



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



NOVES TERÀPIES AMB CÈL·LULES MARE PER A LA DISTRÒFIA 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. Resum del projecte

La distròfia muscular es un grup heterogeni de trastorns neuromusculars degeneratius hereditaris caracteritzats per la debilitat progressiva dels músculs esquelètics i, en alguns casos, del múscul cardíac. Les distròfies musculars condueixen a la pèrdua de la motilitat i, en les formes més greus, a la paràlisi progressiva i la necessitat de ventilació assistida. La distròfia muscular de Duchenne (DMD) és la forma més comuna i greu, afecta 1 de cada 3.500 nounats de sexe masculí i causa la mort entre l'adolescència i la dècada dels 20 anys. La DMD està originada per mutacions en el gen de la distrofina (*DMD*), que codifica la proteïna distrofina, que uneix el citoesquelet d'actina a la matriu extracel·lular en les fibres musculars. L'absència de distrofina produeix inestabilitat de la membrana i mort de les cèl·lules musculars. Les fibres musculars danyades pateixen cicles repetits de necrosi segmentària, degeneració i regeneració subsegüent, durant els quals les cèl·lules mare musculars, anomenades *cèl·lules satèl·lit*, s'activen per regenerar les fibres musculars. No obstant això, el procés de regeneració és en gran mesura ineficient a causa de la inflamació persistent i de la substitució de les miofibres per cèl·lules adiposes i teixit fibròtic afuncional. L'assistència mèdica millorada ha augmentat l'esperança de vida dels pacients, però encara no hi ha una teràpia eficaç i els esteroides són l'únic tractament pal·liatiu disponible.

Les teràpies cel·lulars, en les quals, per evitar la immunosupressió, les cèl·lules autòlogues amb un gen de distrofina funcional es trasplanten per tractar la distròfia muscular, han guanyat una atenció creixent en els últims anys. La hipòtesi d'aquest projecte implica que una estratègia de teràpia cel·lular fructífera per combatre la distròfia muscular requereix, almenys:

1. El rescat eficient del defecte primari en les cèl·lules mutades.
2. La possibilitat d'obtenir fàcilment el nombre suficient de cèl·lules per al trasplantament.
3. Un empelt eficient de les cèl·lules en el teixit de l'hoste malalt.

Els nostres objectius sinèrgics són els següents:

a) Optimitzar estratègies per obtenir cèl·lules de ratolí i humanes corregides genèticament de ratolins distròfics i pacients amb DMD, respectivament.

Investigarem la capacitat d'aquestes cèl·lules per produir distrofina de manera eficient, amplificar-les *ex vivo* per obtenir el nombre necessari de cèl·lules i d'autorenovar-se *in vivo* per proporcionar una teràpia de llarga durada.

b) Millorar l'eficiència de les teràpies cel·lulars modificant l'ambient cel·lular alterat en el receptor malalt. La presència d'inflamació crònica i el dipòsit excessiu de matriu extracel·lular (fibrosi) en els músculs distròfics representen actualment un obstacle important per a l'empelt reeixit de les cèl·lules trasplantades. La migració de les cèl·lules a les àrees danyades, la seva supervivència i autorenovació es veuen greument obstaculitzades per les seves interaccions amb els components cel·lulars i de la matriu extracel·lular alterats del teixit diana. El nostre objectiu és interferir en la inflamació i la fibrosi com un pas necessari per a l'èxit de les teràpies cel·lulars en la distròfia muscular.

2. Resultats

A) Optimització d'estratègies per obtenir cèl·lules de ratolí i humanes distròfiques corregides genèticament

Hem provat la hipòtesi que una minoria de cèl·lules corregides genèticament, capaces de produir distrofina, es fusionaran amb un excés de cèl·lules DMD mutades (que no produeixen distrofina). Els nuclis corregits produiran l'ARN nuclear petit (snRNA) U7, que permet el salt de l'exó mutat, i també entrarà en els nuclis propers durant la fusió miogènica que es produeix en la regeneració; així amplificarà l'efecte terapèutic de les cèl·lules corregides.

Identificació de línies cel·lulars adequades. Inicialment vam obtenir cèl·lules miogèniques primàries dels bancs cel·lulars d'UCL i Newcastle amb una mutació saltable de l'exó 51. La transducció amb U7 snRNA va induir el salt de l'exó 51 i la producció d'una forma truncada de distrofina. No obstant això, l'escassa fusió cel·lular va impedir la propagació de l'snRNA als nuclis veïns i va excloure la investigació del possible efecte de transcorrecció dels nuclis propers que no expressaven la distrofina.

També hem utilitzat línies de mioblasts distròfics immortalitzats amb una mutació de l'exó 51 (donats pel Dr. V. Mouly, Institut de Myologie, París). En barrejar les cèl·lules transduïdes amb un excés de miòcits DMD immortalitzats no corregits en proporcions que imiten un trasplantament, entre un 3% i un 10% de cèl·lules (similar als nivells observables després del trasplantament *in vivo* amb un protocol optimitzat i començant a una edat primerenca en pacients), es van generar miotubs híbrids amb alts nivells d'ARN de distrofina.

Aquests resultats evidencien que es pot induir l'expressió de distrofina a un nivell més alt del que s'espera obtenir directament a través de la inducció del salt de l'exó. Seguidament, hem aplicat aquest enfocament experimental a línies de cèl·lules iPS amb mutacions de l'exó 51 (en col·laboració amb el Dr. K. Anastassiadis, Universitat de Dresden). Tot i aconseguir una correcció eficient, aquestes línies cel·lulars es van diferenciar en miòcits mononucleats o binucleats, cosa que va tornar a impedir la detecció d'un possible efecte de transcorrecció. Per resoldre aquest problema, hem fet servir fibroblasts de la pell de pacients amb DMD (proporcionats pel Dr. Y. Torrente, de la Universitat de Milà). Aquestes cèl·lules es van transformar en cèl·lules miogèniques per l'expressió induïble del factor MyoD-ER després de l'exposició al tamoxifè. En ambdues línies cel·lulars la mutació es va corregir de manera eficient però només van formar petits miotubs. Tot i això, les cèl·lules es van emprar com a eines de correcció en experiments posteriors.

Més endavant, vam emprar una línia cel·lular miogènica immortalitzada (amb telomerasa i CDK4), provinent del laboratori del Dr. V. Mouly, que formava miotubs multinucleats de grans dimensions amb facilitat. Aquesta línia es va usar com a receptora de cèl·lules miogèniques DMD en cocultius amb una minoria (dilució 1:10 o 1:30) de cèl·lules WT o DMD (mioblasts immortalitzats de la mateixa línia, derivats d'iPS, DMD corregits genèticament, cèl·lules miogèniques o fibroblasts DMD), també corregits genèticament. Vam detectar que l'acumulació d'ARNm de distrofina en els cocultius va assolir valors del 55% i el 28% respectivament, fet que demostra que la síntesi de distrofina també es va produir en altres nuclis diferents dels transduïts directament.

Els nivells de la proteïna distrofina es van analitzar per immunofluorescència i WB. Tot i que les cèl·lules DMD corregides genèticament expressen només un 60% del nivell de

les WT, la seva expressió es manté gairebé constant després d'una dilució progressiva, amb nivells de proteïna observables superiors al 30% del WT, valor que representa el llindar del rang terapèutic per a la distrofina. Es van obtenir resultats reeixits similars amb cèl·lules derivades d'IPS, cèl·lules miogèniques DMD o fibroblasts DMD convertits amb MyoD, tots dos transduïts amb el mateix vector lentiviral.

Per poder implementar aquests experiments, hem desenvolupat un sistema amb condicions de cultiu optimitzades, usant una doble capa de matrigel que va permetre una bona maduració dels miotubs. D'altra banda, les cèl·lules van ser innervades fàcilment per neurones motores formades després de l'addició de fragments de medul·la espinal embrionària de ratolí, que inesperadament van induir contraccions dels cultius.

Finalment, vam provar l'eficiència de la nostra estratègia *in vivo*. Per això, es van fer implants de matrigel amb cèl·lules miogèniques humanes en ratolins immunodeficients (SCID/bg). Aquesta estratègia permet dosificar correctament la proporció de cèl·lules corregides. Els implants cel·lulars es van fer per via subcutània a l'abdomen dels ratolins i es van analitzar al cap d'un mes. Els resultats indiquen la formació eficient de feixos de fibres musculars madures amb una expressió de distrofina elevada, comparable a la quantitat sintetitzada per les fibres musculars derivades de cèl·lules amb una correcció total de la mutació. Aquest efecte probablement es deu al major nombre de nuclis que conté una fibra muscular madura en comparació amb un miotub. Preveiem una translació clínica immediata i la validació en pacients en els dos propers anys.

Objectius específics assolits

- Producció i validació de vectors lentivirals.
- Transducció de línies primàries, IPS i cèl·lules miogèniques humanes immortalitzades.
- Detecció de la producció de distrofina per la tècnica del salt de l'exó mitjançant RT-PCR, IF i WB i la seva producció millorada en cocultius de cèl·lules distròfiques corregides i no corregides.
- Desenvolupament de sistemes de cultiu *in vitro* optimitzats per miotubs corregits madurs.
- Correcció eficient de la mutació de distrofina i producció de nivells terapèutics de distrofina en un model de ratolí *in vivo*.

B) Avaluació del potencial d'autorenovació dels mesoangioblasts WT de ratolí i corregits amb un cromosoma artificial humà (HAC)

Els mesoangioblasts (MAB) són cèl·lules mare/progenitores associats a vasos sanguinis capaços de diferenciar-se en múscul esquelètic. Els MAB poden migrar a través de la paret dels vasos sanguinis, fet que permet la seva aplicació terapèutica per via intraarterial per als trastorns neuromusculars. El nostre treball respon a tres preguntes importants:

B.1) Les "cèl·lules mare" musculars derivades dels MAB són capaces de participar en múltiples rondes de regeneració i d'autorenovar-se?

B.2) Es manté aquesta propietat en MAB corregits genèticament?

B.3) És vàlida aquesta afirmació en MAB humans?

B.1. Capacitat d'autorenovació dels MAB

Per respondre a aquesta pregunta, es van trasplantar MAB-GFP⁺ de ratolins donants en ratolins SCID/mdx. Un mes més tard, vam detectar la presència de cèl·lules GFP⁺ i miofibres distrofina positives en els ratolins receptors. D'aquests animals hem aïllat cèl·lules satèl·lit derivades de MAB (GFP⁺/SM/C-2.6⁺) per a experiments de trasplantament addicionals. La capacitat d'autorenovació de les cèl·lules donants es va determinar en assajos clonogènics i retrasplantant-les en ratolins SCID/mdx. Els nostres resultats demostren que MAB ampliat clonalment que havien entrat en el compartiment de les cèl·lules satèl·lit eren capaços de regenerar amb èxit el múscul distròfic.

Seguidament, hem examinat la capacitat d'autorenovació *in vivo* de MAB mdx corregits genèticament amb la inserció d'un cromosoma artificial humà que conté el locus complet de la distrofina (DYS-HAC) després de diversos trasplantaments realitzats seqüencialment. Els músculs trasplantats van mostrar la presència de miofibres positives per distrofina, cosa que indica que MBA mdx corregits genèticament amb DHS-HAC poden ser expandits clonalment i empeltar amb èxit en múscul distròfic després de diversos cicles d'autorenovació. Cèl·lules satèl·lit provinents de MAB DHS-HAC poden ser trasplantades seqüencialment durant almenys 4 rondes i la capacitat clonogènica d'aquestes cèl·lules no es va alterar després de diversos cicles de trasplantament.

B.2. Validació amb mesoangioblasts de ratolí aïllats en fresc i derivats de cèl·lules iPS

Mitjançant trasplantaments de MAB primaris acabats d'aïllar, hem aconseguit el següent:

- Generar colònies de ratolins CreERT2 amb fosfatasa alcalina sense especificitat tissular (TNAP) i línies reporteres de ratolins Rosa26-YFP i Rosa26-tdTomato induïbles per Cre. Aquests ratolins permeten l'aïllament en fresc de perícits miogènics per generar miofibres derivades del ratolí donant i cèl·lules amb marcadors específics de cèl·lules mare en ratolins hostes després d'experiments de trasplantament.
- Caracteritzar la dinàmica de l'expressió de SM/C2.6, un marcador de superfície vinculat al potencial d'autorenovació de les poblacions esmentades anteriorment.
- Descobrir que cèl·lules mesoangioblàstiques de ratolí derivades d'iPSC són capaces de generar miofibres derivades del donant després del trasplantament en ratolins distròfics, així com donar lloc a poblacions de cèl·lules mononuclears SM/C2.6⁺ i SM/C2.6⁻, de manera similar als seus homòlegs primaris/natius.

B.3. Caracterització de mesoangioblasts musculars corregits amb HAC i derivats de cèl·lules iPS de pacients amb DMD

Després de la transducció amb HAC, hem analitzat el potencial proliferatiu dels progenitors miogènics humans, incloent mioblasts i mesoangioblasts de pacients amb DMD (amb i sense correcció genètica), per determinar la seva capacitat d'expansió clonal. Per a això hem fet servir hTERT lentiviral escindible i cDNA del gen Bmi1 amb l'objectiu d'estendre la capacitat de proliferació de les cèl·lules humanes, fet que ha permès la transferència de DYS-HACs en mioblasts derivats de cèl·lules satèl·lit DMD i mesoangioblasts derivats de perícits. Les cèl·lules immortalitzades i corregides genèticament de manera reversible van mantenir un cariotip estable i no van patir transformació tumorigènica. Les cèl·lules humanes van mantenir la seva capacitat miogènica *in vitro*, i es van empeltar i es van diferenciar correctament després del trasplantament en el múscul esquelètic murí. Finalment, també hem explorat una estratègia alternativa empeltant progenitors musculars humans, amb l'objectiu de traslladar-la en el futur a cèl·lules genèticament corregides (per exemple, amb DYS-HAC).

Hem provat les capacitats d'empeltar-se i diferenciar-se de mioblasts humans en els músculs del ratolí distròfic després del tractament amb Dll4 (un activador de

senyalització de Notch) i PDGF-BB, que indueix propietats de MAB en mioblasts de ratolí, inclosa la capacitat migratòria millorada, i en preserva la capacitat miogènica. Al contrari que en els experiments amb cèl·lules de ratolí, en cèl·lules humanes no observem un augment en l'expressió d'hLamin A/C+; hSpectrin+ en resposta al tractament amb Dll4 i PDGF-BB. Malauradament, només una de les poblacions trasplantades es va poder quantificar, ja que l'expansió *in vitro* de l'altra població va tenir un impacte negatiu en la seva capacitat de diferenciació. A més, els SCS/mioblasts humans van mostrar heterogeneïtat en la resposta al tractament, probablement a causa de la variabilitat genètica intrínseca entre poblacions no isogèniques.

El treball futur en aquest aspecte se centrarà en la prova sistemàtica d'aquest fenomen *in vivo* utilitzant cèl·lules no expandides de biòpsies humanes i amb progenitors miogènics derivats de cèl·lules iPS. En aquest context, també hem validat protocols emprant petites molècules lliures de transgènics per induir progenitors miogènics humans a partir de cèl·lules iPS que podrien ser susceptibles de correcció genètica i del tractament promigració amb Dll4 i PDGF-BB esmentat anteriorment. Específicament, ja hem provat un protocol publicat per Caron *et al.* (*Stem cells Transl Med*, 2016) i hem validat la seva eficàcia en la generació de progenitors miogènics i miotubs diferenciats de forma terminal.

C) Modificació del teixit alterat en el receptor per millorar les teràpies cel·lulars

Postulem que una resposta immune de tipus Th2 exacerbada afavoreix la progressió de la distròfia muscular, fet que es correlaciona amb el desenvolupament de fibrosi. Hem proposat que la modificació dels senyals dependents d'una resposta tipus Th2 durant la regeneració muscular condueix a un fenotip inflamatori alterat que afectarà el desenvolupament de la fibrosi, particularment en el context de la distròfia muscular. Per a això hem utilitzat diversos models de ratolí i hem explorat en detall les modificacions de les cèl·lules inflamatòries que poden influir en la regeneració i en el fenotip fibròtic.

En aquest context hem fet el següent:

- Establir un assaig estàndard per identificar i aïllar diferents poblacions de cèl·lules inflammatòries en músculs regeneradors de ratolí. Aquest protocol permet la distinció de monòcits proinflamatoris (CD11b⁺ F4/80⁺ Ly6C alt MHC2⁻) i dues poblacions de macròfags (CD11b⁺ F4/80⁺ Ly6C baix MHC2 alt i CD11b⁺ F4/80⁺ Ly6C baix MHC2 baix).
- Descriure la cinètica d'aquestes poblacions inflammatòries durant el curs de la regeneració i en els músculs de ratolins mdx distròfics en diferents etapes de la malaltia.
- Caracteritzar el perfil inflamatori de les diferents poblacions cel·lulars en termes del seu patró d'expressió de citocines en la regeneració muscular.
- Explorar els efectes de l'absència d'una citocina prototípica d'una resposta tipus Th2 durant la regeneració muscular i en el context de la distròfia muscular.
- Analitzar com les modificacions de l'equilibri Th1/Th2, amb la modificació de la senyalització d'IL-6, influeixen en la regeneració muscular. Sorprenentment, hem trobat que els progenitors fibroadipogènics no només són responsables de la presència de fibrosi en la distròfia muscular, sinó que també es requereix la seva producció d'IL-6 per a una activitat proliferativa adequada de les cèl·lules mare musculars i una regeneració muscular correcta. La senyalització de tipus trans d'IL-6 predomina sobre els senyals clàssics d'IL-6 durant la regeneració muscular.
- Investigar els efectes de diversos compostos per disminuir la fibrosi en els músculs esquelètics.

Respecte a aquest últim punt, hem utilitzat imatinib, entre d'altres. Es tracta d'un inhibidor de la tirosina quinasa que actua sobre PDGFR α , un important receptor de membrana que controla l'activitat fibrogènica de les cèl·lules progenitores fibro/adipogèniques mesenquimals (FAP). Malgrat una reducció en el nombre de FAP en la regeneració, també vam detectar una reducció general en el nombre de cèl·lules inflammatòries, cosa que va afectar els macròfags. I més important encara: els efectes negatius del tractament van ser evidents per una reducció del nombre total de cèl·lules satèl·lit i específicament en la seva fracció proliferant. A causa d'aquestes accions

perjudicials sobre la capacitat regenerativa del múscul, vam decidir provar tractaments alternatius, com la proteïna Wnt7a com un possible compost antifibròtic per a la distròfia muscular.

Els estudis *in vitro* mostren que Wnt7a modula la resposta immune dels macròfags i afecta negativament l'expressió dels gens pro- i antiinflamatoris. *In vivo*, el tractament amb Wnt7a en ratolins va induir a una reducció de macròfags proinflamatoris el tercer dia després de la lesió i més macròfags antiinflamatoris. En aquests experiments, es va observar una petita tendència de Wnt7a reduir el nombre de FAP. Quan es van tractar ratolins mdx distròfics amb aquest compost, no es van detectar diferències significatives en la mida de les miofibres o en l'extensió de la fibrosi, fet que indica que no hi ha un impacte important del tractament ni en la progressió de la malaltia ni en la capacitat regenerativa del múscul. Per caracteritzar amb més detall l'efecte d'aquest medicament a escala cel·lular, hem aïllat macròfags, cèl·lules satèl·lit i FAP de músculs tractats amb vehicle i Wnt7a i hem analitzat l'expressió de citocines pro- i antiinflamatòries i marcadors fibròtics, però no hem trobat diferències significatives per a les molècules analitzades.

Finalment, hem explorat la funció antifibròtica de la inhibició sistèmica de miR-21 *in vivo* en ratolins distròfics, amb l'objectiu d'usar-la com a tractament pal·liatiu o combinada amb altres teràpies per a la DMD, a partir dels nostres resultats positius previs obtinguts per la seva administració local. Es van tractar sistèmicament durant dos mesos, amb control i inhibidor específic de miR-21, diferents grups de ratolins DBA-mdx de 12 mesos que ja havien desenvolupat fibrosi prominent. Malgrat una reducció dels nivells endògens de miR-21 similar als dels nivells de ratolins no distròfics, no es van trobar efectes positius. Aquests resultats demostren que la inhibició sistèmica eficient de miR-21 en ratolins distròfics amb inhibidor d'LNA no millora la degeneració muscular ni la fibrosi en aquesta edat en el model de ratolí DBA-mdx.

3. Rellevància i implicacions futures

La distròfia muscular de Duchenne (DMD) és la forma més comuna i greu, i afecta aproximadament 1 de cada 3.500 nounats de sexe masculí, que tenen una esperança de vida de 25 anys. La DMD condueix a una debilitat muscular contínua i a una degeneració progressiva. Finalment, provoca el decés dels individus afectats a causa d'insuficiència respiratòria o cardíaca. La DMD està causada per mutacions en el gen *DMD*, que codifica la proteïna distrofina que uneix el citoesquelet d'actina a la matriu extracel·lular en les fibres musculars. L'absència de distrofina produeix inestabilitat constitutiva de la membrana i la mort de les cèl·lules musculars. Les fibres musculars danyades pateixen cicles repetits de necrosi segmentària, degeneració i regeneració posterior, durant els quals les cèl·lules mare musculars (cèl·lules satèl·lit) s'activen per regenerar les fibres musculars. No obstant això, en els músculs malalts, el procés de regeneració és en gran mesura ineficient a causa de la inflamació persistent i la substitució crònica de les miofibres per cèl·lules adiposes i teixit fibròtic afuncional. Durant dècades, els investigadors han intentat trobar mètodes de teràpia efectius, però encara no hi ha una cura per als pacients amb DMD.

Part dels resultats obtinguts amb el desenvolupament d'aquest projecte tenen aplicabilitat clínica directa i immediata. Durant 15 anys hem dut a terme estudis preclínic en tres models de ratolins i en gossos distròfics, que van mostrar la seguretat i l'eficàcia d'aquest protocol. Seguidament, vam completar un primer assaig en pacients, basat en l'administració intraarterial repetida de mesoangioblasts de donants HLA compatibles (de germans) en cinc pacients amb DMD. L'assaig va demostrar seguretat, però una eficàcia mínima; ara bé, en el pacient més jove es va detectar distrofina derivada del donant en el rang detectat en assajos amb oligonucleòtids per al salt d'exons. Les diferències amb els models preclínic van ser a causa principalment de l'edat avançada dels pacients (elegits per raons de seguretat), del tractament continu amb esteroides (que inhibeix l'adhesió dels mesoangioblasts a l'endoteli), de la dosi inferior de cèl·lules i de les diferències posturals entre humans i altres mamífers. Per això, el tractament només en els músculs de les cames no és suficient per mantenir la postura i l'ambulació. Per assolir l'eficàcia clínica, estem desenvolupant una estratègia amb tres enfocaments: (a) implementar cada pas del trasplantament, (b) fer un assaig de prova de principi i (c) fer un estudi farmacodinàmic detallat de les cèl·lules trasplantades. Els resultats obtinguts són el

nucli de la implementació del protocol, ja que esperem augmentar la producció de distrofina amb aquesta estratègia experimental. A més, tenim dades sobre la millora de la unió dels mesoangioblasts a l'endoteli vascular en el múscul (finançats pel MRC) i sobre la millora de la capacitat de travessar els vasos sanguinis. L'assaig clínic ha rebut el suport de Wellcome Trust.

Les nostres dades proporcionen evidència de la necessitat de múltiples enfocaments sinèrgics per superar els obstacles en el desenvolupament de la transferència de gens *ex vivo* en progenitors musculars humans clínicament rellevants per a la DMD i la seva teràpia cel·lular. En realitzar un treball de base sòlid en models de regeneració muscular en ratolí, hem establert les bases per emprar progenitors musculars humans de DMD corregits genèticament i millorar la seva migració *in vivo*, així com derivar de les cèl·lules iPS sense l'ús de transgens (cosa que potencialment podria causar mutagènesi d'inserció). El treball futur se centrarà en la traducció de les troballes d'aquest projecte, que combina la correcció genètica *DYS-HAC*, la immortalització reversible (quan s'utilitzen cèl·lules primàries), els progenitors miogènics derivats de cèl·lules iPS de manera segura i el tractament per millorar la migració cel·lular, tant localment com sistèmicament.

Finalment, els nostres resultats indiquen clarament que la modulació de l'equilibri Th1/Th2 durant la regeneració i en la distròfia muscular afecta el curs de la malaltia i la presència de fibrosi. Hem intentat modular farmacològicament l'acumulació de fibrosi muscular amb diferents compostos. En primer lloc es va utilitzar imatinib, un inhibidor de tirosina quinasa que afecta els FAP, responsables en el desenvolupament de fibrosi. Aquest compost va ser eficaç per reduir el nombre de FAP, però també va tenir efectes indesitjables en reduir el nombre de cèl·lules mare, que participen directament en la reconstitució de les fibres musculars madures durant la regeneració. A més, els FAP també proporcionen alguns factors beneficiosos durant la regeneració. Com a alternativa, vam provar els efectes de Wnt7a i de la inhibició sistèmica de miR-21, que han demostrat tenir efectes beneficiosos en altres contextos. En cap dels dos casos no hem trobat efectes positius significatius en les condicions experimentals utilitzades. Com a conclusió general d'aquests estudis, l'exploració dels efectes de nous compostos encara s'ha d'implementar i s'han d'establir les condicions ideals per reduir la fibrosi que puguin facilitar l'eficàcia de les teràpies gèniques i mitjançant cèl·lules en la distròfia muscular.

4. Bibliografia

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- β 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."
A: *Muscle Stem Cells Methods and Protocols*, capítol 7. Humana Press / Springer Nature, annex 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 γ 377-395 Peptide Improves Cognitive Performance and Reduces Amyloid- β Deposition, without altering Inflammation, in A β 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.