



Fundació
La Marató de TV3

XVI SIMPOSIUM
Enfermedades minoritarias

Entender y combatir la progresión de la distrofia muscular de Duchenne en modelos animales

Dr. Eusebio Perdiguero Santamaria

Universitat Pompeu Fabra. Facultat Ciències Salut i Vida UPF



1. Resumen

La distrofia muscular de Duchenne (DMD), causada por defectos en el gen de la distrofina, es una enfermedad neuromuscular rara que afecta a 1/3.300 niños. Esta deficiencia resulta en la inflamación muscular, la necrosis y la fibrosis del tejido, de modo que los pacientes con DMD experimentan una pérdida grave y progresiva de la masa muscular y de la función del tejido, con resultado final de muerte. Las terapias con células madre musculares (células satélite) han fallado debido a la limitada proliferación y supervivencia de las células trasplantadas. Sin embargo, el trasplante de mesoangioblastos (células madre de origen mesodérmico vascular) ha dado resultados alentadores en ratones y perros (modelo preclínico de DMD). Cualquier enfoque terapéutico basado en células para el tratamiento de DMD requerirá la modificación del entorno fibrótico del anfitrión, debido a sus conocidos efectos negativos sobre la función de las células madre y su eficiencia de trasplante. Por lo tanto, la modificación de las propiedades de las células madre musculares y de los mesoangioblastos endógenos, combinada con la reducción de la fibrosis del tejido anfitrión, podría mejorar las terapias con trasplante de células madre en la DMD.

Antecedentes e hipótesis

Un regulador crítico de las funciones de las células madre musculares es la vía de p38 MAPK. Sin embargo, nunca se ha investigado si modificaciones de la actividad de p38 pueden influir en la regeneración muscular y el trasplante de células madre en el músculo distrófico. En el presente proyecto queremos utilizar modelos animales de ratón de DMD (ratones mdx) y los ratones modificados genéticamente deficientes en p38 α para investigar la función de esta cinasa en las células satélite y el comportamiento de las células inflamatorias durante la regeneración del músculo distrófico. Las células satélite y los mesoangioblastos derivados de los ratones de tipo salvaje (WT) y de los ratones deficientes en p38 α se trasplantarán en ratones inmunodeficientes (mdx tratados o no con agentes

antiinflamatorios/antifibróticos) y se analizará posteriormente su capacidad de injerto (*engraftment*) en el músculo distrófico.

Objetivos específicos

- Investigar los efectos de la deficiencia p38 α en la evolución de la patología en el músculo distrófico. Con este fin, se han generado modelos condicionales de ratón con supresión específica de p38 α en las células satélite, fibras musculares y macrófagos, que se han cruzado con los ratones mdx.
- Investigar comparativamente la capacidad de injerto de las células WT y de las células satélite deficientes en p38 α –que han demostrado poseer mayor capacidad de proliferación y supervivencia *in vitro*– tras el trasplante en modelos de ratones mdx inmunodeficientes (mdx/SCID).
- Estudiar la capacidad de injerto de células WT y deficientes en p38 α en modelos de ratones inmunodeficientes para la distrofia muscular.
- Investigar la influencia de un entorno de acogida optimizado (mediante tratamientos antiinflamatorios y antifibróticos), combinado con la supresión de p38 α específica en células satélite, en la mejora del potencial de injerto de estas células en los ratones distróficos.

2. Resultados

p38 α en la progresión de la distrofia en ratones mdx

Generación de ratones mdx/Pax7-CRE/p38 α (mdx/Mgn-CRE/p38a) y mdx/Lys-CRE/p38 α con doble mutación

Los ratones deficientes en p38 α son embrionarios letales (ADAMS *et al.*, 2000). Hemos generado ratones condicionales que carecen de p38 α en el músculo esquelético (Pax7) o en el compartimiento mieloide (Lys2) utilizando el sistema Cre/loxP (CLAUSEN *et al.*, 1999). Ratones p38 $\alpha^{\Delta Pax7}$, p38 $\alpha^{\Delta Myog}$ y p38 $\alpha^{\Delta LysM}$ nacieron con las esperadas ratios mendelianas y con duración de vida comparable a los de los ratones salvajes de la misma camada (p38 α^{WT}). Para analizar el papel de p38 α

en la regeneración del músculo mdx, ratones mdx se cruzaron con $p38\alpha^{\Delta Pax7}$ y ratones $p38\alpha^{\Delta LysM}$ respectivamente. Los ratones doble mutantes redujeron los niveles de $p38\alpha$ en todos los músculos esqueléticos analizados y también en el diafragma, pero no se observaron cambios en corazón, hígado o tejidos adiposos blancos (**figura 1A**). Para caracterizar ratones con doble mutación en el linaje mielóide hemos aislado macrófagos de ratones mdx y $mdx/p38\alpha^{\Delta LysM}$ con 3 meses de edad *in vivo* usando una conocida técnica FACS de cribado (PERDIGUERO *et al.*, 2011) (**figura 1B**) y hemos demostrado que los niveles de $p38\alpha$ fueron disminuidos en el compartimento mielóide, hasta el 90% (**figura 1C**). No hemos observado diferencias entre $mdx/p38\alpha^{\Delta Pax7}$ y $mdx/p38\alpha^{\Delta Myog}$ y por eso en los análisis posteriores hemos utilizado $mdx/p38\alpha^{\Delta Pax7}$.

Análisis de las consecuencias de deficiencia de $p38\alpha$ en la regeneración

muscular mdx

Deficiencia de $p38\alpha$ en células musculares

Ratones mdx y doble mutantes $mdx/p38\alpha^{\Delta Pax7}$ eran sanos al nacer y no mostraron indicaciones de lesión muscular ni diferencias en el tamaño del músculo antes del inicio de la enfermedad (14 días). Ratones $p38\alpha^{\Delta Pax7}$ cuentan con músculos más pequeños (BRIEN *et al.*, 2013) y por dicha razón los ratones $mdx/p38\alpha^{\Delta Pax7}$ presentaron un peso corporal reducido a 3 o 12 meses (**figura 1D**). Respecto al músculo, primero analizamos los ratones a los 3 meses de edad, al inicio de la enfermedad. En comparación con los ratones mdx, los ratones $mdx/p38\alpha^{\Delta Pax7}$ presentaban niveles ligeramente elevados de distrofinopatía caracterizados por el tamaño de las miofibras nucleadas centrales (fibras regenerantes) (**figura 1D**), donde los músculos contenían más agrupaciones de miofibras tempranas regenerantes (**figura 1E**) tanto en los músculos de las extremidades y en el diafragma (datos no mostrados). Para comprobar si estas diferencias provocarían una reducción funcional del rendimiento muscular, realizamos una prueba de

tolerancia al ejercicio, donde la fuerza muscular a 3 meses de edad era similar en los dos genotipos (datos no mostrados). Entonces queríamos saber si este fenotipo incrementaría con la edad, cuando la función muscular distrófica se ve más comprometida por la acumulación de inflamación y fibrosis. Dado que se ha demostrado en varios estudios que en el modelo del ratón mdx la capacidad para regeneración es reducida y que la atrofia muscular en el músculo del diafragma es más grave que en la extremidad trasera, analizamos el estado del músculo de diafragma en ratones mdx y mdx/p38 $\alpha^{\Delta Pax7}$ de 12 meses de edad. En comparación con ratones mdx, los ratones mdx/p38 $\alpha^{\Delta Pax7}$ no presentan a 12 meses diferencia significativa en sus niveles de distrofinopatía caracterizados por el tamaño de las miofibras nucleadas centrales (fibras regenerantes) (**figura 2A**), pero con una reducción del 30% en los números de las miofibras regenerantes tempranas/intermedias/tardías en el diafragma. Conforme a la reducción en el número de fibras, la cantidad de tejido fibrótico aumentó en el diafragma mdx/p38 $\alpha^{\Delta Pax7}$, indicado por la cantidad de deposición de colágeno teñido por Sirius Red. Para comprobar si estas diferencias provocarían un incremento en lesión muscular, determinamos los niveles de cinasa de creatina (QC) en suero, tanto en el músculo en reposo y después de someterse a una prueba de tolerancia al ejercicio. Lesión sistémica del músculo y fuerza muscular eran similares en los dos genotipos (**figuras 2B, 2C**). En conjunto, estos resultados muestran evidencia histológica, bioquímica y funcional que una deficiencia de p38a agrava el inicio de la enfermedad en ratones jóvenes, pero que en las etapas posteriores de la distrofinopatía, una deficiencia de p38 no tiene un impacto creciente en la evolución de la enfermedad. Resultados preliminares con ratones de mayor edad (casi 2 años) indican que la deficiencia de p38 puede ser beneficiosa en animales de mayor edad.

p38 α en el injerto de células madre en el músculo distrófico

Uno de los principales problemas de las terapias con células para las distrofias musculares ha sido habitualmente la pobre capacidad de injerto de las células

madre musculares (células satélite). Para resolver este problema, el grupo del Dr. Giulio Cossu ha utilizado, como sustitutos, progenitores vasculares con capacidad para formar músculo tras trasplante en el músculo distrófico. Sin embargo, en el contexto de la red europea Optistem (de la que la Unidad de Biología Celular de la UPF es miembro), se realizó un ensayo clínico en niños con DMD dirigido por nuestro colaborador en el Hospital San Raffaele (Milán, Italia) utilizando mesoangioblastos, y a pesar de resultados alentadores, se evidenció la necesidad no solo de mejorar el entorno de acogida muscular, sino también de volver a analizar el tipo celular a ser trasplantado (TEDESCO FS y COSSU G., comunicación personal). De hecho, los mesoangioblastos poseen un origen vascular/pericitos, y dada su naturaleza plástica, han demostrado poder dar lugar al músculo, pero bajo condiciones de lesión también pueden transdiferenciarse en células fibrogénicas, promoviendo así fibrosis (DULAUROY *et al.*, 2012). Por lo tanto, hemos replanteado nuestra estrategia y, basándonos en estas consideraciones, hemos dedicado un gran esfuerzo para mejorar el injerto de las células madre musculares, las células satélite, y abandonado la tarea 3. En ese sentido, hemos puesto en marcha nuevos protocolos de aislamiento y de injerto tras el consejo de los expertos líderes en nuestro campo (ROCHETEAU *et al.*, 2012). Siguiendo esta estrategia, hemos analizado factores potenciales por los cuales las células satélite, y en especial las células satélite de ratones mdx, tienen una disminución regenerativa y muestran poca capacidad de injerto, antes de analizar el papel de p38 α . Primero analizamos el número de células satélite en el músculo de ratones mdx y lo comparamos con ratones tipo salvaje (WT) emparejados por edad. Usando explantes de una sola fibra, observamos que el número de células satélite por miofibra (identificado por expresión de Pax7) fue similar en WT jóvenes y ratones mdx de 2 meses de edad (**figuras 2D, 2E**). Hay que señalar de nuestra observación que la expresión de p16^{INK4a} (un supresor tumoral e inhibidor del ciclo celular) fue indetectable en las células satélite, tanto de ratones WT como de mdx a edad joven, como muestra el análisis RT-qPCR de células satélite aisladas FACS (**figura 4C**). Sin embargo, observamos que el número de células satélite bajó rápidamente en los ratones mdx con la progresión de la enfermedad (**figura 2E**).

De hecho, el número de células satélite en el músculo de ratones adultos mdx de 9 meses era bajo comparado con ratones adultos WT emparejados por edad, lo que sugiere que los ciclos continuos de degeneración/regeneración en el músculo distrófico afectaban al número de células satélite. Una observación muy interesante ha sido que, mientras las células satélite de ratones WT de 9 meses no expresaban p16^{INK4a} (como era de esperar), las células satélite de ratones mdx sí expresaron p16^{INK4a} a la misma edad (**figura 2F**). Estos hallazgos sugieren que la desrepresión de p16^{INK4a} en células satélite de ratones mdx con envejecimiento puede agravar su defecto miogénico para injerto.

Para investigar el efecto de la expresión anticipada de p16^{INK4a} en las células satélite *in vivo*, se utilizó el ratón deficiente en Bmi1 (Bmi1^{-/-}) (un miembro del complejo represivo Polycomb 1 PRC1 que es ampliamente conocido por reprimir la expresión p16^{INK4a}). Como era de esperar, p16^{INK4a} fue desreprimido en células satélite deficientes en Bmi1 de jóvenes/adultos (**figura 3A**). Es importante destacar que la expresión elevada de p16^{INK4a} se correlacionó con la activación perjudicada de células satélite quiescentes deficientes en Bmi1, y la deficiente capacidad regenerativa del músculo Bmi1, nula después de lesión (**figura 3B**). Además, células satélite FACS Bmi1^{-/-} trasplantadas y purificadas que sobreexpresan p16^{INK4a} mostraron una baja tasa de activación desde la inactividad después de lesión y realizaron poca aportación a la formación de miofibras nuevas en los músculos de huéspedes musculares inmunodeficientes WT respecto a las células satélite Bmi1^{+/+} (**figura 3C**). Estos resultados indican que las células satélite de ratones Bmi1 nulos poseen poca capacidad de injertar, lo que puede atribuirse probablemente a la inducción de p16^{INK4a}. Para demostrar el papel causal de p16^{INK4a} en la capacidad regenerativa deficiente intrínseca en las células satélite Bmi1 nulo, se silenció p16^{INK4a} en células satélite Bmi1 nulo recientemente cribadas antes de injertarlas en el músculo de ratones inmunodeficientes, seguido de lesión (**figura 3D**). Hemos observado que la pérdida de p16^{INK4a} fue suficiente para recuperar la activación en células satélite Bmi1 nulo trasplantadas (**figuras 3E, 3F**). En resumen, hemos identificado p16^{INK4a} como un factor cuya expresión inducida

en células satélite en reposo perjudica el trasplante posterior de las mismas. Notablemente, hemos observado que $p16^{INK4a}$ es aumentada en células satélite de ratones durante el envejecimiento (SOUSA-VICTOR *et al.*, 2014) (resultados no mostrados). Es importante destacar que el silenciamiento de $p16^{INK4a}$ también restauró la regeneración endógena de ratones durante el envejecimiento y el potencial regenerativo de las células satélite viejas en experimentos de trasplante (SOUSA-VICTOR *et al.*, 2014). Tomados en conjunto, ya que las células satélite de ratones mdx adultos sobreexpresan $p16^{INK4a}$ y muestran una muy baja capacidad de injerto y un bajo potencial regenerativo, proponemos que la regulación negativa de la expresión de $p16^{INK4a}$ podría mejorar la terapia de células satélite en DMD.

Análisis de la función de p38 α en el injerto de células satélite en ratones distróficos

Análisis del injerto de células satélite tipo salvaje deficientes en p38a en ratones mdx/SCID inmunodeficientes o α -sarcoglicano/SCID

Siguiendo la estrategia que se ha explicado anteriormente, se han aislado células satélite de ratones tipo salvaje o $p38\alpha^{\Delta Pax}$, y fueron inyectadas en ratones mdx/SCID. Se analizaron los ratones 21 días después de la inyección, y la recuperación funcional de los músculos distróficos se analizó mediante parámetros que indican la degeneración/regeneración muscular, y la expresión *de novo* de distrofia. Como hemos demostrado en el caso de las células satélite jóvenes, adultas y envejecidas (SOUSA-VICTOR *et al.*, 2014), las células satélite deficientes en $p38\alpha$ eran capaces de injerto en músculos mdx, permitiendo la formación de nuevas fibras que expresaban distrofina (**figura 3G**). A pesar de este hallazgo, nuestros datos actuales no muestran ninguna diferencia significativa en la eficiencia de injerto entre WT y células satélite $p38\alpha^{\Delta Pax7}$. Dado que las células satélite deficientes en $p38\alpha$ poseen un perfil de expresión totalmente diferente (BRIEN *et al.*, 2013 y nuestros propios datos no publicados) y sus propiedades funcionales *in vitro* (BRIEN *et al.*, 2013; PERDIGUERO *et al.*, 2011; RUIZ-BONILLA *et al.*,

2008) estos resultados son sorprendentes. Dado que realizamos estos experimentos con ratones jóvenes (2-3 meses) y teniendo en cuenta nuestros datos que vinculan la distrofia muscular con la expresión de p16^{INK4a} y el conjunto de evidencias vinculando la vía de señalización p38 con la inducción de senectud, en la actualidad realizamos experimentos con células satélite mdx y mdx/p38 $\alpha^{\Delta Pax7}$ adultas (6 meses) o envejecidas, con el fin de intentar constatar si la vía p38 puede controlar la caída del rendimiento de las células satélite que tiene lugar durante la evolución de la distrofia muscular a lo largo del tiempo.

Influencia del entorno de acogida en el injerto de células madre

Análisis del papel de macrófagos productores de p38 α en la reducción de inflamación en fibrosis en músculo distrófico

Primero analizamos los macrófagos de ratones WT y p38 $\alpha^{\Delta LysM}$ aislados de un modelo de lesión aguda. Para ello hemos puesto en marcha un nuevo protocolo de la separación de los neutrófilos y las diferentes subpoblaciones de macrófagos en el músculo lesionado que suponen un paso más allá en nuestra estrategia anterior (PERDIGUERO *et al.*, 2011), permitiéndonos separar los neutrófilos (F4/80⁻ Ly6C^{High}), macrófagos M1 proinflamatorios (F4/80⁺ Ly6C^{High}) y dos poblaciones de macrófagos M2 antiinflamatorios. F4/80⁺ Ly6C^{Low} MHCII^{High} (M2b like) o MHCII^{Low} (M2c) (**figura 4A**). Con esta nueva estrategia hemos descubierto que la pérdida de p38 α induce un cambio en la expresión de las citocinas IL-1 β e IL-10 en la población M2c F4/80⁺ Ly6C^{Low} MHCII^{Low} a los 6 días después de la lesión (**figura 4B**), una etapa de la lesión aguda que es más similar al estado inflamatorio crónico de los ratones mdx (**figura 4C**). Con esta información, a continuación realizamos el análisis de los mdx y mdx/p38 $\alpha^{\Delta LysM}$ en el inicio de la distrofinopatía (3 meses). Los ratones mdx/p38 $\alpha^{\Delta LysM}$ no presentan diferencias obvias en el peso corporal, el tamaño global del músculo, por cuyo motivo hemos analizado el músculo diafragmático. Los mdx/p38 $\alpha^{\Delta LysM}$ no mostraron diferencias significativas en el tamaño de las miofibras centrales nucleadas (fibras regenerantes) o en el área de

fibrosis en comparación con los ratones mdx (**figura 4D**). Dado que hemos encontrado problemas importantes con la reproducción en esta colonia, en la actualidad estamos acumulando cohortes más grandes de animales para confirmar dichos resultados, así como para realizar estudios funcionales.

Análisis de las consecuencias de la reducción de la inflamación y la fibrosis en el músculo distrófico para el injerto de células madre

Efecto o reducción de la inflamación anti-miR-21 inducida y la fibrosis en el músculo distrófico para el injerto de células madre.

Hemos caracterizado un eje fibrogénico asociado a la edad en el modelo de ratón distrófico. La expresión de miR-21, que apenas se detecta en el músculo normal, aumenta de forma concomitante con la fibrogénesis dependiente de la edad. La modulación de miR-21 (Ant-miR-21) en los músculos de los ratones distróficos envejecidos mediante el tratamiento con un inhibidor de miR-21 invierte la fibrosis en los músculos de las extremidades en la etapa en que la fibrosis se considera generalmente irreversible (**figuras 5A, 5B**) (ARDITE *et al.*, 2012). Con el fin de analizar la influencia del tratamiento anti-miR-21 en el injerto de las células satélite en el músculo distrófico, trasplantamos ratones controles mdx inmunodeficientes o ratones pretratados con el inhibidor de miR-21 (Ant-miR-21) para reducir inflamación y desarrollo fibrótico con 5×10^5 células satélite, ratones previamente transducidos con un vector lentiviral expresando GFP, descrito previamente (**figura 5C**). Se observó un aumento significativo en el número de GFP⁺ miofibras en ratones mdx tratados con Ant-miR-21 *versus* ratones mdx no tratados, a los 7 y 21 días después de la inyección de células satélite (**figura 5C** y datos no publicados), demostrando el efecto beneficioso de un tratamiento antifibrótico en la eficiencia de injerto. Junto con esta mejora, en el injerto se observó una reducción de la deposición de la fibrosis, lo que apoya nuestra hipótesis de que el efecto antifibrótico del tratamiento con Ant-miR-21 mejora tanto el tejido del huésped como el injerto de las células madre.

3. Relevancia e implicaciones

Durante la realización de este proyecto hemos aprendido que las terapias combinatorias para el tratamiento de la DMD no son solo una idea prometedora, pero quizás la única posibilidad factible para su cura. La esperanza de un método “fácil” con trasplantes de células vasculares que lleguen y se arraiguen en el músculo después de un trasplante sistémico ha demostrado ser más difícil de lo esperado, con resultados muy modestos en el ensayo clínico realizado en el contexto del proyecto europeo Optistem FP7. Tal vez este ensayo clínico podría haber tenido más éxito si se hubiera combinado con un tratamiento antiinflamatorio y antifibrótico, aunque se han publicado resultados negativos sobre los mesoangioblastos, como se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, hemos centrado nuestra atención en las células satélite, ya que los nuevos avances en las técnicas de aislamiento, trasplante e injerto de las células satélite han hecho posible su uso en nuestros estudios principales. Sobre la vía de señalización p38 MAPK, nuestros resultados ponen de manifiesto que el papel de esta cinasa es más complicado de lo esperado. Se ha descrito que p38 α/β reprimen la expresión de Pax7 mediante la activación del complejo represivo Polycomb 2 (PRC2) (PALACIOS *et al.*, 2010). Podría plantearse la hipótesis de que, *in vivo*, la ablación de p38 puede causar una expresión persistente de Pax7 en mioblastos, que conduce a un aumento de la proliferación y reducción de la diferenciación. Sorprendentemente, sin embargo, y contrariamente a nuestros datos anteriores *in vitro*, no se observó que la supresión de p38 α en las células satélite adultas afectara a la proliferación, aunque es importante para su adecuada activación (ZAMORA *et al.*, en preparación). Esto sugiere que el eje p38 α -Pax7 puede tener un papel durante la diferenciación de los mioblastos, pero no desempeña un papel activo en las células satélite adultas, al menos no es así en la diferenciación. Además, se ha demostrado recientemente que existe una diferencia intrínseca en la dependencia Pax7 entre las células satélite neonatales y las adultas, lo que ha llevado a la propuesta de que las células satélite tienen requisitos genéticos dependientes de la edad (GUNTHER *et al.*, 2013; LEPPER *et al.*, 2009). Nuestros datos

actuales sugieren que p38 α es una de las moléculas importantes para definir el comportamiento dependiente de la edad de las células satélite, un tema que continuamos investigando tanto en ratones WT como en ratones distróficos. Por lo tanto, nuestra idea inicial de que la inhibición de p38 podría ser beneficiosa en el tratamiento inicial de la enfermedad distrófica podría ser cierta para las etapas posteriores de la enfermedad.

Respecto al uso conjunto de injerto de células madre y de drogas antifibróticas/antiinflamatorias como un mejor tratamiento para la distrofia muscular de Duchenne, hemos demostrado que la combinación de la inhibición de miR-21 con el injerto de células satélite mejora la eficacia del trasplante y, además, reduce la deposición de fibrosis, apoyándose nuestra hipótesis en que el efecto antifibrótico de la inhibición de miR-21 mejorará tanto el tejido del huésped como el injerto de las células madre.

Referencias

Adams, R.H., A. Porras, G. Alonso, M. Jones, K. Vintersten, S. Panelli, A. Valladares, L. Perez, R. Klein, A.R. Nebreda. 2000.

Essential role of p38 α MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development.

Mol Cell. 6:109-116.

Ardite, E., E. Perdiguero, B. Vidal, S. Gutarra, A.L. Serrano, P. Munoz-Canoves. 2012. PAI-1-regulated miR-21 defines a novel age-associated fibrogenic pathway in muscular dystrophy.

The Journal of cell biology. 196:163-175.

Brien, P., D. Pugazhendhi, S. Woodhouse, D. Oxley, J.M. Pell. 2013.

p38 α MAPK regulates adult muscle stem cell fate by restricting progenitor proliferation during postnatal growth and repair. *Stem Cells*. 31:1597-1610.

Clausen, B.E., C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, I. Forster. 1999.
Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice.
Transgenic research. 8:265-277.

Dulauroy, S., S.E. Di Carlo, F. Langa, G. Eberl, L. Peduto. 2012.
Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a
major source of profibrotic cells during acute tissue injury.
Nat Med.

Gunther, S., J. Kim, S. Kostin, C. Lepper, C.M. Fan, T. Braun. 2013.
Myf5-positive satellite cells contribute to Pax7-dependent long-term maintenance
of adult muscle stem cells.
Cell Stem Cell. 13:590-601.

Lepper, C., S.J. Conway, C.M. Fan. 2009.
Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic
requirements.
Nature. 460:627-631.

Palacios, D., C. Mozzetta, S. Consalvi, G. Caretti, V. Saccone, V. Proserpio, V.E.
Marquez, S. Valente, A. Mai, S.V. Forcales, V. Sartorelli, P.L. Puri. 2010.
TNF/p38alpha/polycomb signaling to Pax7 locus in satellite cells links inflammation
to the epigenetic control of muscle regeneration.
Cell Stem Cell. 7:455-469.

Perdiguero, E., P. Sousa-Victor, V. Ruiz-Bonilla, M. Jardi, C. Caelles, A.L. Serrano, P.
Munoz-Canoves. 2011.
p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of
inflammation during tissue repair.
The Journal of cell biology. 195:307-322.

Rocheteau, P., B. Gayraud-Morel, I. Siegl-Cachedenier, M.A. Blasco, S. Tajbakhsh. 2012.

A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division.

Cell. 148:112-125.

Ruiz-Bonilla, V., E. Perdiguero, L. Gresh, A.L. Serrano, M. Zamora, P. Sousa-Victor, M. Jardi, E.F. Wagner, P. Munoz-Canoves. 2008.

Efficient adult skeletal muscle regeneration in mice deficient in p38beta, p38gamma and p38delta MAP kinases.

Cell Cycle. 7:2208-2214.

Sousa-Victor, P., S. Gutarra, L. Garcia-Prat, J. Rodriguez-Ubreva, L. Ortet, V. Ruiz-Bonilla, M. Jardi, E. Ballestar, S. Gonzalez, A.L. Serrano, E. Perdiguero, P. Munoz-Canoves. 2014.

Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence.

Nature. 5

4. Bibliografía científica generada

Ardite E, Perdiguero E, Vidal B, Gutarra S, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P.

PAI-1-regulated miR-21 defines a novel age-associated fibrogenic pathway in muscular dystrophy.

J Cell Biol. 2012 196(1):163-75.

Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL.

Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword?

FEBS J. 2013 Sep;280(17):4131-48. doi: 10.1111/febs.12338. Corresponding author

Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P.

Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair.

Mediators Inflamm. 2013;2013:491497. doi: 10.1155/2013/491497.

Corresponding authors

Sousa-Victor P, Gutarra S, García-Prat L, Rodríguez-Ubreva J, Ortet L, Ruiz-Bonilla V,

Jardí M, Ballestar E, González S, Serrano AL, *Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P.*

Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence.

Nature. 2014 Feb 12. doi: 10.1038/nature13013. Corresponding authors

Perdiguero E, Sousa-Victor P, Ruiz-Bonilla V, Jardí M, Caelles C, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P.

p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair.

J Cell Biol. 2011 195(2):307-22.

Perdiguero E, Kharraz Y, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P.

MKP-1 coordinates ordered macrophage-phenotype transitions essential for stem cell-dependent tissue repair.

Cell Cycle. 2012 11(5):877-86.

Figuras

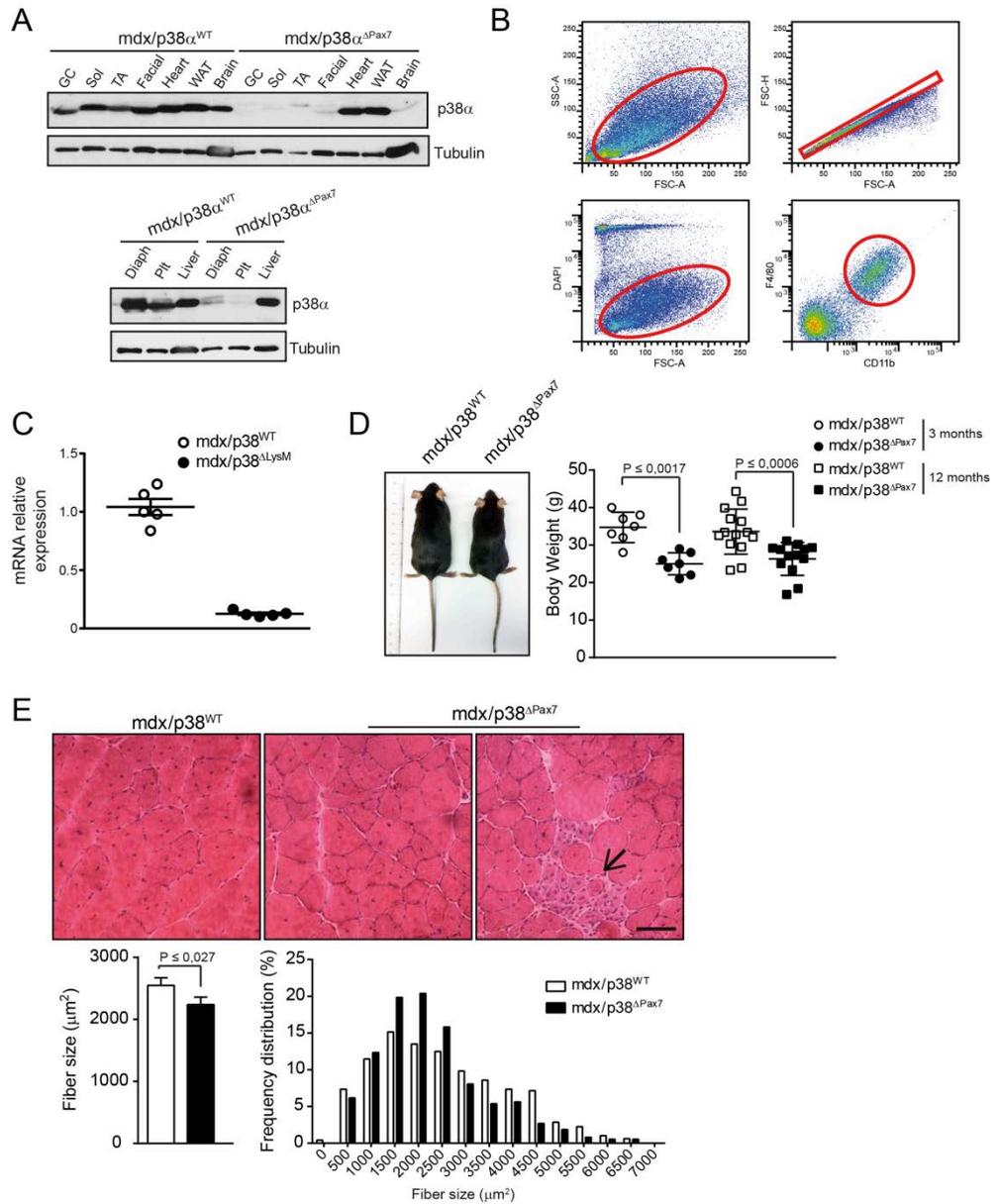


Figura 1. Eficiencia y especificidad de supresión de p38 α CRE y efecto de supresión de p38 α en células musculares distróficas a los 3 meses. **A)** El análisis Western blot muestra el nivel de proteína p38 α en tejidos diferentes de mdx/ p38 α ^{WT} y mdx/p38 α ^{ΔPax7}. GC: gastrocnemio, SOL: soleo, TA: tibial anterior, WAT: tejido adiposo blanco, Diaph: diafragma, Plt: plantar. α -tubulina se usa como control de carga. Se obtienen resultados similares con ratones mutantes mediados por miogenina-Cre (mdx/p38 α ^{ΔMyog}) con la excepción del tejido cerebral, donde la expresión de p38 se produjo en ratones mdx/p38 α ^{WT}. **B)** Estrategia FACS para aislado de macrófagos de músculos esqueléticos mdx y mdx/p38 α ^{ΔLysM}. Células viables fueron identificadas sobre la base de la dispersión frontal y lateral,

marcador DAPI para excluir desechos nucleares y células muertas. La doble positividad F4/80 y CD11b definió la población de macrófagos. **C)** Niveles relativos de p38 α en mRNA evaluados por RT-qPCR desde los macrófagos cribados. **D)** Imágenes representativas de ratones mdx y mdx/p38 $\alpha^{\Delta_{Pax7}}$ a los 3 meses de edad y cuantificación de peso corporal a los 3 y 12 meses de edad. **E)** (Superior) Imágenes representativas de tinción de hematoxilina-eosina en criosecciones de músculo tibial anterior (TA) de ratones mdx y mdx/p38 $\alpha^{\Delta_{Pax7}}$ a los 3 meses de edad. La flecha indica una agrupación de miofibras regenerantes tempranas más pequeñas. Escala: 50 μ m. (Inferior) Cuantificación de tamaño medio de fibras de músculo TA y distribución de frecuencia. Los datos muestran media \pm e.e.m. Comparaciones por U-test bilateral de Mann-Whitney. Se indican los valores p; n \geq 5.

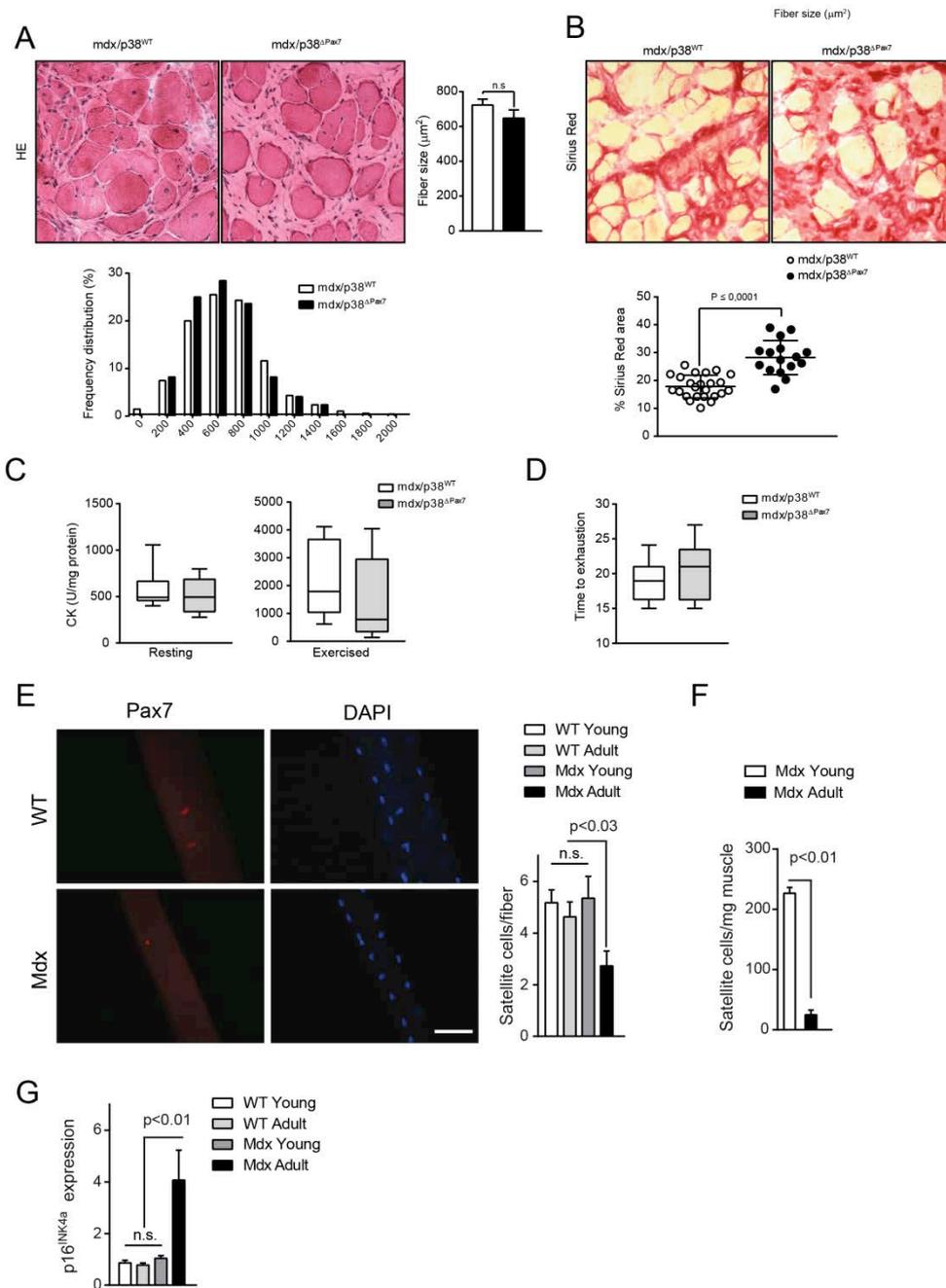


Figura 2. A) Imágenes representativas de tinción de hematoxilina-eosina en criosecciones de músculo del diafragma de ratones *mdx* y *mdx/p38^{ΔPax7}* a los 3 meses de edad y cuantificación de tamaños medios de fibra (superior). Distribución de frecuencia del área transversal de fibra (inferior). **B)** Imágenes representativas de tinción Sirius Red (como medida para teñir colágeno) en criosecciones de músculo de diafragma de ratones *mdx* y *mdx/p38^{ΔPax7}* a los 3 meses de edad y cuantificación del área teñida por Sirius Red por secciones (10 secciones por músculo). **C)** Antes del

sacrificio, se ensayó con ratones para actividad de cinasa de creatina en plasma (como medida de lesión muscular) de ratones en reposo (izquierda) y antes de ejercicio (derecha). **D)** Los ratones fueron agotados mediante carrera en cilindro giratorio. Las barras indican valores medios y las barras de error representan EE. Comparaciones por U-test bilateral de Mann-Whitney. Se indican los valores p ; $n \geq 5$. **E)** Explantes de una sola fibra de ratones adultos WT y mdx. Se muestra la inmunotinción de células satélite Pax7 fuera de la miofibra. Tinción DAPI para identificar núcleos de células satélite y mionúcleos de fibra. Se cuantifica el número de células satélite (Pax7⁺) en explantes de una sola fibra de ratones WT y mdx de edades distintas: jóvenes (2 meses) y adultos (9 meses). El número de células satélite es similar en ratones WT y mdx de edad joven. En ratones WT adultos, el número de células satélite se mantiene constante. Sin embargo, el número de células satélite es reducido en ratones adultos mdx. **F)** Análisis del número de células satélite en células satélite aisladas por FACS usando la estrategia $\alpha 7$ -integrina/CD34 de purificación. Confirmando los resultados en extractos de una sola fibra, el análisis FACS muestra que el número de células satélite es reducido en músculo de ratones mdx adultos *versus* jóvenes. **G)** Análisis de la expresión de p16^{INK4a} en células satélite aisladas por FACS de ratones WT y mdx de edades distintas: jóvenes (2 meses) y adultos (9 meses). Las células satélite WT no expresaban p16^{INK4a} ni en edad joven ni adulta. Por el contrario, la expresión de p16^{INK4a} fue inducida en células satélite adultas de ratones mdx. El conjunto de los resultados mostrados en **a**, **b** y **c** sugiere que la pérdida de células satélite en ratones adultos distróficos puede estar relacionada con la expresión anticipada de p16^{INK4a}. Así, resulta interesante proponer que la desrepresión de p16^{INK4a} en células satélite de músculo distrófico puede agravar su defecto miogénico y provocar su depleción durante la progresión de la enfermedad.

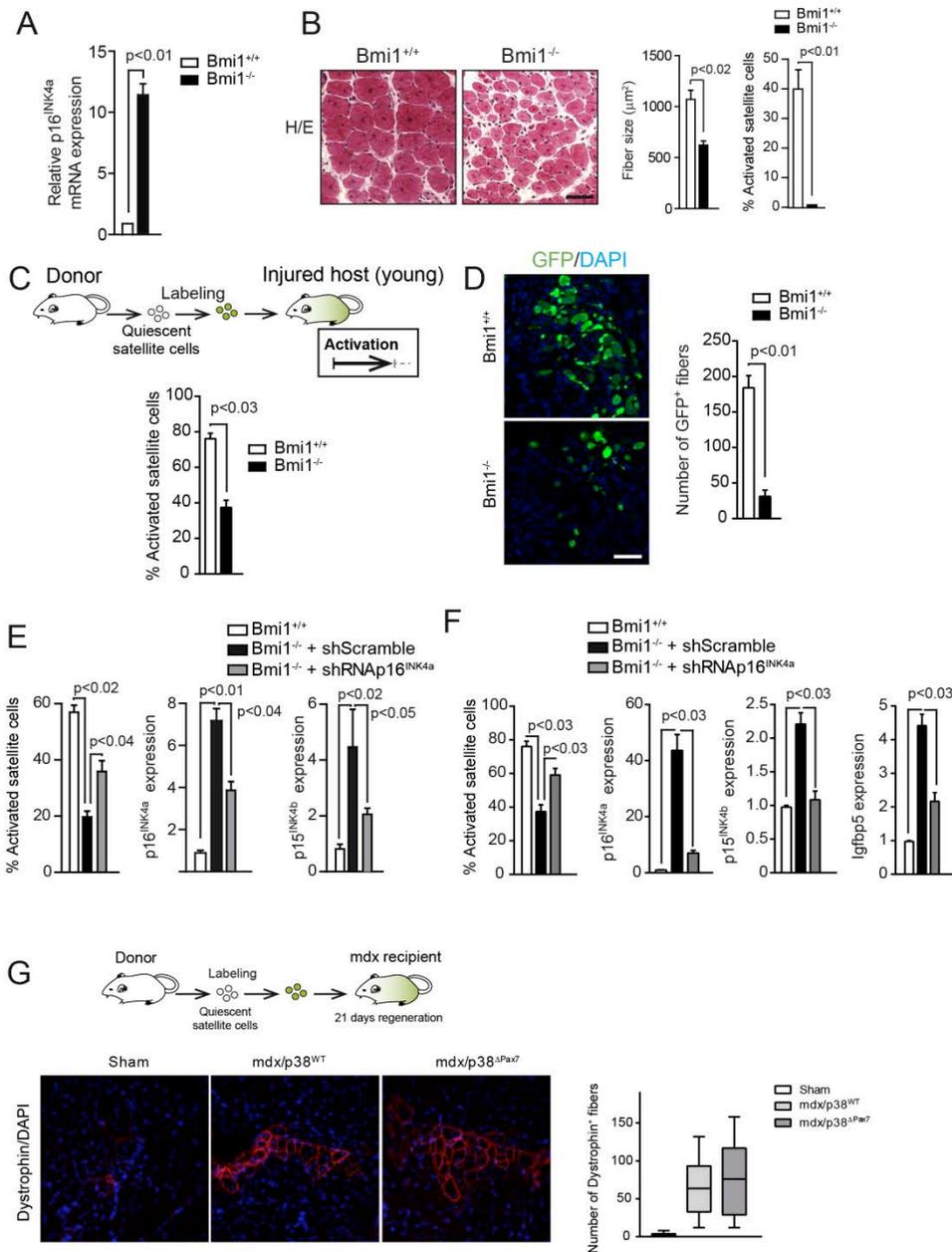


Figura 3. La capacidad de injerto y el potencial regenerativo están afectados en células satélite Bmi1 nulo, sobreexpresando p16^{INK4a} después de trasplante a un huésped ratón heterólogo. El silenciamiento de p16^{INK4a} restaura la activación de quiescencia en células satélite Bmi1 nulo. **A)** La expresión de

p16^{INK4a}, evaluado por RT-qPCR, en células satélite aisladas de ratones jóvenes/adultos Bmi1^{+/+} y Bmi1^{-/-}. **B)** Imágenes representativas de miofibras regenerantes de nueva formación derivadas de células satélite, teñidas por H-E en criosecciones de músculo TA de ratones adultos Bmi1^{+/+} y Bmi1^{-/-} lesionados por inyección de CTX y analizados una semana después de la lesión. El histograma representa la cuantificación del tamaño de la miofibra regenerante, evaluado por el área transversal. (Derecha) Porcentaje de células satélite activadas (Pax7/MyoD doble positivo) en explantes de una sola fibra aislados de ratones Bmi1^{+/+} y Bmi1^{-/-}. **C), D)** Esquema de ensayo de trasplante de células satélite etiquetadas con GFP en ratones huéspedes WT prelesionados e inmunodeficientes. Cantidades idénticas de células satélite FACS purificadas del músculo en reposo de ratones Bmi1^{+/+} y

Bmi1^{-/-} se trasplantaron en músculos de ratones WT inmunodeficientes, y se analizaron células satélite activadas y miofibras nuevas regenerantes 24 horas y 7 días después de trasplante, respectivamente. **D)** Se muestran imágenes representativas de músculos trasplantados después de 7 días. **E)** Cantidades idénticas de células satélite aisladas por FACS de ratones Bmi1^{+/+} y Bmi1^{-/-} fueron transducidas con Ad-shRNAp16^{INK4a} (expresando un shRNA específico para p16^{INK4a}) o Ad-shScramble, y cultivadas en condiciones proliferativas. Se cuantificaron células BrdU-positivas antes de la primera división, y se determinó la expresión de p16^{INK4a} y p15^{INK4b} por RT-qPCR. **F)** El mismo número de células satélite de músculo en reposo de ratones Bmi1 nulo y sus correspondientes ratones controles, emparejados por edades, fueron aislados por FACS, p16^{INK4a} silenciados por vía mediada de liposoma shRNAp16^{INK4a} (o shScramble) y etiquetadas con tinte PKH26, y trasplantadas inmediatamente en el músculo prelesionado de ratones jóvenes; la activación se analizó 24 horas más tarde, cuantificando el número de células satélite MyoD⁺ o Ki67⁺ cribadas (se muestran resultados de células MyoD⁺); se analizaron inhibidores/marcadores asociados a senescencia del ciclo celular incluyendo p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y Igfbp5 en células etiquetadas y cribadas por RT-qPCR. **G)** Injerto de células satélite deficientes en p38 α . Esquema del ensayo de trasplante de células satélite etiquetadas con GFP en huéspedes ratones mdx. Cantidades idénticas de células satélite aisladas por FACS de ratones mdx y mdx/p38 α ^{Δ Pax7} fueron transducidas con el lentivirus GFP y trasplantadas inmediatamente en ratones mdx. Después de 21 días, los músculos fueron inmunoteñidos para distrofina. Se muestra el número de fibras de distrofina⁺ por músculo. Las barras indican valores medios y las barras de error representan EE.

de tinción de hematoxilina-eosina en criosecciones de músculo de diafragma de ratones mdx y mdx/p38 $\alpha^{\Delta_{LysM}}$ a los 3 meses de edad y cuantificación de tamaño medio de fibra (superior). (Inferior) Imágenes representativas de tinción Sirius Red (como sistema para teñir colágeno) en criosecciones de músculo de diafragma de ratones mdx y mdx/p38 $\alpha^{\Delta_{LysM}}$ a los 3 meses de edad y cuantificación del área teñida de Sirius Red por secciones (10 secciones por músculo). Las barras indican valores medios y las barras de error representan EE. Comparaciones por U-test bilateral de Mann-Whitney. Se indican los valores p; n \geq 5.

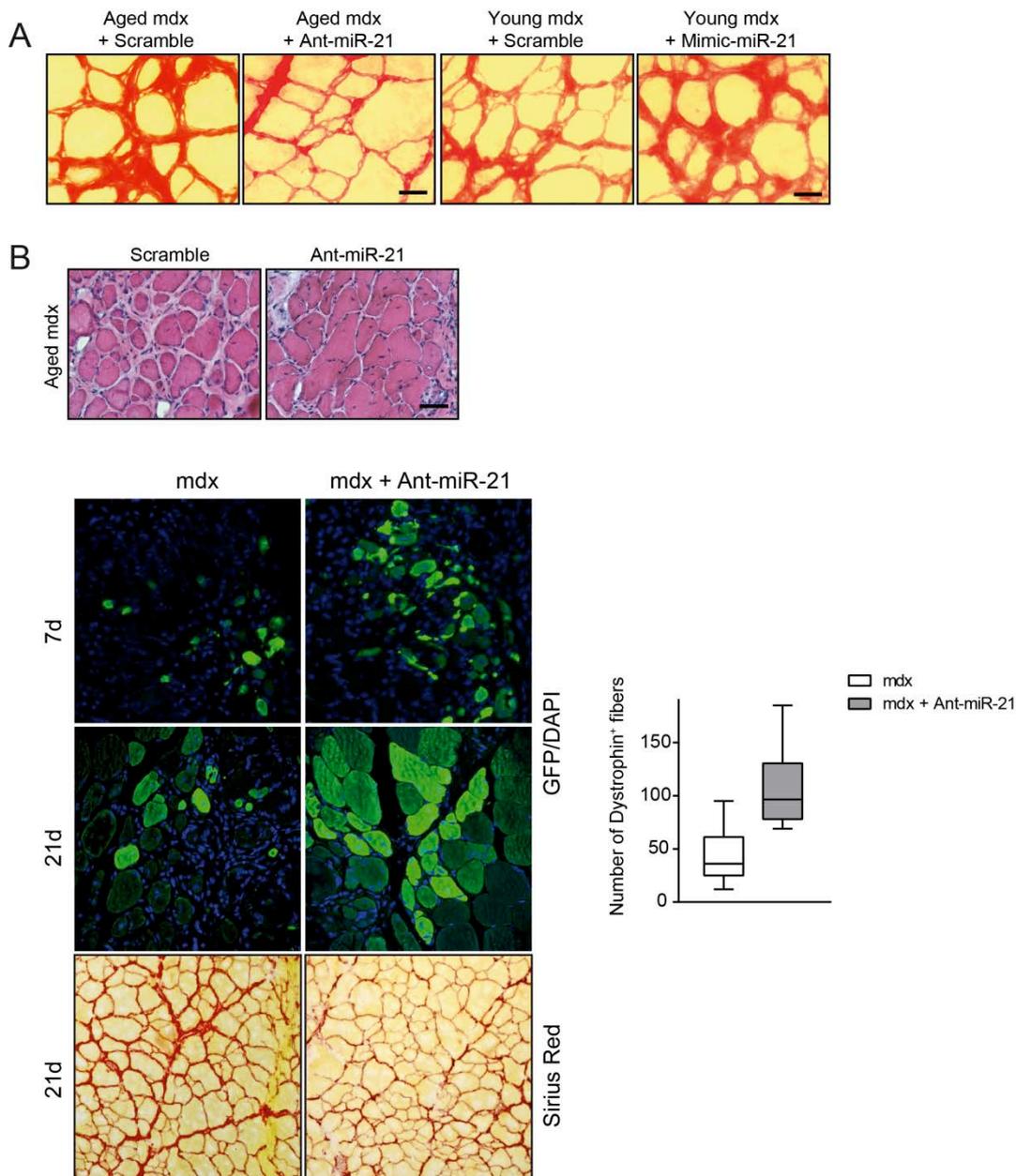


Figura 5. A. Tinción Sirius Red de secciones de músculo gastrocnemio de ratones mdx de 24 meses de edad, después de administración de Ant-miR-21 (o Scramble) durante un mes; y ratones jóvenes mdx (3 meses), después de administración de Mimic-miR-21 (o Scramble). Escala: 25 μ m. **B)** Tinción H-E de secciones de músculo gastrocnemio de ratones mdx de 24 meses de edad tratados con Ant-miR-21 (o Scramble) durante un mes. Escala: 50 μ m. **C)** Influencia del tratamiento con Ant-miR-21 en la eficiencia de injerto de células madre en músculo distrófico. En ratones mdx pretratados con inhibidor de miR-21 (Ant-miR-21) y ratones controles mdx (pretratados con un miR Scramble) se

inyectó igual cantidad de células satélite aisladas por FACS de ratones WT transducidos con lentivirus GFP. Después de 7 o 21 días, los músculos fueron inmunoteñidos para GFP. Se muestra el número de fibras GFP⁺ por músculo. Las barras indican valores medios y las barras de error representan EE.