



**Fundació**  
La Marató de TV3

20<sup>e</sup> SIMPOSIUM  
Enfermedades neurodegenerativas



## **NUEVAS TERAPIAS CON CÉLULAS MADRE PARA LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

**Antonio L. Serrano Sánchez**

Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida UPF

**Francesco Saverio Tedesco**

University College London

**Giulio Cossu**

Centre For Tissue Injury and Repair / University of Manchester

## 1. Resumen del proyecto

La distrofia muscular es un grupo heterogéneo de trastornos neuromusculares degenerativos hereditarios caracterizados por la debilidad progresiva de los músculos esqueléticos y, en algunos casos, del músculo cardíaco. Las distrofias musculares conducen a la pérdida de la motilidad y, en las formas más graves, a la parálisis progresiva y la necesidad de ventilación asistida. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la forma más común y grave, afecta a 1 de cada 3.500 varones recién nacidos y causa la muerte entre la adolescencia y la década de los 20 años. La DMD está originada por mutaciones en el gen de la distrofina (*DMD*), que codifica la proteína distrofina, que une el citoesqueleto de actina a la matriz extracelular en las fibras musculares. La ausencia de distrofina produce inestabilidad de la membrana y muerte de las células musculares. Las fibras musculares dañadas sufren ciclos repetidos de necrosis segmentaria, degeneración y regeneración subsiguiente, durante los que las células madre musculares, llamadas *células satélite*, se activan para regenerar las fibras musculares. Sin embargo, el proceso de regeneración es en gran medida ineficiente debido a la inflamación persistente y a la sustitución de las miofibras por células adiposas y tejido fibrótico afuncional. La asistencia médica mejorada ha aumentado la esperanza de vida de los pacientes, pero aún no existe una terapia eficaz y los esteroides son el único tratamiento paliativo disponible.

Las terapias celulares en las que para evitar la inmunosupresión células autólogas con un gen de distrofina funcional se trasplantan para tratar la distrofia muscular han ganado una atención creciente en los últimos años. La hipótesis de este proyecto implica que una estrategia de terapia celular fructífera para combatir la distrofia muscular requiere, al menos:

1. El rescate eficiente del defecto primario en las células mutadas.
2. La posibilidad de obtener fácilmente el número suficiente de células para el trasplante.
3. Un injerto eficiente de las células en el tejido del huésped enfermo.

Nuestros objetivos sinérgicos son los siguientes:

a) Optimizar estrategias para obtener células de ratón y humanas corregidas genéticamente de ratones distróficos y pacientes con DMD, respectivamente. Investigaremos la capacidad de estas células para producir distrofina de manera eficiente, amplificarlas *ex vivo* para obtener el número necesario de células y autorrenovarse *in vivo* para proporcionar una terapia de larga duración.

b) Mejorar la eficiencia de las terapias celulares modificando el ambiente celular alterado en el receptor enfermo. La presencia de inflamación crónica y el depósito excesivo de matriz extracelular (fibrosis) en los músculos distróficos representan actualmente un obstáculo importante para el injerto exitoso de las células trasplantadas. La migración de las células a las áreas dañadas, su supervivencia y autorrenovación se ven gravemente obstaculizadas por sus interacciones con los componentes celulares y de la matriz extracelular alterados del tejido diana. Nuestro objetivo es interferir con la inflamación y la fibrosis como un paso necesario para el éxito de las terapias celulares en la distrofia muscular.

## 2. Resultados

### A) Optimización de estrategias para obtener células de ratón y humanas distróficas corregidas genéticamente

Hemos probado la hipótesis de que una minoría de células corregidas genéticamente, capaces de producir distrofina, se fusionarán con un exceso de células DMD mutadas (que no producen distrofina). Los núcleos corregidos producirán el ARN nuclear pequeño U7 (snRNA), que permite el salto del exón mutado, y también entrará en los núcleos cercanos durante la fusión miogénica que se produce en la regeneración, amplificando así el efecto terapéutico de las células corregidas.

Identificación de líneas celulares adecuadas. Inicialmente obtuvimos células miogénicas primarias de los bancos celulares de UCL y Newcastle con una mutación saltable de exón 51. La transducción con U7 snRNA indujo el salto del exón 51 y la producción de una forma truncada de distrofina. Sin embargo, la escasa fusión celular impidió la propagación del snRNA a los núcleos vecinos y excluyó la investigación del posible efecto de transcorrección de los núcleos cercanos que no expresaban la distrofina.

Seguidamente utilizamos líneas de mioblastos distróficos inmortalizados con una mutación del exón 51 (donados por el Dr. V. Mouly, Instituto de Myologie, París). Al mezclar las células transducidas con un exceso de miocitos DMD inmortalizados no corregidos en proporciones que imitan un trasplante de un 3% y un 10% de células (similar a los niveles observables después del trasplante *in vivo* con un protocolo optimizado y comenzando en una edad temprana en pacientes), se generaron miotubos híbridos con altos niveles de ARN de distrofina. Estos resultados evidencian que se puede inducir la expresión de distrofina a un nivel más alto que el que se espera obtener directamente a través de la inducción del salto del exón.

A continuación, aplicamos este enfoque experimental a líneas de células iPS con mutaciones del exón 51 (en colaboración con el Dr. K. Anastasiadis, Universidad de Dresden). A pesar de lograr una corrección eficiente, estas líneas celulares se diferenciaron en miocitos mononucleados o binucleados, impidiendo nuevamente la detección de un posible efecto de transcorrección. Para resolver este problema, usamos fibroblastos de la piel de pacientes con DMD (proporcionados por el Dr. Y. Torrente, de la Universidad de Milán). Estas células se transformaron en células miogénicas por la expresión inducible del factor MyoD-ER tras la exposición al tamoxifeno. En ambas líneas celulares la mutación se corrigió de manera eficiente pero solo formaron pequeños miotubos. A pesar de ello, las células se usaron como herramientas de corrección en ulteriores experimentos.

Posteriormente, usamos una línea celular miogénica inmortalizada (con telomerasa y CDK4), proveniente del laboratorio del Dr. V. Mouly, que formaba miotubos multinucleados de gran tamaño con facilidad. Esta línea se usó como receptora de células miogénicas DMD en cocultivos con una minoría (dilución 1:10 o 1:30) de células WT o DMD (mioblastos inmortalizados de la misma línea, derivados de iPS, DMD, corregidos genéticamente, células miogénicas o fibroblastos DMD), también corregidos genéticamente. Detectamos que la acumulación de ARNm de distrofina en los cocultivos alcanzó valores del 55% y 28% respectivamente, lo que demuestra que la síntesis de distrofina también se produjo en otros núcleos distintos de los transducidos directamente.

La proteína distrofina fue analizada por inmunofluorescencia y WB. A pesar de que las células DMD corregidas genéticamente expresan solo el 60% del nivel de las WT, su

expresión permanece casi constante tras una dilución progresiva, con niveles de proteína observables superiores al 30% del WT, valor que representa el umbral del rango terapéutico para la distrofina. Se obtuvieron resultados exitosos similares con células derivadas de iPS, células miogénicas DMD o fibroblastos DMD convertidos con MyoD, ambos transducidos con el mismo vector lentiviral.

Para poder implementar estos experimentos, hemos desarrollado un sistema con condiciones de cultivo optimizadas, usando una doble capa de matrigel que permitió una buena maduración de los miotubos. Por otra parte, las células fueron inervadas fácilmente por neuronas motoras formadas después de la adición de fragmentos de médula espinal embrionaria de ratón, que inesperadamente indujeron contracciones de los cultivos.

Finalmente, probamos la eficiencia de nuestra estrategia *in vivo*. Para ello, se realizaron implantes de matrigel con células miogénicas humanas en ratones inmunodeficientes (SCID/bg). Esta estrategia permite dosificar correctamente la proporción de células corregidas. Los implantes celulares se realizaron por vía subcutánea en el abdomen de los ratones y se analizaron al cabo de un mes. Los resultados indican la formación eficiente de haces de fibras musculares maduras con una elevada expresión de distrofina, comparable a la cantidad sintetizada por las fibras musculares derivadas de células con una corrección total de la mutación. Este efecto probablemente se debe al mayor número de núcleos que contiene una fibra muscular madura en comparación con un miotubo. Prevemos una traslación clínica inmediata y la validación en pacientes en los próximos dos años.

#### Objetivos específicos alcanzados

- Producción y validación de vectores lentivirales.
- Transducción de líneas primarias, IPS y células miogénicas humanas inmortalizadas.
- Detección de la producción de distrofina por la técnica del salto del exón mediante RT-PCR, IF y WB y su producción mejorada en cocultivos de células distróficas corregidas y no corregidas.
- Desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* optimizados para miotubos corregidos maduros.
- Corrección eficiente de la mutación de distrofina y producción de niveles terapéuticos de distrofina en un modelo de ratón *in vivo*.

## B) Evaluación del potencial de autorrenovación de los mesoangioblastos WT de ratón y corregidos con un cromosoma artificial humano (HAC)

Los mesoangioblastos (MAB) son células madre/progenitoras asociadas a vasos sanguíneos capaces de diferenciarse en músculo esquelético. Los MAB pueden migrar a través de la pared de los vasos sanguíneos, lo que permite su aplicación terapéutica por vía intraarterial para los trastornos neuromusculares. Nuestro trabajo responde a tres preguntas importantes:

B.1) ¿Son capaces las "células madre" musculares derivadas de los MAB de participar en múltiples rondas de regeneración y de autorrenovarse?

B.2) ¿Se mantiene esta propiedad en MAB corregidos genéticamente?

B.3) ¿Es válida esta afirmación en MAB humanos?

### B.1. Capacidad de autorrenovación de los MAB

Para responder a esta pregunta, se trasplantaron MAB-GFP<sup>+</sup> de ratones donantes en ratones scid/mdx. Un mes más tarde, detectamos la presencia de células GFP<sup>+</sup> y miofibras que expresaban distrofina positivas en los ratones receptores. De estos animales aislamos células satélite derivadas de MAB (GFP<sup>+</sup>/SM/C-2.6<sup>+</sup>) para experimentos de trasplante adicionales. La capacidad de autorrenovación de las células donantes se determinó en ensayos clonogénicos y retrasplantándolas en ratones scid/mdx. Nuestros resultados demuestran que MAB ampliados clonalmente que habían entrado en el compartimento de las células satélite eran capaces de regenerar con éxito el músculo distrófico.

Seguidamente, examinamos la capacidad de autorrenovación *in vivo* de MAB mdx corregidos genéticamente con la inserción de un cromosoma artificial humano que contiene el locus completo de la distrofina (DYS-HAC) tras varios trasplantes realizados secuencialmente. Los músculos trasplantados mostraron la presencia de miofibras positivas para distrofina, lo que indica que MAB de mdx corregidos genéticamente con DYS-HAC pueden ser expandidos clonalmente e injertarse con éxito en músculo distrófico después de varios ciclos de autorrenovación. Células satélite provenientes de MAB DYS-HAC pueden ser trasplantadas secuencialmente durante, al menos, 4 rondas y la capacidad clonogénica de estas células no se alteró después de varios ciclos de trasplante.

## B.2. Validación con mesoangioblastos de ratón aislados en fresco y derivados de células iPS

Mediante trasplantes de MAB primarios recién aislados, hemos conseguido lo siguiente:

- Generar colonias de ratones CreERT2 con fosfatasa alcalina sin especificidad tisular (TNAP) y líneas reporteras de ratones Rosa26-YFP y Rosa26-tdTomato inducibles por Cre. Estos ratones permiten el aislamiento en fresco de pericitos miogénicos para generar miofibras derivadas del ratón donante y células con marcadores específicos de células madre en ratones huéspedes tras experimentos de trasplante.
- Caracterizar la dinámica de la expresión de SM/C2.6, un marcador de superficie vinculado al potencial de autorrenovación de las poblaciones mencionadas anteriormente.
- Descubrir que células mesoangioblasticas de ratón derivadas de iPSC son capaces de generar miofibras derivadas del donante tras su trasplante en ratones distróficos, así como dar lugar a poblaciones de células mononucleares SM/C2.6<sup>+</sup> y SM/C2.6<sup>-</sup>, de manera similar a sus homólogos primarios/nativos.

## B.3. Caracterización de mesoangioblastos musculares corregidos con HAC y derivados de células iPS de pacientes con DMD

Después de la transducción con HAC analizamos el potencial proliferativo de los progenitores miogénicos humanos, incluyendo mioblastos y mesoangioblastos de pacientes con DMD (con y sin corrección genética), para determinar su capacidad de expansión clonal. Para ello usamos hTERT lentiviral escindible y cDNA del gen Bmi1 con el fin de extender la capacidad de proliferación de las células humanas, permitiendo la transferencia de DYS-HACs en mioblastos derivados de células satélite DMD y mesoangioblastos derivados de pericitos. Las células inmortalizadas y corregidas genéticamente de manera reversible mantuvieron un cariotipo estable y no sufrieron transformación tumorigénica. Las células humanas mantuvieron su capacidad miogénica *in vitro*, y se injertaron y diferenciaron correctamente tras su trasplante en el músculo esquelético murino. Finalmente, también hemos explorado una estrategia alternativa injertando progenitores musculares humanos, con el objetivo de trasladarla en el futuro a células genéticamente corregidas (por ejemplo, con DYS-HAC).

Hemos probado las capacidades de injertarse y diferenciarse de mioblastos humanos en los músculos del ratón distrófico después del tratamiento con Dll4 (un activador de señalización de Notch) y PDGF-BB, que induce propiedades de MAB en mioblastos de

ratón, incluida la capacidad migratoria mejorada, preservando su capacidad miogénica. Al contrario que en los experimentos con células de ratón, en células humanas no observamos un aumento en la expresión de hLamin A/C+hSpectrin+ en respuesta al tratamiento con Dll4 y PDGF-BB. Desafortunadamente, solo una de las poblaciones trasplantadas pudo cuantificarse, ya que la expansión *in vitro* de la otra población tuvo un impacto negativo en su capacidad de diferenciación. Además, los SCs/mioblastos humanos mostraron heterogeneidad en la respuesta al tratamiento, probablemente debido a la variabilidad genética intrínseca entre poblaciones no isogénicas.

El trabajo futuro en este aspecto se centrará en la prueba sistemática de este fenómeno *in vivo* utilizando células no expandidas de biopsias humanas y con progenitores miogénicos derivados de células iPS. En este contexto, también hemos validado protocolos usando moléculas de pequeño tamaño libres de transgénicos para inducir progenitores miogénicos humanos a partir de células iPS que podrían ser susceptibles de corrección genética y del tratamiento promigración con Dll4 y PDGF-BB mencionado anteriormente. Específicamente, ya hemos probado un protocolo publicado por Caron *et al.* (*Stem Cells Transl Med*, 2016) y hemos validado su eficacia en la generación de progenitores miogénicos y miotubos diferenciados de forma terminal.

C) Modificación del tejido alterado en el receptor para mejorar las terapias celulares  
Postulamos que una respuesta inmune de tipo Th2 exacerbada favorece la progresión de la distrofia muscular, y se correlaciona con el desarrollo de fibrosis. Hemos propuesto que la modificación de las señales dependientes de una respuesta tipo Th2 durante la regeneración muscular conduciría a un fenotipo inflamatorio alterado que afectará el desarrollo de la fibrosis, particularmente en el contexto de la distrofia muscular. Para ello hemos utilizado varios modelos de ratón explorando en detalle las modificaciones de las células inflamatorias que pueden influir en la regeneración y en el fenotipo fibrótico.

En este contexto hemos hecho lo siguiente:

- Establecer un ensayo estándar para identificar y aislar diferentes poblaciones de células inflamatorias en músculos regeneradores de ratón. Este protocolo permite la distinción de monocitos proinflamatorios (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Ly6C alto MHC2<sup>-</sup>) y dos



poblaciones de macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Ly6C bajo MHC2 alto y CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Ly6C bajo MHC2 bajo).

- Describir la cinética de estas poblaciones inflamatorias durante el curso de la regeneración y en los músculos de ratones mdx distróficos en diferentes etapas de la enfermedad.
- Caracterizar el perfil inflamatorio de las diferentes poblaciones celulares en términos de su patrón de expresión de citoquinas en la regeneración muscular.
- Explorar los efectos de la ausencia de una citoquina prototípica de una respuesta tipo Th2 durante la regeneración muscular y en el contexto de la distrofia muscular.
- Analizar cómo las modificaciones del equilibrio Th1/Th2, modificando la señalización de IL-6, influyen en la regeneración muscular. Sorprendentemente, hemos encontrado que los progenitores fibroadipogénicos no solo son responsables de la presencia de fibrosis en la distrofia muscular, sino que también se requiere su producción de IL-6 para la adecuada actividad proliferativa de las células madre musculares y la correcta regeneración muscular. La señalización de tipo trans de IL-6 predomina sobre las señales clásicas de IL-6 durante la regeneración.
- Investigar los efectos de varios compuestos para disminuir la fibrosis en los músculos esqueléticos.

Respecto a este último punto, hemos utilizado imatinib, entre otros. Es un inhibidor de la tirosina quinasa que actúa sobre PDGFR $\alpha$ , un importante receptor de membrana que controla la actividad fibrogénica de las células progenitoras fibro/adipogénicas mesenquimales (FAP). A pesar de una reducción en el número de FAP en la regeneración, también detectamos una reducción general en el número de células inflamatorias, que afectó a los macrófagos. Y más importante aún: los efectos negativos del tratamiento fueron evidentes por una reducción del número total de células satélite y específicamente en su fracción proliferante. Debido a estas acciones perjudiciales sobre la capacidad regenerativa del músculo, decidimos probar tratamientos alternativos, como la proteína Wnt7a como posible compuesto antifibrótico para la distrofia muscular.

Los estudios *in vitro* muestran que Wnt7a modula la respuesta inmune de los macrófagos afectando negativamente a la expresión de los genes pro- y antiinflamatorios. *In vivo*, el tratamiento con Wnt7a en ratones indujo una reducción de macrófagos proinflamatorios el tercer día después de la lesión y más macrófagos

antiinflamatorios. En estos experimentos se observó una pequeña tendencia de Wnt7a reducir el número de FAP. Cuando se trataron ratones mdx distróficos con este compuesto, no se detectaron diferencias significativas en el tamaño de las miofibras o en la extensión de la fibrosis, lo que indica que no hay un impacto importante del tratamiento ni en la progresión de la enfermedad ni en la capacidad regenerativa de músculo. Para caracterizar con más detalle los efectos de este medicamento a nivel celular, aislamos macrófagos, células satélite y FAP de músculos tratados con vehículo y Wnt7a y analizamos la expresión de citoquinas pro- y antiinflamatorias y marcadores fibróticos; sin embargo, no encontramos diferencias significativas para las moléculas analizadas.

Finalmente, hemos explorado la función antifibrótica de la inhibición sistémica de miR-21 *in vivo* en ratones distróficos, con el objetivo de usarla como tratamiento paliativo o combinado con otras terapias para la DMD, en base a nuestros resultados positivos previos obtenidos por su administración local. Se trataron sistémicamente durante dos meses con control e inhibidor específico de miR-21 distintos grupos de ratones DBA-mdx de 12 meses de edad que ya habían desarrollado fibrosis prominente. A pesar de una reducción de los niveles endógenos de miR-21 similar a los niveles de ratones no distróficos, no se encontraron efectos positivos. Estos resultados demuestran que la inhibición sistémica eficiente de miR-21 en ratones distróficos con inhibidor de LNA no mejora la degeneración muscular ni el depósito de fibrosis a esta edad en el modelo de ratón DBA-mdx.

### **3. Relevancia e implicaciones futuras**

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la forma más común y grave, y afecta aproximadamente a 1 de cada 3.500 varones recién nacidos, que tienen una esperanza de vida de 25 años. La DMD conduce a una continua debilidad muscular y degeneración progresiva. Finalmente, provoca el deceso de los individuos afectados debido a insuficiencia respiratoria o cardíaca. La DMD está causada por mutaciones en el gen *DMD*, que codifica la proteína distrofina, que une el citoesqueleto de actina a la matriz extracelular en las fibras musculares. La ausencia de distrofina produce inestabilidad constitutiva de la membrana y muerte de las células musculares. Las fibras musculares dañadas sufren ciclos repetidos de necrosis segmentaria, degeneración y regeneración

posterior, durante los que las células madre musculares (células satélite) se activan para regenerar las fibras musculares. Sin embargo, en los músculos enfermos el proceso de regeneración es en gran medida ineficiente debido a la inflamación persistente y la sustitución crónica de las miofibras por células adiposas y tejido fibrótico afuncional. Durante décadas, los investigadores han intentado encontrar métodos de terapia efectivos, pero aún no existe una cura para los pacientes con DMD.

Parte de los resultados obtenidos con el desarrollo de este proyecto tienen aplicabilidad clínica directa e inmediata. Durante 15 años hemos llevado a cabo estudios preclínicos en tres modelos de ratones y en perros distróficos, que mostraron la seguridad y la eficacia de este protocolo. Seguidamente completamos un primer ensayo en pacientes, basado en la administración intraarterial repetida de mesoangioblastos de donantes HLA compatibles (de hermanos) en cinco pacientes con DMD. El ensayo demostró seguridad, pero una eficacia mínima; no obstante, en el paciente más joven se detectó distrofina derivada del donante en el rango detectado en ensayos con oligonucleótidos para el salto de exones. Las diferencias con los modelos preclínicos se debieron principalmente a la edad avanzada de los pacientes (elegidos por razones de seguridad), al tratamiento continuo con esteroides (que inhibe la adhesión de los mesoangioblastos al endotelio), a la menor dosis de células y a las diferencias posturales entre humanos y otros mamíferos. Por ello, el tratamiento solo en los músculos de las piernas no es suficiente para mantener la postura y la ambulación. Para alcanzar la eficacia clínica, estamos desarrollando una estrategia con tres enfoques: (a) implementar cada paso del trasplante, (b) realizar un ensayo de prueba de principio y (c) realizar un estudio farmacodinámico detallado de las células trasplantadas. Los resultados obtenidos representan el núcleo de la implementación del protocolo, ya que esperamos aumentar la producción de distrofina con esta estrategia experimental. Además, poseemos datos sobre la mejora de la unión de los mesoangioblastos al endotelio vascular en el músculo (financiados por el MRC) y sobre la mejora de la capacidad de atravesar los vasos sanguíneos. El ensayo clínico ha sido apoyado por el Wellcome Trust.

Nuestros datos proporcionan evidencia de la necesidad de múltiples enfoques sinérgicos para superar los obstáculos en el desarrollo de la transferencia de genes *ex vivo* en progenitores musculares humanos clínicamente relevantes para la DMD y su terapia celular. Al realizar un sólido trabajo de base en modelos de regeneración

muscular en ratón, hemos establecido las bases para usar progenitores musculares humanos de DMD corregidos genéticamente y mejorar su migración *in vivo*, así como derivarlos de las células iPS sin el uso de transgenes (lo que potencialmente podría causar mutagénesis de inserción). El trabajo futuro se centrará en la traducción de los hallazgos de este proyecto, que combina la corrección genética DYS-HAC, la inmortalización reversible (cuando se utilizan células primarias), los progenitores miogénicos derivados de células iPS de manera segura y el tratamiento para mejorar la migración celular, tanto local como sistémicamente.

Finalmente, nuestros resultados indican claramente que la modulación del equilibrio Th1/Th2 durante la regeneración y en la distrofia muscular afecta el curso de la enfermedad y la presencia de fibrosis. Hemos intentado modular farmacológicamente la acumulación de fibrosis muscular con diferentes compuestos. En primer lugar se utilizó imatinib, un inhibidor de tirosina quinasa que afecta los FAP, responsables para el desarrollo de fibrosis. Este compuesto fue eficaz para reducir el número de FAP, pero también tuvo efectos indeseables al reducir el número de células madre, que participan directamente en la reconstitución de las fibras musculares maduras durante la regeneración. Además, los FAP también proporcionan algunos factores beneficiosos durante la regeneración. Como alternativa, probamos los efectos de Wnt7a y de la inhibición sistémica de miR-21, que han demostrado tener efectos beneficiosos en otros contextos. En ninguno de los dos casos encontramos efectos positivos significativos en las condiciones experimentales utilizadas. Como conclusión general de estos estudios, la exploración de los efectos de nuevos compuestos aún debe implementarse y deben establecerse las condiciones ideales para la reducción de la fibrosis que puedan facilitar la eficacia de las terapias génicas y mediante células en la distrofia muscular.

#### 4. Bibliografía

1. Galli F, Bragg L, Meggiolaro L, Rossi M, Caffarini M, Santoleri S, Cossu G. *Gene and cell and therapy for muscular dystrophies: are we getting there?* **Human Gene Ther.** 2018, 29(10):1098-1105.

- 2.** Aldeiri B, Roostalu U, Albertini A, Behnsen J, Wong J, Morabito A, Cossu G.  
*Abrogation of TGF-beta signalling in TAGLN expressing cells recapitulates Pentalogy of Cantrell in the mouse.*  
**Scientific Reports**, 2018, 8, 3658.
- 3.** Roostalu U, Aldeiri B, Albertini A, Humphreys N, Simonsen-Jackson M, Wong JKF, Cossu G.  
*Distinct cellular mechanisms underlie smooth muscle turnover in vascular development and repair.*  
**Circulation Res.** 2018, 122:267-281.
- 4.** Benedetti S, Hoshiya H, Uno N, Ragazzi M, Ferrari G, Kazuki Y, Moyle LA, Tonlorenzi R, Lombardo A, Chaouch S, Mouly V, Moore M, Popplewell L, Kazuki K, Katoh M, Naldini L, Dickson G, Messina G, Oshimura M, Cossu G, Tedesco FS.  
*Reversible Immortalisation Enables Genetic Correction and Engineering of Next-Generation Human Artificial Chromosomes for Duchenne Muscular Dystrophy.*  
**EMBO Mol Med**, 2018, 10:254-275.
- 5.** Cossu G, Birchall M, Brown T, De Coppi P, Culme-Seymour E, Gibbon S, Hitchcock J, Mason C, Montgomery J, Morris S, Muntoni F, Napier D, Nazanin O, Prasad A, Round J, Saprai P, Stilgoe J, Thrasher A, Wilson J. *Lancet Commission: Stem Cells and Regenerative Medicine.*  
**The Lancet**, 2018, 391:883-910.
- 6.** Moreno-Fortuny A, Bragg L, Albertini A, Humphreys N, Simonsen-Jackson M, Cossu G, Roostalu U.  
*MCAM controls metabolic balance in cartilage regeneration and cell polarity in primary chondrogenic and myogenic differentiation.*  
**Open Biology**, 2017, 6:1592-1601.
- 7.** Aldeiri B, Roostalu U, Albertini A, Wong J, Morabito A, Cossu G.  
*Transgelin expressing myofibroblasts orchestrate ventral midline closure through TGF- $\beta$  signalling.*  
**Development**, 2017, 144:3336-3348.

- 8.** Serena E, Zatti S, Zoso A, Lo Verso F, Tedesco FS, Cossu G, Elvassore N.  
*Skeletal muscle differentiation on a chip shows human donor mesoangioblasts efficiency in restoring dystrophin in a DMD model.*  
**Stem Cell Transl. Med**, 2016, 5, 1-8. Cited 7, IF: 4.9.
- 9.** Maffioletti SM, Sarcar S, Henderson ABH, Mannhardt I, Pinton L, Moyle LA, Steele-Stallard H, Cappellari O, Wells KE, Ferrari G, Mitchell JS, Tyzack GE, Kotiadis VN, Khedr M, Ragazzi M, Wang W, Duchen MR, Patani R, Zammit P, Wells D, Eschenhagen T, Tedesco FS.  
*Three-dimensional Human iPSC-derived Artificial Skeletal Muscles Model Muscular Dystrophies and Enable Multilineage Tissue Engineering.*  
**Cell Reports**, 2018 Apr 17;23(3):899-908. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.091.
- 10.** Tedesco FS, Moyle LA, Perdiguero E.  
"Muscle interstitial cells: a brief field guide to non-satellite cell populations in skeletal muscle."  
En: *Muscle Stem Cells Methods and Protocols*, capítulo 7. Humana Press / Springer Nature, anexo a **Methods in Molecular Biology**, 2017;1556:129-147. doi: 10.1007/978-1-4939-6771-1\_7.
- 11.** Guerra J, Ferrer B, Giralt M, Comes G, Carrasco J, Molinero A, Serrano AL, Hidalgo J.  
*Muscular interleukin-6 differentially regulates skeletal muscle adaptation to high-fat diet in a sex-dependent manner.*  
**Cytokine**, 2015 Jul;74(1):145-51.
- 12.** Pessina P, Kharraz Y, Jardí M, Fukada S, Serrano AL, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P.  
*Fibrogenic Cell Plasticity Blunts Tissue Regeneration and Aggravates Muscular Dystrophy.*  
**Stem Cell Reports**, 2015 Jun 9;4(6):1046-60.
- 13.** Sousa-Victor P, García-Prat L, Serrano AL, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P.  
*Muscle stem cell aging: regulation and rejuvenation.*  
**Trends Endocrinol Metab**. 2015 Jun;26(6):287-96.

- 14.** Aso E, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P, Ferrer I.  
*Fibrinogen-Derived  $\gamma$ 377-395 Peptide Improves Cognitive Performance and Reduces Amyloid- $\beta$  Deposition, without altering Inflammation, in A $\beta$ PP/PS1 Mice.*  
**J Alzheimers Dis.** 2015;47(2):403-12.
- 15.** Sebastián D, Sorianello E, Segalés J, Irazoki A, Ruiz-Bonilla V, Sala D, Planet E, Berenguer-Llargo A, Muñoz JP, Sánchez-Feutrie M, Plana N, Hernández-Álvarez MI, Serrano AL, Palacín M, Zorzano A.  
*Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway.*  
**EMBO J**, 2016 Aug 1;35(15):1677-93.
- 16.** García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, Ortet L, Rodríguez-Ubreva J, Rebollo E, Ruiz-Bonilla V, Gutarra S, Ballestar E, Serrano AL, Sandri M, Muñoz-Cánoves P.  
*Autophagy maintains stemness by preventing senescence.*  
**Nature**, 2016 Jan 7;529(7584):37-42.
- 17.** Serrano AL, Muñoz-Cánoves P.  
*Fibrosis development in early-onset muscular dystrophies: Mechanisms and translational implications.*  
Semin Cell Dev Biol. 2017.
- 18.** Bengal E, Perdiguero E, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P.  
*Rejuvenating stem cells to restore muscle regeneration in aging.*  
**F1000Res.** 2017 Jan 25;6:76.
- 19.** Testoni G, Duran J, García-Rocha M, Vilaplana F, Serrano AL, Sebastián D, López-Soldado I, Sullivan MA, Slebe F, Vilaseca M, Muñoz-Cánoves P, Guinovart JJ.  
*Lack of Glycogenin Causes Glycogen Accumulation and Muscle Function Impairment.*  
**Cell Metab.** 2017 Jul 5;26(1):256-266.