CW, WILGRAM G. New hereditary disease of Syrian hamsters. Primary, generalized polymyopathy and cardiac necrosis. *Arch Intern Med.* 1962 Nov;110:660–2.
204. Nigro V, Okazaki Y, Belsito A, Piluso G, Matsuda Y, Politano L, et al. Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum Mol Genet.* 1997;6(4):601–7.
205. Demonbreun AR, Wyatt EJ, Fallon KS, Oosterbaan CC, Page PG, Hadhazy M, et al. A gene-edited mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2C for testing exon skipping. *DMM Dis Model Mech.* 2020;13(2).
206. Hwang J, Yokota T. Recent advancements in exon-skipping therapies using antisense oligonucleotides and genome editing for the treatment of various muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med.* 2019;21:e5.
207. Takeda S, Clemens PR, Hoffman EP. Exon-Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* 2021;8(s2):S343–58.
208. Wyatt EJ, Demonbreun AR, Kim EY, Puckelwartz MJ, Vo AH, Dellefave-Castillo LM, et al. Efficient exon skipping of SGCG mutations mediated by phosphorodiamidate morpholino oligomers. *JCI insight.* 2018;3(9):1–16.
209. Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, et al. Progressive muscular dystrophy in α -sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol.* 1998;142(6):1461–71.
210. Pasteuning-Vuhman S, Putker K, Tanganyika-De Winter CL, Boertje-Van Der Meulen JW, Van Vliet L, Overzier M, et al. Natural disease history of mouse models for limb girdle muscular dystrophy types 2D and 2F. *PLoS One.* 2017;12(8):1–23.
211. van Putten M, Lloyd EM, de Greef JC, Raz V, Willmann R, Grounds MD. Mouse models for muscular dystrophies: an overview. *Dis Model Mech.* 2020;13(2).
212. Li D, Long C, Yue Y, Duan D. Sub-physiological sarcoglycan expression contributes to compensatory muscle protection in mdx mice. *Hum Mol Genet.* 2009;18(7):1209–20.
213. Semplicini C, Vissing J, Dahlqvist JR, Stojkovic T, Bello L, Witting N, et al. Clinical and genetic spectrum in limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Neurology.* 2015;84(17):1772–81.
214. Sardella M, Belcher G. Pharmacovigilance of medicines for rare and ultrarare diseases. *Ther Adv drug Saf.* 2018 Nov;9(11):631–8.

9. BIBLIOGRAFÍA

215. Guglieri M, Magri F, D'Angelo MG, Prella A, Morandi L, Rodolico C, et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat.* 2008 Feb;29(2):258–66.

