

## Harnessing the power of muscle regeneration

Jiménez, Cecilia

Neuropediatrics' Department, Neuromuscular Unit, Fundacio Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu i Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Universitat de Barcelona

After birth, skeletal muscle retains its ability to regenerate from a population of muscle stem cells (MuSC) often referred to as satellite cells. These are quiescent cells that upon activation activate, migrate from their niche (between the muscle plasma membrane and the basal lamina), proliferate and differentiate into a mononuclear myocyte and become a mature myotube. In certain conditions, skeletal muscle regeneration is impaired. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), caused by mutations in the *DMD* gene in the X chromosome. This leads to deficiency of dystrophin, a sub-sarcolemmal protein that protects the muscle membrane from damage. Muscle pathology in DMD is associated with insufficient regenerative capacity of MuSCs due to numerous cell autonomous (intrinsic) and extrinsic changes in satellite cells and their environment or niche. In addition to muscular dystrophies there are other circumstances when adult myogenesis deteriorates. We focused on sarcopenia, the loss of muscle mass and function that accompanies advanced age. Autophagy is essential for the stemness of the satellite cell pool, to prevent senescence and apoptosis. Satellite cells from geriatric mice have a reduction in the autophagic flux and an increase in apoptosis due to defects in the AMPK/p27<sup>kip1</sup> axis. Autophagy in MuSCs can be boosted by caloric restriction, exercise, rapamycin and spermidine treatment. The environment of the satellite cell also plays an important role (myostatin and wnt ligands, and locally secreted factors such as TGF $\beta$ , FGF2 and Ang1). MuSCs themselves can be utilized in cell therapy as the source of new muscle and to replace defective proteins such as dystrophin if combined with gene therapy. Many attempts have been made with myoblasts, mesangioblasts, CD133+ cells and pericytes but so far the effects have been modest. However, technologies such as iPS cells, tissue bioengineering and gene editing (CRISPR/Cas) hold great promise to improve the efficiency and translation into clinical practice of therapies for muscle diseases and muscle deterioration. Students were asked to argue a potential combined strategy to enhance MuSCs activity and muscle regeneration for the treatment of muscle injury, disease or age-related dysfunction based on the information discussed in the seminar.

Students were asked to write an essay on the following:

Argue a potential combined strategy to enhance stem cell activity and muscle regeneration for the treatment of muscle injury, disease or age-related dysfunction.

## 1. Autofagia y miostatina: dianas para la supervivencia de la célula satélite en ancianos

**Castillo Mestres, Daniel**

**Ciencias Biomédicas**

Antecedentes: Desde el descubrimiento en 1961 de las células satélite, principales *stem cells* musculares (*MuSCs*), ha avanzado el conocimiento de la miogénesis durante el desarrollo embrionario y en el adulto. Se han realizado hallazgos que señalan la importancia de estas células en procesos de regeneración muscular tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, y en el envejecimiento. Los factores que afectan a la disfunción de las células satélite pueden utilizarse como dianas para futuras terapias.

Relevancia: En adultos de edad avanzada es común la sarcopenia progresiva; uno de los principales factores intrínsecos es la disminución de la vía de señalización de la autofagia, como consecuencia se produce una incapacidad de las células satélite para diferenciarse y proliferar, la regeneración muscular disminuye considerablemente afectando a la autonomía personal de los mayores; revertir la desregulación para reducir el avance de la sarcopenia y ganar masa muscular podría mejorar la calidad de vida en la tercera edad y reducir el gran impacto social que genera la dependencia.

Respuesta: La autofagia se ha mostrado como uno de los mecanismos clave de la célula satélite para su activación y autorrenovación; obtiene así, moléculas para su metabolismo energético y como sustrato en la división. La senescencia de las células satélite y la apoptosis final que ocurren con la edad vienen acompañadas de la desregulación de AMPK/p27<sup>Kip1</sup> que es una de las principales vías de señalización en la activación de la autofagia. Experimentos en ratones (White et al., 2018) demostraron que promover la vía de señalización de AMPK con AICAR disminuye los marcadores de senescencia y aumenta la supervivencia celular de las *MuSCs*. Proponemos un ensayo clínico para activar esta vía de señalización con análogos de AMPK y observar su efecto en humanos. Por otro lado, se ha hallado (Bentzinger et al., 2010) un aumento de moléculas de la familia de los TGF- $\beta$  como la miostatina en la sangre de ratas y humanos de edad geriátrica. Se conoce que a través de receptores específicos la miostatina activa una vía represora con participación de proteínas *Smad*, retrasando e inhibiendo el desarrollo y regeneración muscular. Proponemos paralelamente, el diseño de una molécula de secuestro de la miostatina circulante y/o el bloqueo de los receptores de miostatina con análogos a ésta o con anticuerpos específicos. En ambos ensayos buscamos incidir en los factores intrínsecos y extrínsecos para incrementar la supervivencia de la célula satélite y producir un aumento efectivo en la masa muscular. Por último, remarcamos la necesidad de ensayos más amplios en humanos mediante métodos no farmacológicos para valorar su impacto en la función muscular de individuos en edad geriátrica, p.ej. dietas con restricción calórica temporal de forma intermitente que activen de forma natural la vía de la autofagia en células satélite.

## 2. Harnessing the power of muscle regeneration

*Calpe, Sofia; Chen, Helen; Estanga, Karla*

*Ciencias Biomédicas*

En la regeneración muscular intervienen básicamente dos tipos celulares: las propias fibras musculares y las células satélite. Estas últimas pueden proliferar, autorrenovarse y diferenciarse en células musculares. La miogénesis adulta se lleva a cabo por los mismos mecanismos que en el embrión y está regulada por factores intrínsecos y/o extrínsecos. La medicina regenerativa podría permitirnos mejorar aspectos fisiológicos y patológicos de la musculatura esquelética.

Uno de los campos que este tipo de medicina pretende investigar es la degeneración muscular asociada al envejecimiento, que recibe el nombre de **sarcopenia**. Se sabe que esta condición se debe a que, con la edad, las células satélites pierden capacidad proliferativa y de diferenciación. Esta patología, si se agrava, se relaciona con la pérdida de la independencia funcional del anciano, por tanto, su estudio es importante para intentar mejorar la calidad de vida de estas personas.

Nuestra estrategia de terapia se basa en aumentar la función de las células satélite, ya que son esenciales para la regeneración muscular, que es deficiente en la sarcopenia. Para ello tenemos como dianas de estudio factores tanto intrínsecos como extrínsecos que están implicados en este proceso.

En cuanto a los factores intrínsecos, hipotetizamos que una buena diana terapéutica para mejorar el pronóstico de la sarcopenia sería la activación de la vía **Notch**. Para ello, obtendríamos células satélite sanas de un donante joven y las cultivaríamos en presencia de ligandos de Notch, como el ligando Delta, para activar la vía. Una vez se haya activado en estas células, las trasplantamos al paciente en las zonas donde interese más activar la regeneración muscular. Este método podría ser útil ya que la activación del receptor Notch implica la proteólisis de su dominio intracelular, que actuará como cofactor aumentando la expresión de Pax7 en las células satélite. Este factor de transcripción es esencial para activar la miogénesis y, por tanto, la regeneración muscular.

Adicionalmente, complementaremos la terapia anterior con la modificación de un factor extrínseco que también permita potenciar la síntesis de Pax7. Se sabe que la **Ang1**, secretada por las células musculares lisas y los fibroblastos del nicho de las células satélite, aumenta la expresión de Pax7. Por esta razón, podría ser útil inducir la síntesis de Ang1 mediante algún vector. Tras consultar fuentes externas<sup>1</sup>, concluimos que un buen candidato como vector podría ser adenovirus recombinantes que promuevan la expresión de Ang1 en las células diana. Estos dos mecanismos propuestos actúan sinérgicamente aumentando la expresión de Pax7, por lo que serían una propuesta de terapia conjunta.

### 3. Harnessing the power of muscle regeneration

**Brullas, Marta; García, Víctor; Sánchez, Paula; Zufiaurre, Maddalen**  
**Ciencias Biomédicas.**

En este seminario hemos aprendido el proceso por el cual se genera el músculo y los mediadores que intervienen desde el desarrollo embrionario. Se destaca la importancia de las células satélite, que tienen capacidad de regenerar la fibra muscular. En relación con las enfermedades asociadas a pérdida muscular, es vital la disminución de la autofagia, que lleva a una pérdida en la población de células satélite. También pueden estar influenciadas por factores externos (nicho).

Actualmente, se está estudiando la utilización de células satélites en enfermedades de deterioro de la función muscular, ya sea provocado por la edad o por mutaciones genéticas. Conocer los factores extrínsecos e intrínsecos nos ayudaría tanto a tratar estas enfermedades, así como paliar los síntomas.

Se conoce la importancia de la autofagia en el mantenimiento de las células satélite, tratándose de un mecanismo opuesto a la apoptosis. Una dieta baja en proteínas induce la actividad de la AMPK, cuya fosforilación promueve la autofagia. Por lo tanto, se recomendaría una dieta baja en proteína. Paralelamente, utilizaríamos antagonistas para los transportadores que introducen aminoácidos en las células satélites. De esta manera, gracias a la restricción calórica y a la actividad de esta enzima, las células satélites mantendrían su quiescencia y el pool no se vería disminuido.

Por otro lado, está el receptor CD34, que es una proteína de superficie y marcador presente en células madres, entre ellas las células satélite. La activación de esta vía aumenta la motilidad y proliferación de las células satélite. Según nos hemos informado, la presencia de mediadores pro-inflamatorios como INF-gamma, TNF-alfa o IL-1, disminuyen la expresión de CD34. Esto concuerda con el hecho de que ante una situación pro-inflamatoria, el músculo opta por la fibrosis y no por la regeneración.

Por ello, hemos pensado como tratamiento suprimir estos mediadores pro-inflamatorios producidos por células del ambiente extracelular como linfocitos y macrófagos. Para ello, podríamos usar un anticuerpo sintético que sea capaz de unir a los mediadores pro-inflamatorios de manera local, para que no puedan disminuir la expresión de CD34. Al hacerlo de forma local potenciamos la proliferación de las células satélite sin afectar a la posible respuesta inmune que se pueda desencadenar ante falta de homeostasis en otras situaciones.

#### 4. Cèl·lules satèl·lit i el seu paper en la regeneració muscular

*Elias, Laia; Ren, Jordi; Sellés, Júlia*

*Ciències Biomèdiques*

La miogènesi embrionària es tracta d'un procés regulat per diferents factors de transcripció (FT). Així doncs, en les cèl·lules progenitores dels somites existeix una co-expressió dels FT Pax3/Pax7 que permeten l'expressió seqüencial de *myogenic regulatory factors* (MRF) com MyoD, Myf5, Miogenina i MRF4. Aquests MRF dirigeixen la diferenciació i determinació cap al llinatge muscular.

A nivell postnatal, Pax7 es continua expressant en les cèl·lules satèl·lit (MuSC). Aquestes cèl·lules comparteixen el mateix programa genètic que les cèl·lules progenitores dels somites i, per tant, tenen capacitat de regenerar les fibres musculars. Aquest elevat potencial miogènic fa de les cèl·lules satèl·lit possibles candidates terapèutiques per al tractament de lesions musculars relacionades amb malalties neuromusculars o amb l'edat.

Les cèl·lules satèl·lit es localitzen *stem cell niche* i aquest influeix sobre el potencial miogènic a través de factors extrínsecs. D'altra banda, les pròpies MuSC presenten factors intrínsecs que també contribueixen a la *stemness*.

Se'ns ha demanat hipotetitzar sobre una estratègia que combini tant factors intrínsecs com extrínsecs per tal de millorar *stemness* i la capacitat regenerativa muscular. La nostra hipòtesi estarà enfocada cap al tractament de la *duchenne muscular dystrophy* o DMD. La DMD es tracta d'una malaltia amb degeneració muscular progressiva a causa d'una mutació en el gen distrofina localitzat al cromosoma X.

Hem escollit una *somatic-cell therapy* basada en un trasplant autòleg de *Induced Pluripotent Stem Cells* (iPSC), ja que les iPSC respecte a altres tipus cel·lulars ja que creiem que tenen avantatges: al tractar-se d'un trasplantament autòleg no farà falta tractament amb immunosupressors, són fàcils d'aïllar perquè no s'extreuen del *stem cell niche* i la gran capacitat proliferativa permet obtenir un nombre elevat de cèl·lules.

Les iPSC s'han diferenciat a MuSC i, abans de ser trasplantades, s'han tractat per modular els factors intrínsecs i augmentar el potencial miogènic. Per una banda, la via p38 redueix el nombre de divisions cel·lulars asimètriques disminuint la capacitat de *self-renewal* de les MuSC, per tant es tracten amb inhibidors de p38. Per l'altra banda, la via JAK-STAT3 redueix el nombre de divisions cel·lulars simètriques disminuint la capacitat proliferativa, de manera que les MuSC es tracten amb inhibidors de STAT3.

Els factors extrínsecs es modulen tractant el pacient amb un fàrmac inhibidor de TGF-B i la senyal downstream que redueix la fibrosi muscular i per tant millora el microambient cel·lular del *stem cell niche*.

## 5. Harnessing the power of muscle regeneration

**Azcona Granada, Natalia; Díez Ribas, Sandra; Sancha Velasco, Ariadna; Sánchez Aced, Erika**

**Ciències biomèdiques**

Myogenesis is defined as the formation of muscle tissue, which is possible thanks to the regenerative capacity of satellite cells. These stem cells are inactive myoblasts that in embryonic development first express PAX3 and then express PAX7, both markers of this cell type. Thanks to these transcription factors, the muscle regulatory factors (MRFs) are expressed: Myf5, MyoD, MRF4 and myogenin, responsible for activating the transcription of specific muscle genes.

Muscle regeneration is very important in muscular dystrophies, injuries or elderly. In all these cases, fibrosis can be observed, which would indicate that muscle regeneration is limited. Furthermore, myogenesis capacity decreases with age and it is modulated by different intrinsic and extrinsic factors, for example autophagy and extracellular matrix molecules, respectively. Nowadays, a wide variety of therapies are being studied to enhance this process.

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a disease caused by a dystrophin deficiency. This protein is in charge of damping contraction and maintaining cell structure. In the absence of dystrophin, the muscle cell does not absorb contractions and dies. Therefore, the muscle is not able to maintain constant regeneration, which ends up causing progressive muscle weakness and fibrotic scarring. In this situation, it is very important to reduce fibrosis since it reduces blood flow and makes repair and regeneration more difficult. It was observed that in DMD the levels of miR-29c, which is a negative regulator of collagen, are reduced. Using adenoviruses, miR-29c mimics could be developed to normalize gene expression in disease states. In addition, miR-29c also promotes muscle regeneration through downregulation of YY1, a transcriptional repressor of myogenesis. However, research by Heller et al <sup>[1]</sup> in *mdx* mice showed a reduction in collagen and increased muscle strength, but this was not enough to reach wild type levels. Therefore, we propose the combined use with drugs that inhibit the JAK-STAT pathway, since it is demonstrated that an increase in targets of this pathway decreases muscle regeneration. Thus, a study by Price et al <sup>[2]</sup> showed that removing Jak2 or Stat3 significantly stimulated the symmetrical divisions of satellite stem cells in cultured myofibers. It was also seen that in isolated satellite cells their ability to repopulate the niche was remarkably improved after performing a muscle transplant. Consequently, a combined therapy of miR-29c and inhibitory drugs of the JAK-STAT pathway would not only promote muscle regeneration and repair but would also increase muscle strength.