



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias
Experimentales

Células madre y su papel en la regeneración muscular

Autor: Diego Dueñas Cano

Grado: Biología

Fecha: 02/07/2024



CREA



Universidad de Jaén



Trabajo Fin de Grado

Células madre y su papel en la regeneración muscular

Alumno: Diego Dueñas Cano

Jaén, Julio, 2024

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Identificación de las células satélite.....	3
1.2 Origen embrionario.....	6
2 OBJETIVOS.....	7
3 METODOLOGÍA	7
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1 Características de las células satélite.....	8
4.1.1 Heterogeneidad	8
4.1.2 Autorrenovación.....	10
4.2 Regulación del ciclo celular en las células satélite	13
4.2.1 Quiescencia	13
4.2.2 Activación y proliferación	16
4.2.3 Diferenciación y vuelta a la quiescencia	18
4.3 Influencia del nicho.....	20
4.3.1 Lámina basal.....	21
4.3.2 Fibras musculares.....	21
4.3.3 Células endoteliales	22
4.3.4 Células inmunitarias.....	24
4.3.5 Progenitores fibro-adipogénicos	25
4.4 Efectos del envejecimiento en la regeneración muscular	25
4.4.1 Alteraciones de los factores extrínsecos.....	25
4.4.2 Alteraciones de los factores intrínsecos.....	28
4.5 Células satélite en medicina regenerativa	30
4.5.1 Potencial terapéutico de las células satélite.....	30
4.5.2 Suplementación del medio con factores estimuladores de la propagación	31
4.5.3 Bioingeniería aplicada a las células satélite.....	32
4.5.4 Futuras líneas de investigación y posibles alternativas	33
5 CONCLUSIÓN	35
6 BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

El músculo es un tejido con gran complejidad, regulado por una intrincada maquinaria biológica. Las fibras musculares, sus unidades funcionales, pueden ser destruidas o dañadas tras ciertos estímulos, desencadenando un sofisticado proceso, la regeneración muscular. En este contexto, las células satélite, que se sitúan en la periferia de las fibras musculares, han sido un importante foco de estudio de la biología desde que se descubrieron en 1961 por Alexander Mauro. Estas células tienen la capacidad de actuar como células madre, proliferando activamente para finalmente diferenciarse y formar nuevas fibras o fusionarse con las que han sido dañadas. En este trabajo se detallarán los aspectos principales de las células satélite: su origen, características, la regulación de su ciclo celular por diversos factores y células que componen su nicho, las alteraciones que causa en ellas el envejecimiento y su aplicación en el ámbito de las terapias regenerativas.

ABSTRACT

The muscle is a tissue of great complexity, regulated by an intricate biological machinery. Muscle fibers, its functional units, can be destroyed or damaged upon certain stimuli, triggering a sophisticated process, muscle regeneration. In this context, satellite cells, located on the periphery of muscle fibers, have been a significant focus of study in biology since they were discovered in 1961 by Alexander Mauro. These cells have the ability of developing as stem cells, proliferating actively to eventually differentiate and form new fibers or fuse with those that have been damaged. In this work, It will be detailed the main aspects of satellite cells: their origin, characteristics, the regulation of their cell cycle by diverse factors and cells that compose their niche, the alterations caused in them by aging, and their application in the field of regenerative therapies.

1 INTRODUCCIÓN

Los músculos esqueléticos son las principales unidades funcionales del sistema muscular, ya que han evolucionado para permitir la capacidad de movimiento en los animales. A su vez, la unidad funcional del músculo esquelético son las fibras musculares, unas células multinucleadas que, en muchos casos, contienen cientos de núcleos. Estas fibras están compuestas por la unión de numerosos mioblastos, sus células precursoras, durante la embriogénesis y el desarrollo embrionario.

Sin embargo, las fibras musculares pueden sufrir daños a lo largo de la vida. Cuando el músculo sufre un estímulo lesivo, sus fibras musculares se destruyen. Tras la rotura, una serie de eventos biológicos que se engloban en lo que conocemos como regeneración muscular se suceden en cadena (Fig. 1.1). Unas células llamadas células satélite (CS) son las principales reguladoras de este proceso, aunque su función se ve altamente influenciada por diversos factores extrínsecos e intrínsecos. Por tanto, en el momento que se produce la lesión, las CS, que estaban en un estado quiescente, se activan y entran en el ciclo celular. Durante el ciclo proliferan en gran medida para generar una población de células musculares progenitoras, llamadas mioblastos, que se fusionarán a las fibras musculares existentes, o entre ellos para formar nuevas fibras. Una fracción de estas células volverá al estado de quiescencia, autorrenovándose y reconstituyendo la reserva de CS, lo que permitirá que este proceso se vuelva a repetir cuando sea necesario (Forcina et al., 2020)

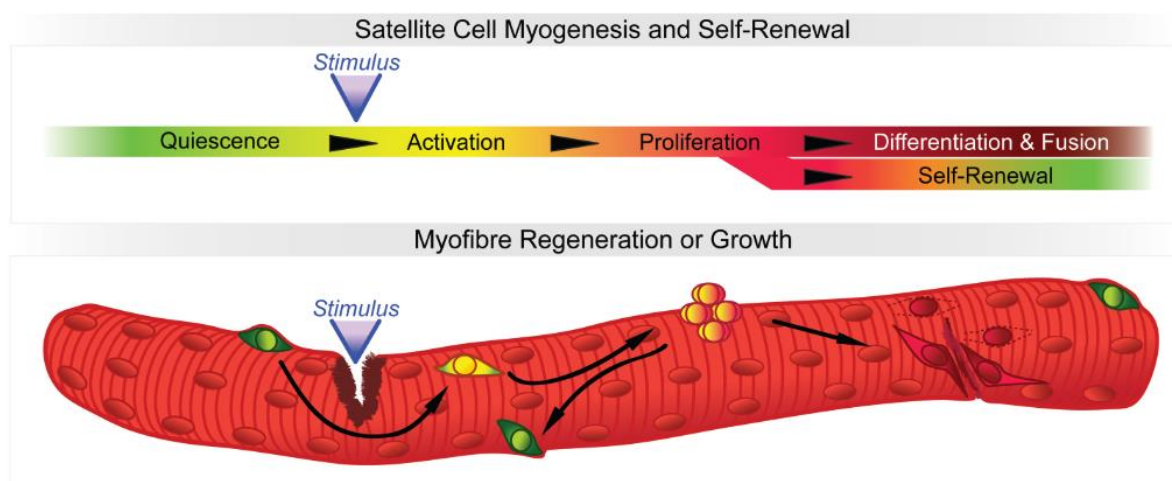


Figura 1.1; Etapas de la regeneración muscular y el ciclo celular de las CS (Ganassi & Zammit, 2022).

1.1 Identificación de las células satélite

Hace más de 150 años, hacia mitades del siglo XIX, mediante técnicas de microscopía se documentaron las primeras observaciones de la capacidad regenerativa que presentaba el músculo esquelético tras una lesión. A pesar de ello, las bases celulares que subyacen a este proceso aún eran desconocidas. Habría que esperar más de 100 años para empezar a dilucidar las primeras pistas sobre los pilares de la regeneración muscular (Brack & Rando, 2012).

En 1961, Alexander Mauro, biofísico de la Universidad de Rockefeller, detectó con microscopía electrónica unas células mononucleadas cerca de las fibras musculares. Debido a su situación anatómica, bautizó a estas células como “células satélite”, ya que se encontraban siempre en la periferia de una fibra muscular, incrustadas entre el sarcolema de la fibra y la lámina basal (Fig. 1.2). Sin evidencias que lo respaldaran, Mauro teorizó que estas células podían tener un rol relevante en el desarrollo del proceso de regeneración muscular, por su posición cercana a las fibras musculares (Mauro, 1961).

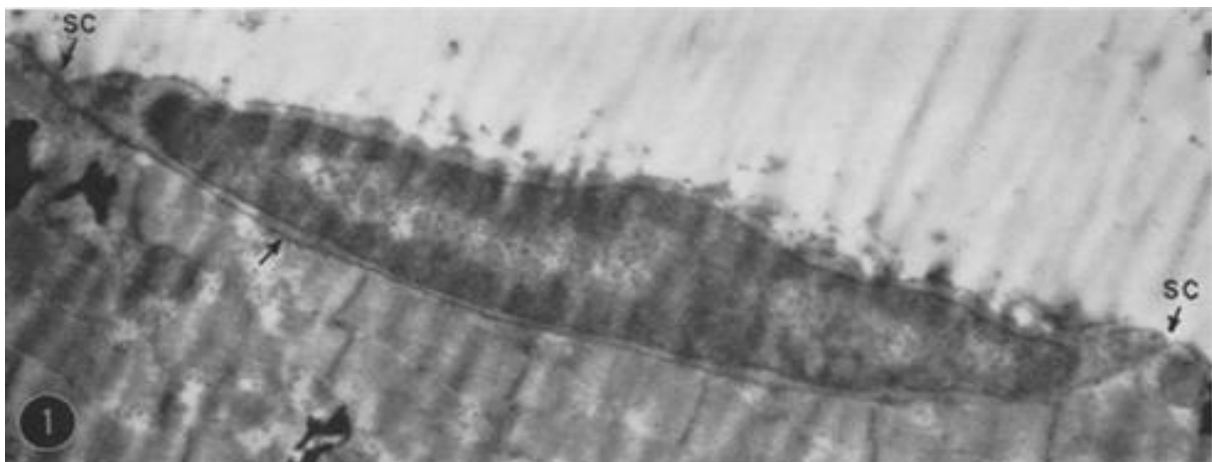


Figura 1.2; Imagen publicada por Alexander Mauro en 1961 en la que podemos observar una de las primeras CS identificadas en microscopía. Las flechas marcadas como “SC” indican los extremos de la célula y la flecha sin marcar indica el sarcolema (Mauro, 1961).

Pocos años más tarde una serie de estudios confirmarían la teoría de Mauro. Para ello usaron timidina tritiada, es decir, timidina a la que se le ha añadido un radioisótopo llamado tritio, que al unirse a una célula emite una señal radioactiva. Al ser un precursor del ADN, la captación de timidina por una célula es un indicativo de que esta célula está sintetizando ADN, y por tanto se está dividiendo (Cavanagh et al., 2011).

Se demostró que cuando se suministraba una pequeña dosis de timidina tritiada a una rata joven en desarrollo postnatal, los núcleos de las CS quedaban marcados. Al realizar un seguimiento de los núcleos se observó que a las 24 horas el número de estos era el doble, y por tanto, se dividían por mitosis. Curiosamente, tras la mitosis la mitad de estos núcleos eran incorporados a la fibra muscular en crecimiento, mientras que la otra mitad volvía a dividirse, repitiéndose así la división de forma cíclica. Por tanto, se demostró que las CS se dividen repetidamente y que son la fuente de los núcleos de las fibras musculares (Moss & Leblond, 1971).

Se realizó otro estudio en el que se suministraron inyecciones de timidina a ratas en desarrollo embrionario. Tras un periodo de maduración de unas 5 semanas, se observó que las CS no estaban marcadas (ya que estas no están activas en el desarrollo embrionario), mientras que parte de los núcleos de las fibras si lo estaban. Tras triturar el músculo, los mioblastos no aparecieron marcados. Por otro lado, se inyectó timidina en ratas en desarrollo postnatal, de unos 18 días y tras su sacrificio en las siguientes horas, se observó que las CS si habían quedado marcadas. Al trasplantar estas células en músculo dañado, los mioblastos si que quedaron marcados en esta ocasión. De esta manera, se pudo demostrar que las CS son capaces de sobrevivir las lesiones y el trasplante para convertirse en células miogénicas en regeneración, y constituyen por tanto una importante población celular con capacidad regenerativa (Snow, 1977).

Sin embargo, a pesar de las prometedoras características de las CS que se habían podido observar en estos estudios, el aislamiento de esta población seguía siendo un reto debido a la ausencia de un marcador uniforme para todas las CS. Finalmente, mediante diversas técnicas de análisis genético, como la hibridación in situ o el análisis de diferencia representacional (RDA), se identificó el factor de transcripción paired box 7 (Pax7) específicamente en mioblastos derivados de CS, así como en CS residentes en el músculo adulto. Técnicas de cultivo celular y microscopía electrónica demostraron la completa ausencia de CS en aquellos ratones mutantes que no expresaban Pax7. Esto hizo que se considerase a Pax7 como un marcador uniforme de las CS, lo que facilitaba en gran medida su identificación y aislamiento (Fig. 1.3) (Seale et al., 2000).

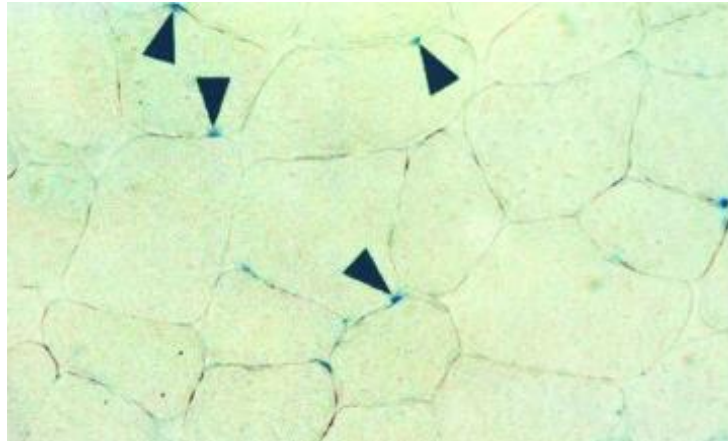


Figura 1.3; Expresión de Pax7 en las fibras musculares, que concuerda con la localización y frecuencia de las CS (Seale et al., 2000).

En 1987, una serie de estudios descubrieron en mioblastos el factor de transcripción MyoD. Poco después, fueron descubiertos otros 3 factores de transcripción presentes en el linaje del músculo esquelético: Myf5, miogenina y MRF4. Estos 4 factores fueron llamados “factores reguladores miogénicos” debido a sus papeles en la regulación de la miogénesis. Myf5 y MyoD son los primeros en expresarse en el ciclo celular de las CS, mientras que los factores miogenina y MRF4 se expresan en etapas más terminales de la diferenciación (Fig. 1.4). Además de expresarse en la etapa embrionaria, estos factores vuelven a tener relevancia durante la regeneración en el músculo adulto (Bentzinger et al., 2012). Su mecanismo de acción consiste en la unión a los promotores o amplificadores de diversos genes musculares, conduciendo las CS hacia el linaje miogénico (Asfour et al., 2018).

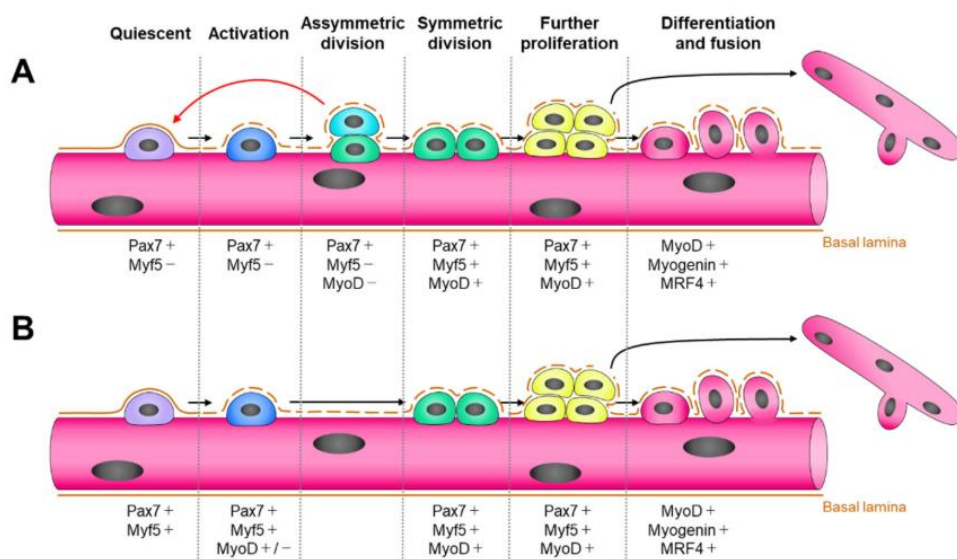


Figura 1.4; Expresión de los factores reguladores miogénicos durante diferentes etapas del desarrollo de las células satélite (Shirakawa et al., 2022).

1.2 Origen embrionario

Muchos estudios sugieren que el origen embrionario de las CS está ligado al origen de los músculos concretos a los que están asociados. Por tanto, para dilucidar el origen de las CS, es imprescindible comprender la ontogenia de los músculos esqueléticos. El estudio en biología del desarrollo ha permitido establecer que los músculos de extremidades y tronco presentan un origen somítico. Las somitas son estructuras segmentadas formadas durante el desarrollo embrionario a los lados del tubo neural a partir del mesodermo axial (Gros et al., 2005).

En resumen, los sucesos que dan lugar a la formación de los músculos de extremidades y tronco, y por tanto a su población de CS, son los siguientes: En primer lugar, las somitas se dividen en dos compartimentos: El esclerotomo (dará lugar al esqueleto axial y las costillas), y el dermomiótomo (dará lugar a los músculos de tronco y extremidades). Las células precursoras del músculo que se sitúan en los extremos dorsomedial, ventrolateral, rostral y caudal pasarán por transiciones epitelio-mesénquima, en las que perderán sus características epiteliales y adquirirán capacidades migratorias, y formarán el miótomo. Más tarde, las células de la parte central del dermomiótomo también llegarán al miótomo para contribuir a su crecimiento. La región dorsomedial del miótomo dará lugar a la musculatura de la espalda y la región ventrolateral a los músculos del abdomen, el diafragma y los intercostales. Por otro lado, parte de las células del dermomiótomo ventrolateral migrarán hacia las yemas de las extremidades para más tarde formar la musculatura de las mismas (Araújo et al., 2021).

Al contrario que los músculos de extremidades y tronco, que presentan un origen embrionario homogéneo, los músculos de la cabeza presentan diversos orígenes. Así, los músculos branquioméricos (asociados a los arcos faríngeos en el embrión), además de la mayoría de músculos extraoculares, se forman a partir del mesodermo paraxial craneal (localizado anterior a los somitas). Los músculos del cuello posterior y de la lengua derivan de los somitas occipitales, mientras que una pequeña parte de los músculos extraoculares derivan de la lámina precordial. Ha sido demostrado que, al igual que en tronco y extremidades, las CS de estos músculos se origina a partir de sus correspondientes músculos embrionarios (Yin et al., 2013)

2 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es conocer y describir las principales características de las células satélite, así como su papel en el proceso de regeneración muscular y sus posibles aplicaciones en biomedicina. En base a ello se han seguido los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la heterogeneidad existente dentro de la población de células satélite.
- Entender las etapas que las células satélite atraviesan durante su ciclo celular, así como los factores que regulan dichas etapas.
- Indagar en los efectos negativos que el envejecimiento tiene sobre las células satélite, y por tanto, sobre la regeneración.
- Estudiar las aplicaciones de las terapias basadas en células satélite en el ámbito de la medicina regenerativa.

3 METODOLOGÍA

En este trabajo se ha realizado una exhaustiva revisión bibliográfica mediante la consulta de las principales bases de datos de carácter científico: Pubmed, Scopus, Scielo, Google Scholar y ScienceDirect. Gran parte de los artículos que han sido finalmente seleccionados para la realización del trabajo han sido publicados en las revistas científicas más prestigiosas a nivel mundial en el ámbito de la biología celular, como Nature, Science o Cell Stem Cell. Los artículos escogidos han sido publicados entre 1961 y 2023.

Las principales palabras clave utilizadas en la búsqueda de documentos han sido: satellite cells, muscle regeneration, skeletal muscle, stem cells, muscle fibers, myocytes, activation, quiescence, proliferation, differentiation, injury, self-renewal, satellite cells niche, aging, regenerative medicine, satellite cells therapies, bioengineering.

Con el objetivo de obtener información actualizada se han excluido la mayoría de artículos anteriores a los últimos 20 años. Sin embargo, esto no aplica para aquellos artículos en relación a cuestiones que se estudiaron y definieron anteriormente,

como es el caso del origen embrionario o la identificación de las células satélite. Mayoritariamente, los artículos que tratan el resto de temáticas son posteriores al año 2010.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se profundizará en los tópicos más estudiados en la actualidad de la biología de las CS en relación con la regeneración muscular: Sus principales características, la regulación de su ciclo celular, el control ejercido sobre las CS por parte de los componentes de su nicho, el impacto del envejecimiento y sus posibles aplicaciones terapéuticas.

4.1 Características de las células satélite

4.1.1 Heterogeneidad

Originalmente, se pensaba que las CS eran una población homogénea comprometida en el linaje muscular. Sin embargo, las investigaciones de las últimas décadas han demostrado que, en diversos aspectos, estas células constituyen una población con gran heterogeneidad, pudiendo dividirse así en diferentes subpoblaciones (Feige et al., 2018).

Respecto a la expresión de genes, las CS expresan de forma uniforme el factor de transcripción Pax7, y solo algunas poblaciones presentan Pax3. Estas poblaciones se encuentran principalmente en los músculos del diafragma, ventrales y gran parte de las extremidades anteriores. Para observar si esta diferencia tenía alguna influencia funcional, se han estudiado diferentes modelos de ratones adultos en los que se suprimía la presencia de Pax3 y Pax7. La pérdida de Pax3 no supone efectos en los músculos, lo cual es coherente ya que buena parte de estos no lo presentan en sus CS, dado que este factor de transcripción es esencial en la miogénesis en el embrión, pero no en la vida adulta (Relaix et al., 2006). Sin embargo, la ausencia de Pax7 lleva a la imposibilidad del crecimiento y la regeneración en el músculo adulto por la pérdida progresiva del “pool” de CS, debido a su muerte por apoptosis (Von Maltzahn et al., 2013).

Mediante técnicas de secuenciación de ARN (ARN-seq) de célula única se ha podido analizar el transcriptoma de diferentes CS, viéndose así que la variabilidad también se encuentra en los niveles de expresión de otros genes. Así, se observó una gran diversidad en la expresión de genes relevantes en la regulación miogénica, como es el caso de Pax7, Myf5 o MyoD (Cho & Doles, 2017).

En cuanto al potencial de trasplante, se han realizado estudios evaluando la capacidad regenerativa de diferentes poblaciones de CS. Mediante el marcaje de CS por su expresión de una proteína verde fluorescente (GFP:Green fluorescent protein), se observaron comportamientos diversos de las CS en el músculo en crecimiento. Parte de las células permanecían marcadas por la GFP, al no dividirse o hacerlo en menor medida, mientras que en otras la concentración de GFP se diluía, producto de múltiples divisiones. Al transplantar estas células, se observó que las que retenían la GFP tenían capacidad de autorenovarse, mientras que las que habían perdido la GFP estaban en gran medida restringidas a la diferenciación. Esto demuestra que, en este sentido, existen dos poblaciones. Una de ellas se encuentran más comprometidas a la diferenciación y se dividen activamente, mientras que otras actúan como reserva, y se mantienen indiferenciadas con capacidad de autorrenovarse (Chakkalakal et al., 2014).

Trasplantando CS con altos niveles de expresión de Pax7 (Pax7^{high}) junto a células con bajo contenido en Pax7 (Pax7^{low}), se observó que las primeras eran capaces de dar lugar a ambas subpoblaciones, mientras que las segundas no eran capaces de derivar en células Pax7^{high}. Sin embargo, no se observaron diferencias en el potencial de trasplante de las poblaciones, ya que ambas mostraron efectividad similar en múltiples trasplantes en serie (Rocheteau et al., 2012). En los últimos años ha habido controversia respecto a la necesidad de Pax7 en la regeneración muscular, ya que ciertos estudios han mostrado que puede ser prescindible en este proceso (Brack, 2014). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que este factor es transcripcionalmente activo durante la quiescencia y la proliferación de las CS y promueve su supervivencia (Buckingham & Relaix, 2015).

De forma similar al estudio anterior, el trasplante de dos grupos de CS, unas que expresaban Myf5 (Myf5⁺) y otras que no lo expresaban (Myf5⁻), demostró que las células Myf5⁻ eran efectivas, contribuyendo a la formación de fibras musculares en

todo el cuerpo y reestableciendo ambas poblaciones en el músculo dañado, tanto Myf5⁻ como Myf5⁺. Sin embargo, al trasplantar células Myf5⁺, se observó que no eran capaces de generar nuevas fibras más allá del sitio de inyección y no reponían el “pool” de CS. Estas evidencias también demuestran la existencia de ciertas poblaciones comprometidas a la diferenciación y otras totalmente indiferenciadas (Kuang et al., 2007).

Estos estudios apoyan una clara relación entre las diferencias en la expresión de los genes mencionados y la función de las CS. Así, la quiescencia, activación y proliferación estarán claramente influenciados por estas diferencias (tal y como se expone en el punto 4.2).

4.1.2 Autorrenovación

Una de las principales características de toda célula madre es su capacidad para autorrenovarse. Esto lo pueden hacer de dos maneras (Morrison & Kimble, 2006):

- Por división asimétrica, en la que una de las células hijas mantiene su indiferenciación, mientras que la otra se compromete a la diferenciación (Fig. 4.1).
- Por división simétrica, en la que ambas células hijas mantienen el mismo grado de diferenciación, y por tanto la misma potencia (Fig. 4.1).

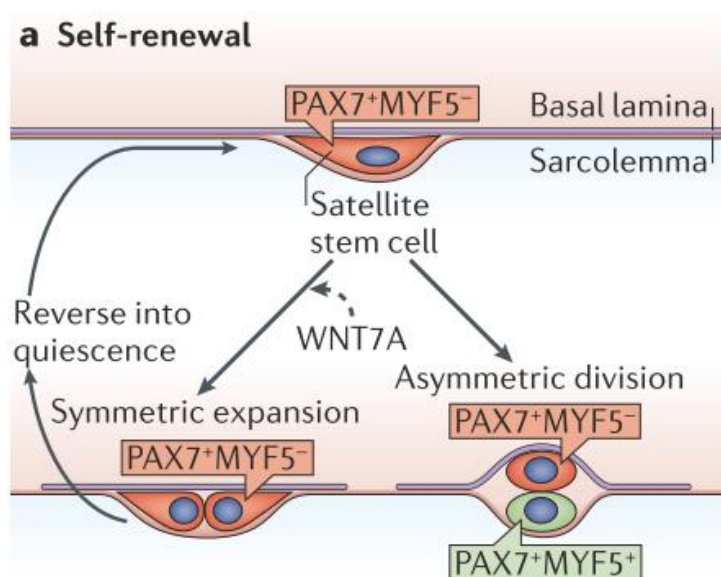


Figura 4.1; Esquema de los posibles tipos de división en las CS que garantizan la autorrenovación de las mismas (Xin Wang & Rudnicki, 2012).

Se observó en las CS que, a la hora de dividirse, las células hijas se disponían de dos formas (Fig 4.1). Unas con orientación apicobasal (una orientada hacia la fibra y otra hacia la lámina basal) y otras con orientación planar (paralelas al plano de la fibra muscular, ambas situadas al mismo nivel y adyacentes a la fibra). En el primer caso, la mayoría de células hijas adoptaban diferentes destinos, provenían por tanto de una división asimétrica. En cambio, cuando la orientación de las células hijas era planar, ambas contenían los mismos marcadores, es decir, las dos eran Pax7⁺/Myf5⁺ o Pax7⁺/Myf5⁻, lo cual es una clara prueba de que provenían de una división simétrica. Esto nos indica que el tipo de división por la que pasan las CS, y por tanto el destino de las CS hijas, está en gran medida relacionado con la orientación que estas adopten al dividirse (Kuang et al., 2007).

Respecto a la división simétrica, el mecanismo que fomenta este proceso es la activación de la vía de la polaridad celular planar. La señal producida por el ligando Wnt7a induce la distribución polarizada de la proteína de membrana Vangl2 (proteína efectora de la polaridad celular planar), que transmite señales direccionales para que la división de la célula siga el plano paralelo a la fibra. Se observó que el silenciamiento de Vangl2 resultaba en un incremento de las divisiones apicobasales, mientras que la sobreexpresión de Wnt7a inducía un mayor número de divisiones simétricas. Por tanto, se concluyó que la vía de la polaridad celular planar, activada gracias a Wnt7a, es estrictamente necesaria para la división simétrica de las CS (Dumont et al., 2015; Le Grand et al., 2009).

La división asimétrica se basa en la expresión de diferentes factores por parte de las células hijas, que les hará adquirir una u otra ruta. Se ha observado que, en la división asimétrica de CS Myf5⁻, (como se ha expuesto antes, puede dar lugar a células Myf5⁻ y Myf5⁺) la célula hija Myf5⁻ presenta altos niveles del receptor Notch-3. Por otra parte, la célula Myf5⁺ aumenta la expresión del ligando de Notch-3, Delta-1. En base a estos datos, es muy probable que la activación de la vía de señalización Notch, mediada por la interacción del ligando Delta-1 y el receptor Notch-3, tenga un papel principal en la autorrenovación de las CS (Kuang et al., 2007). Adicionalmente, el incremento en la expresión de la proteína inhibidora de la vía Notch; Numb, en una de las células hijas lleva a que esta se comprometa a la diferenciación (Conboy & Rando, 2002).

La vía Notch produce la inhibición de MyoD y la diferenciación miogénica, así como el aumento de la expresión del factor Pax7, que es expresado de manera constitutiva por las CS indiferenciadas (Wen et al., 2012). El mecanismo que subyace a la inhibición de la diferenciación miogénica es la expresión de diversos genes, como los represores de las familias Hes y Hey (desarrollado en el punto 4.2.1).

Por el contrario, la otra célula hija se compromete a la diferenciación gracias a su capacidad para expresar Myf5. Esto se debe a la presencia de Carm1, una proteína encargada de catalizar la metilación de los residuos de arginina en el extremo N-terminal de Pax7. Tras esto, Pax7 metilada se une a una proteína llamada MLL 1/2 y recluta a otras proteínas formando un complejo que se une al promotor de Myf5, donde fomentan la transcripción de este factor regulador miogénico gracias a la inducción de la marca epigenética H3K4me3, que produce modificaciones en la cromatina del locus de Myf5 (Fig. 4.2) Estas modificaciones llevan a un estado permisivo de la cromatina que facilita la transcripción del gen Myf5 (Kawabe et al., 2012; McKinnell et al., 2008).

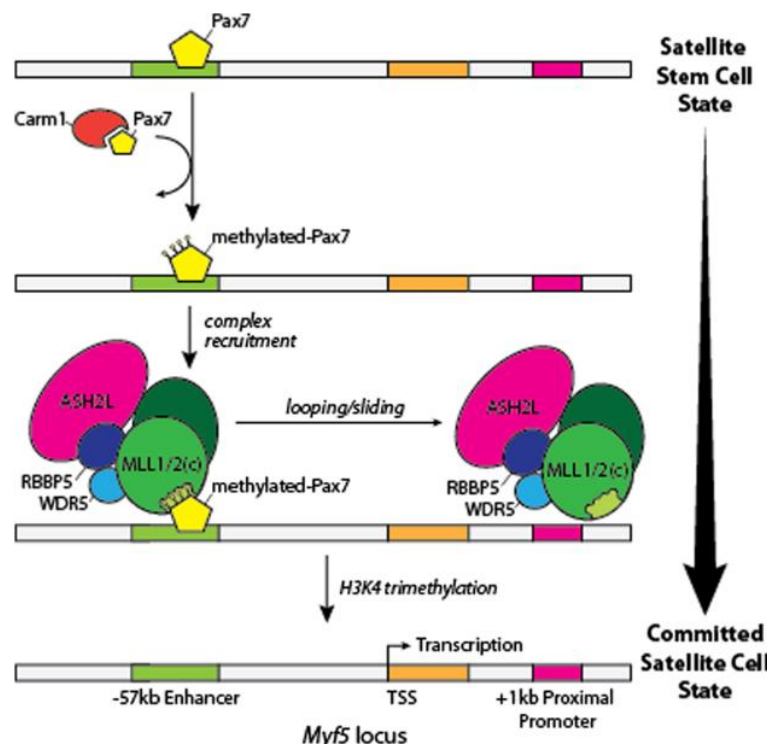


Figura 4.2; Representación esquemática del proceso de transcripción de Myf5 en la célula hija comprometida a la diferenciación, facilitado por la acción de Carm1, Pax7 y el complejo ASH2L:MLL1/2:WDR5:RBBP5 (Kawabe et al., 2012).

Adicionalmente, se ha observado la distribución desigual de otros factores en las divisiones asimétricas. Por ejemplo, en condiciones de hipoxia se da un gran incremento de las divisiones asimétricas destinadas a la autorrenovación, en la que una célula hija es Pax7⁺/MyoD⁻ y otra es Pax7⁺/MyoD⁺ (Liu et al., 2012).

Como se ha visto, las CS pueden cumplir con la expansión del "pool" de células mediante la división simétrica, o favorecer el mantenimiento del "pool" y la generación de progenitores comprometidos a la diferenciación a través de las divisiones asimétricas. La elección de una u otra ruta estará determinada por las necesidades concretas del músculo, pudiendo alternar en diferentes etapas (Evano et al., 2020).

4.2 Regulación del ciclo celular en las células satélite

La regeneración muscular se divide en varias etapas: Activación, proliferación, diferenciación y retorno a la quiescencia. La regulación del ciclo de las CS es vital para el correcto desarrollo de estas etapas, para lo que existen diversos mecanismos que se exponen a continuación (Dumont et al., 2015).

4.2.1 Quiescencia

Las CS en el músculo adulto, antes de entrar en su ciclo celular, se encuentran en un estado conocido como quiescencia o etapa G₀. Esta etapa es estrictamente necesaria para la conservación del "pool" de CS, ya que permite conservar abundantes células sin diferenciar preparadas para la activación tras un estímulo que lo requiera (Mourikis et al., 2012).

El uso de tecnología de análisis con microarrays confirmó que las CS quiescentes (CSQs) presentan un aumento en la expresión de más de 500 genes (principalmente reguladores negativos del ciclo celular e inhibidores de la miogénesis) que, en el caso de las células activas, no están expresados. Entre los genes expresados preferiblemente en las CSQs se encuentran aquellos involucrados en la adhesión celular, la regulación del crecimiento de la célula, la formación de la matriz extracelular, el transporte de lípidos y la homeostasis de cobre y hierro. Adicionalmente, se observó que el receptor de la calcitonina estaba exclusivamente expresado en CSQs, y la estimulación con calcitonina retrasaba la activación de

estas células. Esto sugiere un rol importante del receptor de la calcitonina en el mantenimiento de la quiescencia (Fukada et al., 2007).

Existen múltiples evidencias del papel de la vía de señalización Notch en la regulación transcripcional de los genes encargados de mantener la quiescencia. Esto es respaldado por la mayor actividad de esta vía en CSQs que en células activadas, así como la presencia aumentada de los receptores Notch en la etapa G₀ y su ligando Delta (Conboy & Rando, 2002).

Cuando el ligando se une al dominio extracelular del receptor Notch induce la proteólisis del receptor, y su dominio intracelular es translocado al núcleo, donde se une a la proteína RBP-J. Esta proteína, que en ausencia de la señal Notch inhibe la transcripción de sus genes diana, recibe la señal y activa la transcripción de dichos genes. Entre estos genes se encuentran los de las familias de genes Hes y Hey, que son represores vitales para el mantenimiento de las células en un estado indiferenciado, ya que reprimen la expresión de otros factores importantes para la diferenciación, como MyoD y miogenina (Bjornson et al., 2012).

La epigenética tiene una clara influencia en la expresión de los genes necesarios para la quiescencia de las CS. Gran parte de los genes relevantes en el mantenimiento de la quiescencia y conocidos marcadores de las CS, como Pax7, presentan en CSQs la modificación epigenética H3K4me3 en las histonas asociadas a su cromatina. Esta modificación conlleva una remodelación en la cromatina, que hace que el ADN sea más accesible para los factores de transcripción, facilitando así la transcripción de dichos genes (Liu et al., 2013). Por el contrario, el gen que codifica el factor MyoD, que es necesario para la transición hacia la diferenciación de la célula, está marcado por las modificaciones H3K9me2 y H4K20me2, que conllevan un estado represivo de la cromatina, inhibiendo la transcripción del gen (Luo et al., 2017).

La quiescencia también es regulada post-transcripcionalmente por ciertos microRNAs (miRNAs). La represión de la ruta de síntesis de los miRNAs, a través de la ablación de la enzima Dicer, que se encarga de formar los miRNAs maduros en el citoplasma, conlleva la pérdida espontánea de la quiescencia y la activación de las CS. Uno de los principales miRNAs que regulan la quiescencia es el miRNA-489. Su función es reprimir el oncogén Dek, cuya proteína producto fomenta la proliferación

de los progenitores miogénicos (Cheung et al., 2012). Otro ejemplo de regulación post-transcripcional del estado de quiescencia es el de la proteína de unión al ARN llamada tristetrapolina. Esta proteína se une al ARNm de MyoD y provoca su degradación (Hausburg et al., 2015).

Se ha observado en el análisis del transcriptoma de CSQs la retención de intrones en el ARNm de genes con funciones fundamentales en la activación de las CS, como la traducción de proteínas, la entrada al ciclo celular o la especificación del linaje, por lo que esta retención supone otro mecanismo que impide la activación prematura de las CS (Yue et al., 2020).

Como se expone en el siguiente apartado, la acetilación de las histonas asociadas a determinados genes es un proceso clave para la proliferación de las CS, así como su evolución en el ciclo celular. Las CSQs producen mayoritariamente la energía mediante la β -oxidación. Esto lleva a menores niveles de acetilación de histonas, debido al uso de acetil-coA (sustrato de la reacción de acetilación) en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), y mayores niveles de NAD^+ , que conllevan la activación de SIRT1, una enzima desacetilasa dependiente de NAD^+ (Fig. 4.3) (Sousa-Victor et al., 2021) (Ryall et al., 2015). Por tanto, la inhibición del proceso de acetilación por parte de las CSQs les permite impedir su entrada en el ciclo.

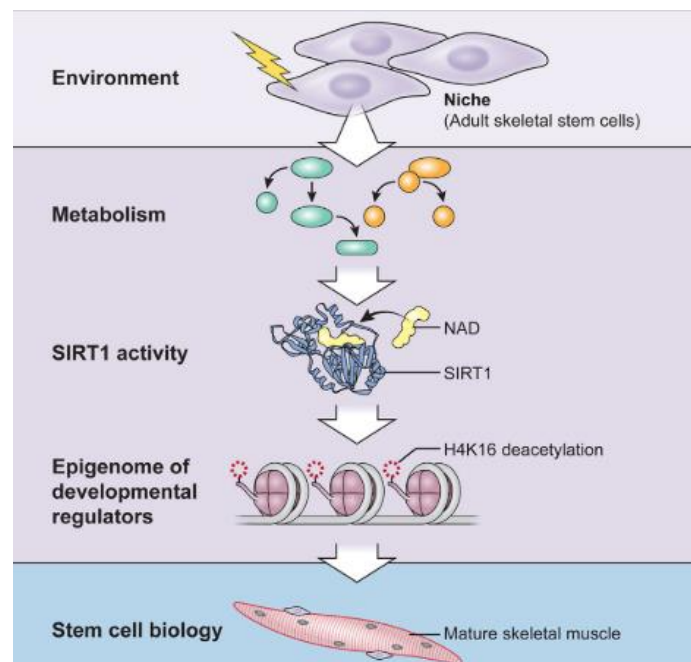


Figura 4.3; Proceso de desacetilación por la enzima SIRT, propiciado por mayores niveles de NAD en el medio (Ryall et al., 2015).

4.2.2 Activación y proliferación

Tras un estímulo que induzca una respuesta de las CS, y su consiguiente entrada en el ciclo celular, como una lesión muscular, las células pierden su estado quiescente y pasan a ser células satélite activadas (CSAs). Para esta etapa existen también una serie de reguladores a distintos niveles, que ejercen un efecto contrario al de los reguladores que mantienen la quiescencia, anulando sus efectos y permitiendo la entrada de las células en el ciclo celular, en el que se producirá su continua proliferación.

La vía de señalización Wnt juega un importante rol durante la proliferación. Esta ruta se activa por la unión de proteínas Wnt a sus receptores, llamados Frizzled. Por una parte, puede producir la activación de la vía de la polaridad celular planar, fomentando la división simétrica como se ha descrito anteriormente. Además, existe otra ruta en la que la activación de Wnt provoca la translocación al núcleo de β -catenina, una proteína que forma parte de las uniones adherentes. Una vez en el núcleo, β -catenina interactúa con los factores de transcripción Tcf/Lef, fomentando la transcripción de genes cruciales para la proliferación de las células (Yin et al., 2013).

Se ha descrito un rol esencial del factor de transcripción FoxM1 para el mantenimiento de la proliferación. Este factor regula la expresión de dos ARNs no codificantes: Sngh8, que promueve la proliferación mediante la transcripción de proteínas ribosómicas; y Gm26917, que actúa reprimiendo la apoptosis de las CS. Adicionalmente, el silenciamiento de FoxM1 en el músculo esquelético resultó en la disminución de la proliferación y el aumento de la apoptosis de las CS (Chen et al., 2018).

Epigenéticamente, de la misma forma que durante la quiescencia se observa la marca H3K4me3 en las histonas de genes asociados a la inhibición de la entrada en el ciclo celular, en las CSAs esta misma marca está presente en las histonas de aquellos que impulsan el ciclo celular. Por ejemplo, tras la activación, las histonas asociadas al gen MyoD pierden las marcas que propiciaban un ambiente represivo de su cromatina y adquieren la marca H3K4me3, que facilita la transcripción del gen (Luo et al., 2017). El gen Myf5, que al igual que MyoD requiere un aumento en la expresión de sus niveles para la correcta evolución del ciclo celular, también presenta la modificación H3K4me3 tras la activación, gracias a un proceso en el que

tienen gran importancia el factor Pax7 y la proteína Carm1 (desarrollado en el punto 4.1.2) (McKinnell et al., 2008). Adicionalmente, las CSAs adquieren la marca represiva H3K27me3 en los genes inhibidores del ciclo (Massenet et al., 2021).

La metilación del ADN es otro factor que regula la activación y la proliferación celular. Se ha observado que la ADN metiltransferasa Dnmt3a regula la expresión, principalmente reprimiéndola, de una proteína inhibidora de quinasas dependientes de ciclina que se expresa en la diferenciación, llamada p57Kip2. La inactivación de Dnmt3a en CS lleva a una disminución notable en la capacidad proliferativa, además de niveles inusualmente elevados de p57Kip2. A su vez, La represión posterior de p57Kip2 restaura la capacidad proliferativa de las CS. Por tanto, se puede deducir que la interacción Dnmt3a-p57Kip2 es necesaria en las CSAs para la regulación de la proliferación y el mantenimiento de sus funciones (Naito et al., 2016).

El estado de activación de las células es promovido por el aumento de la acetilación en la lisina 16 de la histona H4 (H4k16ac). Esta marca está asociada a un incremento en la expresión de determinados genes, en este caso genes del ciclo celular, ya que produce una disminución en la afinidad entre las histonas y el ADN, que facilita la transcripción de los genes a los que afecta (Shogren-Knaak et al., 2006). El incremento en la acetilación se debe a una “reprogramación” metabólica en la que la β - oxidación, ruta que se daba en las CSQs, se sustituye por la glucólisis en CSAs. Dicha reprogramación disminuye los niveles de NAD⁺ intracelular y, por ende, la actividad de la enzima desacetilasa SIRT1 (Ryall et al., 2015). Además, las CSAs también muestran un incremento en la fosforilación oxidativa respecto a las CSQs, aunque se basan principalmente en la glucólisis para la obtención de energía. En etapas más avanzadas del ciclo se irá aumentando la activación de la fosforilación oxidativa respecto a la glucólisis (Pala et al., 2018).

Adicionalmente, este cambio metabólico permite la utilización del acetil-coA para la acetilación de las histonas. Mientras que la β -oxidación produce exclusivamente acetil-coA mitocondrial, que no puede ser usado para la acetilación, el citrato derivado de la glucosa puede ser convertido en acetil-coA fuera de la mitocondria, aumentando la disponibilidad de acetil-coA nucleocitoplasmático, que sí puede ser utilizado en la acetilación de las histonas (Wellen et al., 2009). Finalmente, las CSAs

deberán perder las marcas H4k16ac en etapas terminales del ciclo celular para permitir la diferenciación de las células (Ryall et al., 2015) (Yucel et al., 2019).

Durante la etapa de proliferación, las CS pueden dividirse de dos formas diferentes: simétricamente (para expandir el “pool” de CS) y asimétricamente (generando una célula comprometida a la diferenciación y otra como reserva). El tipo de división a la que se sometan las células dependerá en gran medida de los requerimientos del músculo en regeneración, y estará regulado por la comunicación entre las CS, así como el resto de células que componen su nicho (los mecanismos que subyacen a ambos tipos de división se describen en el punto 4.1.2).

4.2.3 Diferenciación y vuelta a la quiescencia

Para completar la regeneración muscular, es necesario que las CS que han avanzado en el ciclo celular se diferencien, y se fusionen entre ellas para dar lugar a las fibras musculares. Por otra parte, algunas de estas células volverán a la quiescencia para reponer el “pool” de CS. En ambos casos, la salida del ciclo celular es necesaria. Sin embargo, estos dos procesos están regulados por diferentes factores. La diferenciación requiere el aumento de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina p19Arf, p21Cip y p57Kip2; mientras que en la vuelta a la quiescencia se requiere p27Kip1 (Dumont et al., 2015).

En la transición desde el ciclo celular hacia la diferenciación se precisa la activación de la p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), que actúa de diversas formas. Por un lado, p38 se encarga de fosforilar el complejo PRC2 (polycomb repressive complex 2), que es el encargado de modificar las histonas con la marca represiva H3K27me3. Este complejo, tras ser fosforilado e interactuar con el factor de transcripción YY1, modifica la cromatina del gen Pax7 con la marca H3k27me3, lo que reprime la expresión de este gen, que tiene un papel vital en el ciclo celular y cuya represión es necesaria para la diferenciación (Palacios et al., 2010). Adicionalmente, p38 también disminuye la expresión de determinados genes reguladores del ciclo celular, como la ciclina D1 (Perdiguero et al., 2007), e induce un aumento en la actividad transcripcional de factores relevantes en el proceso de diferenciación, como MyoD y MEF2 (Wu et al., 2000).

El aumento de la transcripción de MyoD mediado por p38 MAPK se produce mediante una cascada de señalización en la que p38 MAPK fosforila a otra proteína llamada

MAPKAP2, que a su vez fosforila la tristetrapolina, inactivándola. Una vez inactivada, la tristetrapolina no es capaz de degradar el ARNm de MyoD, por lo que pierde su rol en el mantenimiento de la quiescencia (Hausburg et al., 2015).

La expresión de MyoD provoca diversos efectos durante la salida del ciclo celular. Específicamente, induce la expresión de los microRNAs miR-206 y miR-486, que refuerzan la reducción de Pax7 uniéndose a su región no traducida 3' (UTR 3') (Dey et al., 2011). Asimismo, se encarga de activar el factor de regulación miogenina mediante mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. La acción conjunta de miogenina y MyoD provoca finalmente la activación del factor MRF4, necesario en etapas terminales de la diferenciación, y otros genes propios de esta etapa (Sousa-Victor et al., 2021).

Por otra parte, un nuevo cambio metabólico es necesario en esta etapa. Debido a las mayores exigencias energéticas de las fibras musculares maduras, las CS en diferenciación vuelven a reprogramar su metabolismo energético hacia la fosforilación oxidativa. Además, presentan mayor masa mitocondrial y un claro aumento en la activación del ciclo de Krebs (Hoffmann et al., 2018). El incremento en la actividad de este ciclo conlleva una reducción en la disponibilidad del acetil-coA para la acetilación de las histonas, por lo que los genes propios de la proliferación pierden las marcas epigenéticas H4k16ac y se reduce la expresión de los mismos (Yucel et al., 2019).

Respecto al proceso de vuelta a la quiescencia, diversas rutas juegan un importante papel, entre las que destaca la inhibición de la ruta de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, una subfamilia de MAPK), que está más activada durante la proliferación. La represión de la ruta ERK está mediada por la proteína Sprouty 1 (Spry 1). Esta proteína, que está expresada en CSQs, sufre una reducción en las CS que entran al ciclo tras una lesión y se induce de nuevo en las células que vuelven a la quiescencia. Se observó que la activación de la ruta ERK estaba aumentada en las células en las que se había silenciado Spry 1, y que dicho silenciamiento conllevaba una reducción de aproximadamente el 50 % de la población de células quiescentes tras la inducción de una lesión muscular, así como un gran aumento en el número de células apoptóticas (Fig. 4.4) (Shea et al., 2010).

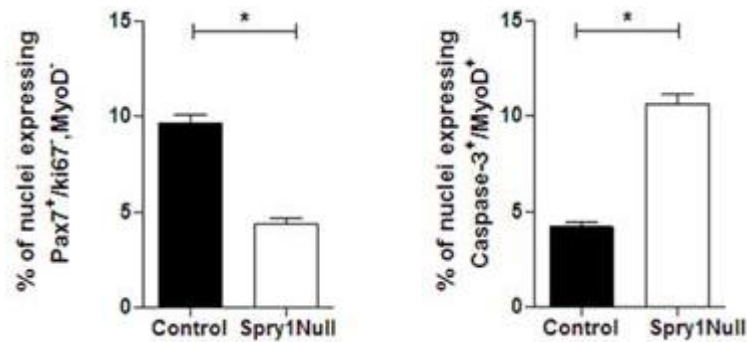


Figura 4.4; Impacto del silenciamiento de Spry 1 en el número de células quiescentes, marcadas por Pax7 (izquierda) y en el número de células apoptóticas, marcadas por Caspasa-3 (derecha) (Shea et al., 2010).

Adicionalmente, como se ha explicado con anterioridad, la activación de la vía de señalización Notch tras la división asimétrica en la célula hija que retorna a la quiescencia es vital también en este proceso (Kuang et al., 2007).

4.3 Influencia del nicho

Las interacciones que las CS tienen con su microambiente, también llamado nicho, son vitales para la regulación de todas las etapas de su ciclo celular y el mantenimiento de la quiescencia, y por tanto para un eficiente proceso de regeneración. En este microambiente destacan las funciones de la lámina basal, las fibras musculares, las células endoteliales, las células inmunitarias y los progenitores fibro-adipogénicos (Fig. 4.5) (Relaix et al., 2021).

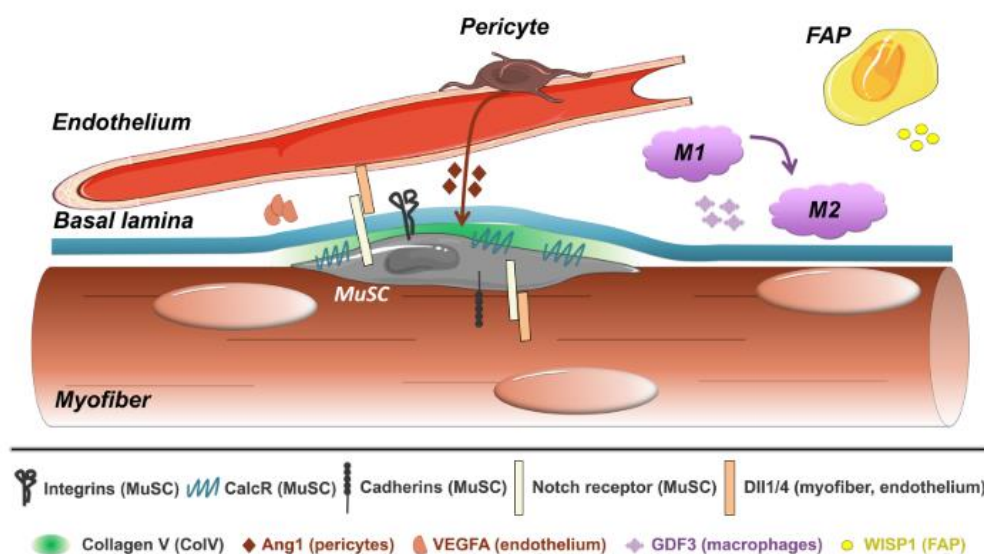


Figura 4.5; Interacciones de las CS con su nicho (Relaix et al., 2021)

4.3.1 Lámina basal

Las CS, como se ha descrito, se localizan bajo la lámina basal, un tipo de matriz extracelular compuesta por, entre otras proteínas, colágeno y lamininas. Se ha descrito una cascada de señalización en la que la activación de la vía Notch induce la producción de colágenos por las CS, que actúan como ligandos locales de los receptores de calcitonina en las propias CS y las mantienen en estado de quiescencia. Concretamente, la producción de proteína colágeno V es un componente fundamental en este proceso, ya que la represión de Col5a1, una de las subunidades del colágeno V, conlleva la entrada anómala en el ciclo celular y una disminución gradual del pool de células (Baghdadi et al., 2018).

Por otra parte, las lamininas son necesarias tras la activación de las CS para la propagación y autorrenovación. Se observó un proceso de remodelación del nicho, mediado por unas enzimas llamadas metaloproteinasas de matriz, en el que se depositaron laminina- α 1 y laminina- α 5 en la lámina basal durante la regeneración muscular. La laminina- α 1 produce su efecto mediante la unión a la integrina- α 6, y la represión de ambas tuvo efectos negativos sobre la proliferación y la autorrenovación de las células tras rondas consecutivas de lesiones (Rayagiri et al., 2018).

4.3.2 Fibras musculares

En repetidas ocasiones a lo largo de este trabajo se ha demostrado la importancia de la ruta de señalización Notch para el mantenimiento de la quiescencia. Las fibras musculares constituyen otro de los componentes que durante la regeneración muscular promueven la activación de esta ruta. Así, en el momento previo a la diferenciación, existen poblaciones de células que expresan el receptor Notch3, mientras que las fibras musculares que se acaban de formar aumentan la expresión del ligando Delta-like4. La unión de este ligando con su receptor desencadena una señal en las células que expresan el receptor que provoca que vuelvan a un estado quiescente, renovando así el pool de células (Low et al., 2018).

La secreción por parte de las fibras musculares de Oncostatina M, una citoquina de la familia de las citoquinas interleucina 6, ha sido descrita como otro de los mecanismos clave que inducen la quiescencia en CS. Es un mecanismo bastante temprano, ya que su secreción se produce entre 4-10 días después de la lesión. Sin

embargo, una vez secretado, produce la salida del ciclo de algunas subpoblaciones de células, que será “reafirmada” posteriormente por otros reguladores como Spry1 y Notch (Fig. 4.6). En consecuencia, la eliminación de la oncostatina M debilita la regeneración muscular y produce la reducción del número de CS (Sampath et al., 2018).

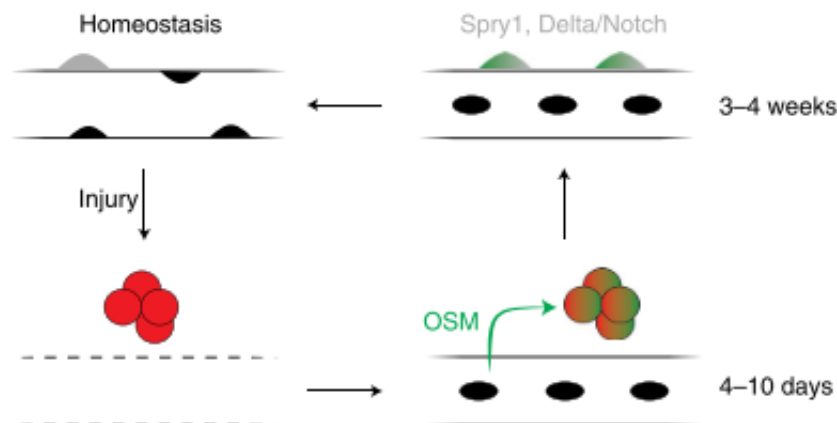


Figura 4.6; Modelo de la inducción de la quiescencia producida por la oncostatina M en etapas tempranas del ciclo celular. (Sampath et al., 2018).

La adhesión entre fibras musculares y CS, mediada por unas proteínas transmembrana llamadas cadherinas, constituye un importante mecanismo que regula la transición desde la quiescencia a la activación. La eliminación de N-cadherina y M-cadherina lleva a una ruptura parcial de la unión adhesiva entre fibra y CS, la cual propicia un estado de la célula intermedio en el que, a pesar de mantener su localización en el nicho y la polaridad celular (características propias de la quiescencia), presenta también rasgos propios de células en proceso de activación, como la localización en el núcleo de β -catenina. Juntos, estos datos sugieren que una perturbación inicial de las uniones adherentes, producida por una lesión muscular, podría ser uno de los primeros mecanismos en la transición hacia la activación (Goel et al., 2017).

4.3.3 Células endoteliales

El músculo esquelético está altamente vascularizado, y las CS se encuentran rodeadas por capilares, muy próximas a ellos. Más allá del aporte de oxígeno y nutrientes, los vasos sanguíneos tienen importantes funciones en el músculo esquelético, a través de las interacciones moleculares entre las células endoteliales y las CS (Chiristov et al., 2007).

Diversos análisis mostraron abundancia en la expresión por parte de las CS del factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGFA). Este factor participa en el reclutamiento de células endoteliales, reforzando la proximidad entre estas y las CS, mientras que la represión de VEGFA tiene el efecto contrario, alejándolas. Significativamente, esta proximidad fue asociada a la autorrenovación, ya que las células endoteliales pueden presentar el ligando delta-like 4, induciendo la quiescencia en CS (Fig. 4.7) (Verma et al., 2018).

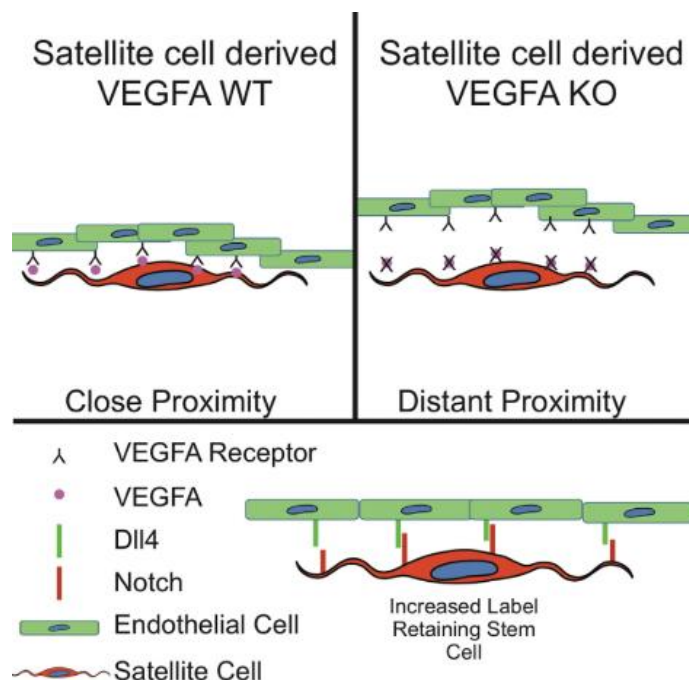


Figura 4.7; Unión de las CS (rojo) con las células endoteliales (verde) mediante la interacción entre VEGFA y su receptor. Esta unión permite la activación de la señalización Notch (Verma et al., 2018).

Durante la regeneración muscular, las células endoteliales y las CS interactúan entre ellas para acoplar la miogénesis y la angiogénesis. De hecho, el cultivo in vitro de células endoteliales junto a progenitores de células musculares produjo la estimulación de la miogénesis, y viceversa. Adicionalmente, los análisis de expresión génica identificaron tres factores relevantes producidos por ambas células. La oncostatina M, la periostina y la apelina regulan el mencionado acoplamiento, siendo necesarias para la miogénesis y la angiogénesis durante la regeneración muscular in vivo (Latroche et al., 2017).

Los pericitos, unas células que se envuelven alrededor de las células endoteliales de los capilares, son otro de los elementos reguladores del nicho. En el músculo adulto de ratón y humano, cerca del 90% de los capilares se encuentran asociados con

pericitos. En cultivos con CS, los pericitos fomentaron la diferenciación a través del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y la quiescencia a través de la angiopoyetina 1. La eliminación de los pericitos produjo hipotrofia de las fibras musculares y alteraciones en el establecimiento de la quiescencia (Kostallari et al., 2015).

4.3.4 Células inmunitarias

Tras una lesión muscular, la inflamación es una característica básica del proceso regenerativo. Los estudios en este campo han podido demostrar que, lejos de ser una respuesta inespecífica a un traumatismo, la inflamación constituye una interacción coordinada entre el músculo y el sistema inmune que determinará el éxito o el fracaso de la regeneración muscular. Así, en primeras instancias tras una lesión los macrófagos residentes del tejido muscular propician la llegada de neutrófilos al tejido, que fomentan a su vez un fenotipo proinflamatorio que causa el reclutamiento del resto de células inmunitarias, como macrófagos y linfocitos. Estas células serán reguladoras relevantes de la regeneración (Tidball, 2017).

Los macrófagos son células inmunitarias esenciales en la reparación muscular, ya que detectan y eliminan el tejido dañado y actúan como propulsores de la activación y diferenciación de CS. En concreto, los macrófagos inducen la activación de las CS mediante la secreción de la metaloproteinasa Adamts1. La sobreexpresión de esta enzima en los macrófagos aumenta el número de CSAs. En este caso, la acción de Admts1 se centra en el receptor Notch1, reduciendo su actividad y fomentando la salida de la quiescencia (Du et al., 2017). Asimismo, los macrófagos secretan un factor de crecimiento, llamado GDF3, que promueve la fusión de las células progenitoras de las fibras musculares, los mioblastos. PPAR γ es un factor de transcripción clave en este proceso, ya que controla la expresión de GDF3 (Varga et al., 2016).

Los linfocitos T reguladores (Treg), un tipo de linfocitos T CD4⁺, han sido redescubiertos como reguladores de varios procesos no inmunológicos. En lo que a la regeneración muscular respecta, se ha descrito una subpoblación de linfocitos Treg que participan en las últimas etapas del proceso. Esta subpoblación expresa un factor de crecimiento llamado anfiregulina, de la familia del factor de crecimiento epidérmico, que actúa promoviendo la diferenciación de las CS (Burzyn et al., 2013).

4.3.5 Progenitores fibro-adipogénicos

Los progenitores fibro-adipogénicos (FAPs) han emergido en los últimos años como importantes reguladores de la función de las CS y la regeneración muscular. Esta población, cuya característica principal es su capacidad para diferenciarse en fibroblastos y adipocitos (en ciertas ocasiones osteoblastos y condrocitos), es en realidad una población muy heterogénea, con ciertas subpoblaciones que, tras una lesión muscular, entran en el ciclo celular y secretan diversos factores que fomentan la actividad miogénica de las células madre musculares (Molina et al., 2021).

Las subpoblaciones de FAPs pueden identificarse en función de su variabilidad en la expresión de marcadores de superficie, como VCAM1 y TIE2. Concretamente, los FAPs que expresan VCAM1 son activados tras una lesión muscular. Esta población exhibe un perfil pro-fibrótico, en consonancia con el requerimiento de deposición de matriz extracelular en la regeneración muscular. Esta población debe ser transitoria en el tejido y eliminada tras el proceso de reparación muscular, ya que su persistencia anormal en el tejido muscular está asociada con diversas características patológicas como la fibrosis muscular (Malecova et al., 2018).

Se identificó mediante análisis de transcriptoma una proteína, WISP1, secretada por FAPs, necesaria para una eficiente regeneración muscular. Esta proteína, a través de la vía de señalización Akt, controla la expansión de las CS, fomentando la división asimétrica. La pérdida de este factor en el envejecimiento está relacionada con la disfunción de la regeneración muscular (Lukjanenko et al., 2019)

4.4 Efectos del envejecimiento en la regeneración muscular

Durante el envejecimiento, la disfunción de las CS es la principal causa de la pérdida de potencial regenerativo en el tejido muscular. Como se ha descrito en este trabajo, numerosos factores extrínsecos e intrínsecos regulan la función de las CS. Por tanto, serán las alteraciones en estos factores las que causen una disminución progresiva de las capacidades regenerativas del músculo (Hwang & Brack, 2018).

4.4.1 Alteraciones de los factores extrínsecos

Existen factores sistémicos, aportados al tejido muscular y las CS a través del sistema circulatorio, que pueden tener efectos negativos en la regeneración a raíz del envejecimiento (Fig. 4.8). Para evaluar los posibles efectos de estos factores se

generó un modelo de ratones que compartían el sistema circulatorio, siendo uno de ellos viejo y otro joven. Se pudo observar el restablecimiento de la señalización Notch, la proliferación y la capacidad regenerativa en las CS envejecidas. Esto demostró que la decadencia causada por el envejecimiento en la actividad de las células puede ser modulada por factores sistémicos que cambian con la edad (Conboy et al., 2005). Uno de estos factores es la oxitocina, cuyos niveles en plasma disminuyen con la edad. La administración de oxitocina mejora rápidamente la regeneración muscular, aumentando la proliferación de las CS mediante la activación de la ruta ERK (Elabd et al., 2014).

Las CS de ratones envejecidos tienden a adoptar un linaje fibrogénico en vez de miogénico. Esta conversión está asociada a una mayor activación de la vía de señalización Wnt, lo que establece una relación entre esta ruta y el aumento de la fibrosis en el envejecimiento (Brack et al., 2007).

En lo que respecta al nicho, diversas alteraciones en la comunicación de las células residentes en el mismo guardan relación con los cambios observados en el envejecimiento (Fig. 4.8). Se observó en fibras musculares envejecidas la presencia aumentada del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2). El aumento de la señalización de FGF2 en CS en condiciones homeostáticas lleva a la pérdida de la quiescencia y la disminución de la capacidad regenerativa (Chakkalakal et al., 2012). La reducción en la secreción por parte de las fibras musculares del factor estimulante de colonias de granulocitos (Li et al., 2019) y la activación de la vía Akt dependiente de IGF-1 (García-Prat et al., 2020) han sido descritos como mecanismos que reducen el número de CS.

La matriz extracelular del músculo envejecido también presenta variaciones, como niveles reducidos de fibronectina. Dado que la fibronectina actúa como sustrato de adhesión a las CS, se produce una pérdida parcial de la unión entre el nicho y dichas células, que tiene consecuencias negativas para su función regenerativa (Lukjanenko et al., 2016).

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína Wisp1, que controla la expansión de las CS, ve reducida su expresión en los FAPs envejecidos, suponiendo así un incentivo para la disfunción de las CS (Lukjanenko et al., 2019). Los FAPs han mostrado menor producción de interleuquina-33 en ratones envejecidos, una

citoquina que participa en el reclutamiento de linfocitos Treg al sitio de lesión, lo que llevó al fracaso en la acumulación de linfocitos Treg y por tanto al déficit en la regeneración (Kuswanto et al., 2016).

Recientemente se identificó una subpoblación de macrófagos capaces de producir una quimiocina llamada CXCL10, que mediante la unión al receptor CXCR3 en las CS, estimula la proliferación y diferenciación. Esta población se vio reducida en un 20% en el envejecimiento, y el tratamiento exógeno con CXCL10 produjo una mejora significativa en la proliferación (Zhang et al., 2020). Por otra parte, se reportó en el músculo dañado de un ratón envejecido la disminución en la expresión del factor de crecimiento GDF3. La suplementación con este factor produjo una mejora significativa en la respuesta regenerativa (Patsalos et al., 2018).

Otras quimiocinas son importantes para el correcto funcionamiento de las CS, como las quimiocinas CCL2, 7 y 8, que actúan mediante la unión a su receptor CCR2 inhibiendo la fusión de los progenitores miogénicos y su aportación a la fibra muscular. Se han detectado niveles anómalamente elevados en la activación de CCR2 en el músculo envejecido, lo que lo convierte en un mecanismo que contribuye a la decadencia de la función reparadora (Blanc et al., 2020).

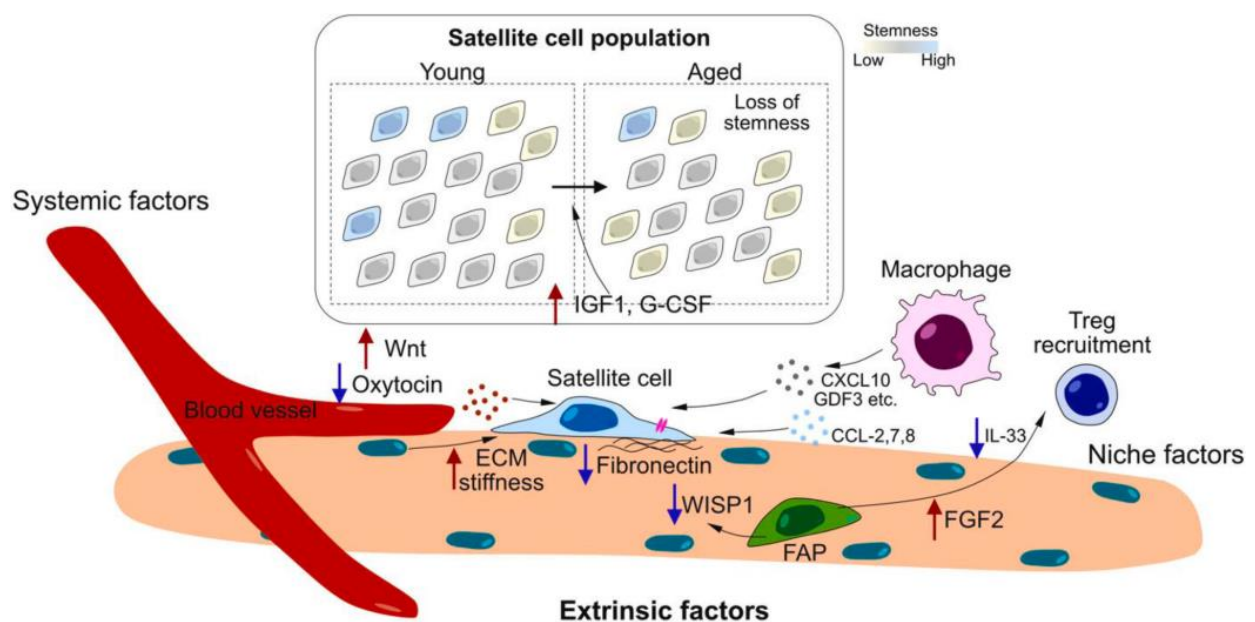


Figura 4.8; Cambios en el ambiente de las CS ligados al envejecimiento (Hong et al., 2022).

4.4.2 Alteraciones de los factores intrínsecos

Numerosas vías de señalización intracelulares de las CS se ven alteradas durante el envejecimiento debido a cambios intrínsecos y, en parte, las influencias ambientales, teniendo un claro efecto negativo sobre la regeneración (Hong et al., 2022). Ejemplos de alteraciones de estas vías en el envejecimiento son:

- Vía de señalización JAK/STAT: análisis de expresión génica detectaron un aumento en los genes diana de esta vía en ratones envejecidos, lo que provocó la repoblación deficiente del nicho de CS tras dañar el músculo (Price et al., 2014).
- Señalización p38 α / β MAPK: La activación de esta ruta se encuentra aumentada en ratones de mayor edad, causando fallos en la autorrenovación de CS (Bernet et al., 2014).
- Señalización Notch: Es necesaria para el mantenimiento de la quiescencia y por tanto para una correcta regeneración, pero su activación disminuye en el músculo envejecido (Conboy et al., 2003). Adicionalmente, se ha observado un aumento en la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). El equilibrio entre esta ruta y la ruta Notch, perturbado en el envejecimiento, es necesario para una correcta regeneración, ya que son rutas antagónicas (Carlson et al., 2008).

En todos los casos, el tratamiento con represores/activadores de estas rutas mejoró significativamente la capacidad regenerativa de las CS, lo que las convierte en un enfoque terapéutico relevante.

Los cambios en el genoma de las CS también pueden contribuir a su funcionalidad deficiente en el envejecimiento. Mediante el análisis del genoma de CS de individuos sanos de diferentes edades (21-78 años), se encontró una media de acumulación de 13 mutaciones somáticas por genoma por año. El número de mutaciones se relacionó inversamente con el número de CS capaces de diferenciarse (Franco et al., 2018).

Las alteraciones en la regulación epigenética también constituyen un importante factor que perturba la función normal de las CS. Las CSQs de ratones envejecidos muestran una intensidad 4 veces mayor que las CSQs jóvenes de las marcas represivas de la cromatina H3K27me3, que resulta tanto de la adquisición de esta

marca en genes que no se encuentran marcados en CSQs jóvenes, como del aumento en la intensidad en genes que sí se encontraban marcados. Esto puede ser un reflejo de la pérdida con los años de potencial de transcripción de genes que mantienen la quiescencia (Liu et al., 2013)

Por otra parte, se observó en el envejecimiento el aumento de la marca H3K4me3 en el promotor y primer exón del gen Hoxa9. Como se ha explicado anteriormente, esta modificación facilita la transcripción del gen al que afecta, por lo que la expresión de Hoxa9 se ve aumentada. Tras ello, Hoxa9 activa diversas rutas que se han mencionado en relación a la disfunción de las CS, como Wnt, TGF- β y JAK/STAT (Schwörer et al., 2016).

La pérdida de la proteostasis (homeostasis del proteoma) es una característica común en el envejecimiento, y uno de los factores clave para entender la disfunción de las CS con la edad. La acumulación de orgánulos y proteínas disfuncionales es un claro ejemplo del deterioro de la proteostasis (García-Prat et al., 2017). En el individuo joven, la autofagia controla la acumulación de los elementos dañados. Sin embargo, el fallo de este mecanismo en CS envejecidas causa la entrada de las células en un estado senescente por la pérdida de la proteostasis, el aumento en la disfunción de las mitocondrias y la acumulación de estrés oxidativo (especies reactivas de oxígeno), que resulta en la disminución de la funcionalidad de las CS y en la reducción de su número (García-Prat et al., 2016).

Metabólicamente, las CS muestran en el envejecimiento una disminución significativa en la activación de la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs (Pala et al., 2018). La deficiencia observada en progenitores miogénicos envejecidos de una hormona llamada α -Klotho causa el aumento del daño en el ADN mitocondrial, así como la disminución de la actividad mitocondrial. Estas alteraciones vienen acompañadas con la reducción de la capacidad regenerativa (Sahu et al., 2018). Estos estudios refuerzan la hipótesis de que la disfunción mitocondrial, común en el envejecimiento, está directamente relacionada con la deficiencia funcional de las CS.

4.5 Células satélite en medicina regenerativa

En los últimos años, uno de los principales focos de la medicina regenerativa ha sido el desarrollo de terapias de trasplante basadas en el potencial regenerativo de las CS. Estas terapias han permitido notables avances en el tratamiento de enfermedades musculares degenerativas, como las distrofias, así como lesiones graves.

4.5.1 Potencial terapéutico de las células satélite

Los primeros experimentos realizados en torno al trasplante de CS en modelos de ratones distróficos demostraron que, efectivamente, estas células podían ser aisladas y trasplantadas en el músculo, teniendo un efecto positivo sobre la regeneración en el mismo (Judson & Rossi, 2020).

Se realizó un estudio en el que se trasplantaron CS aisladas del diafragma en el tibial anterior de ratones que carecían de distrofina. Dicha proteína se encuentra mutada en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y pierde su función, por lo que este modelo de ratón simula dicha patología. Se observó que el trasplante de dos rondas de 10^4 CS reestablecía la expresión de distrofina en cerca de 590 fibras musculares, mientras que el trasplante de 10^3 lo hacía en unas 160 (Fig. 4.9) (Montarras et al., 2005).

A pesar de lo prometedor de estos resultados, el número de fibras musculares restauradas es mucho menor del necesario para obtener un impacto clínicamente beneficioso. Es por ello que, anterior al trasplante, se requiere de un proceso de expansión del pool de CS in vitro. En el mismo estudio se comparó la capacidad de las CS para contribuir al restablecimiento de expresión de distrofina antes y después de pasar por un proceso de expansión in vitro. Desafortunadamente, los resultados mostraron que el cultivo de células para su expansión durante unos días antes de su trasplante reducía en gran medida su eficiencia en la reparación de las fibras musculares (Fig. 4.9) (Montarras et al., 2005).

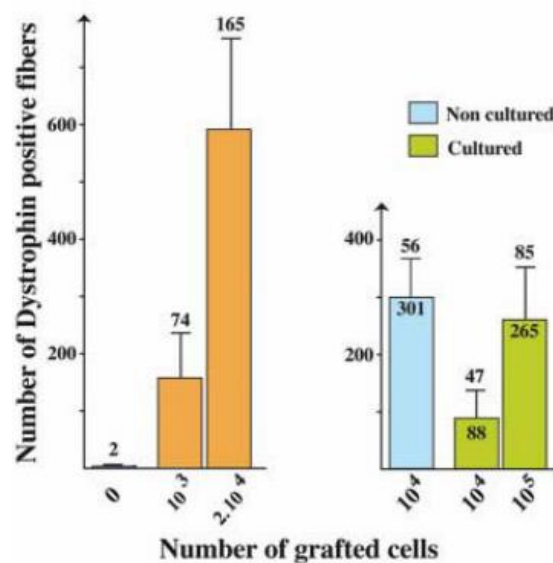


Figura 4.9; Ilustración de la efectividad de las CS para restablecer la expresión de distrofina en función de: Trasplante inmediato tras aislamiento de las CS (izquierda) y trasplante de CS cultivadas o sin cultivar (derecha) (Montarras et al., 2005).

Dado que la expansión del número de CS in vitro es estrictamente necesaria para la obtención de suficientes células, los estudios en los siguientes años se centraron en perfeccionar este proceso para que las CS no perdieran su capacidad de autorrenovación, simulando in vitro el microambiente existente durante la regeneración muscular in vivo (Judson & Rossi, 2020).

4.5.2 Suplementación del medio con factores estimuladores de la propagación

Se ha demostrado la eficacia de ciertas moléculas inhibitoras de la diferenciación que fomentan la propagación de las CS al ser co-cultivadas con ellas, mejorando así su potencial de trasplante.

Como se ha descrito en el apartado 4.2.3, la activación de la ruta de la p38 MAPK es crucial en la salida del ciclo celular, promoviendo la diferenciación mediante diversos mecanismos. El cultivo in vitro de CS humanas en el que se indujo la inhibición de la p38 MAPK mediante una molécula llamada SB203580 produjo mejoras significativas en el índice de proliferación de las células y las mantuvo en un estado indiferenciado reversible. Adicionalmente, las células tratadas con SB203580 mostraron mayor potencial regenerativo tras ser trasplantadas, así como la capacidad de expresar distrofina en modelos de ratón DMD (Charville et al., 2015)

Otro ejemplo de este enfoque es la suplementación con C10 o sal003. Un proceso clave para el mantenimiento de la autorrenovación de las CS es la fosforilación de

eIF2, un factor de iniciación de la traducción. Antes de la diferenciación, este factor es desfosforilado, aumentando la síntesis de proteínas promotoras del programa miogénico. C10 y sal003 son moléculas que actúan bloqueando dicha desfosforilación. La administración al medio de cultivo de C10 y sal003 promovió la expansión ex vivo de las CS, así como el retenimiento de la capacidad regenerativa una vez trasplantado en modelos de ratones DMD (Lean et al., 2019)

Como se ha descrito anteriormente, la inflamación es una característica básica del proceso regenerativo, ya que, tras la lesión del músculo, las células inmunitarias secretan diversos factores que promueven la regeneración muscular. Desde esta premisa, se evaluó el efecto que tenía el co-cultivo de linfocitos T con CS. Tras el análisis de las citoquinas que más se secretaban al medio por los linfocitos T, se demostró que 4 de estas eran suficientes para aumentar la proliferación de las CS: (IL-1 α , IL-13, IFN- γ y TFN- α). La preparación de un medio al que se le administró un “cocktail” de estas cuatro citoquinas mostró un incremento en la capacidad de expansión de las CS, así como en su potencial de trasplante (Fig. 4.10) (Fu et al., 2015).

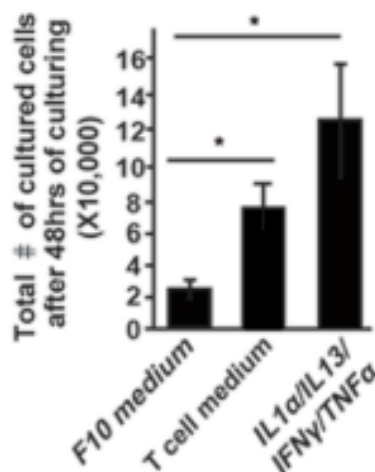


Figura 4.10; Comparación de medios de cultivo basados en la simulación del ambiente inflamatorio existente durante la regeneración. Se evaluaron 3 grupos: F10 (control), medio co-cultivado con linfocitos T y medio cultivado con mezcla de citoquinas inflamatorias (Fu et al., 2015).

4.5.3 Bioingeniería aplicada a las células satélite

Las CS se desarrollan en un nicho con características físicas y químicas concretas. La replicación de estas características en el medio de cultivo mediante técnicas de

bioingeniería ha sido demostrada efectiva para el aumento del potencial de trasplante de las CS.

En base a esto, se creó un medio de cultivo compuesto de una micromatriz que simulaba las características bioquímicas y biofísicas de las fibras musculares nativas, como la geometría, la elasticidad o la composición proteica de la matriz extracelular. Las CS fueron cultivadas en dicho medio y se adhirieron a la matriz, para posteriormente ser trasplantadas. Además, se añadió en el medio un conjunto de factores que propiciaban el mantenimiento de la quiescencia. Las células que había crecido en el medio reportaron mayor capacidad de trasplante y autorrenovación. A pesar de no ofrecer una solución a la dificultad para expandir el número de CS in vitro, la posibilidad de cultivar las CS durante más tiempo, mientras mantienen la quiescencia, permite una corrección más rigurosa de las mutaciones asociadas a ciertas enfermedades, como las distrofias musculares. Esto, a su vez, ayudará a la mejora en el desarrollo de terapias para las enfermedades musculares (Quarta et al., 2016).

El trasplante de células por inyección directa tras haber proliferado en el medio ha demostrado ser una estrategia ineficiente, debido en parte a la dificultad de las células para sobrevivir en el ambiente generado por las enfermedades musculares o las lesiones, que sufre una gran disminución en su integridad estructural. Es por ello que se han desarrollado biomateriales que pueden ser inyectados como “vehículos” de las CS aportando la integridad estructural que el ambiente no posee en estos casos. En torno a este enfoque, se fabricó una matriz biocompatible con un hidrogel sintético basado en macrómeros de polietilenglicol de cuatro brazos, con grupos maleimida en sus extremos. La matriz promovió la supervivencia, proliferación de las células en el cultivo. Además, ofreció la posibilidad de la incorporación de las CS en músculos lesionados que habían perdido la integridad estructural del tejido, ya que la maleimida interactúa con los grupos tiol de las moléculas formando enlaces covalentes y permitiendo la integración de las CS en el músculo (Han et al., 2018).

4.5.4 Futuras líneas de investigación y posibles alternativas

Uno de los principales retos de la medicina regenerativa en el ámbito de las terapias con CS es la transición de estas terapias experimentales a la clínica (Judson & Rossi, 2020). Las dificultades que marcan dicha transición son:

- La compresión de los fundamentos moleculares que diferencian a las CS que tras el trasplante son capaces de autorrenovarse y contribuir al aumento de CS en el nicho, de aquellas que solo contribuyen a la formación de fibras musculares, sin expandir la reserva de células.
- La evaluación de la efectividad de estas terapias en humanos, ya que la mayoría han sido desarrolladas en modelos de ratones.
- El cumplimiento de las regulaciones en cuanto a la composición química de los medios (medios libres de suero animal y químicamente definidos).
- Los costes del desarrollo de terapias personalizadas para cada paciente.

El desarrollo de las tecnologías de manipulación genética proporciona un nuevo enfoque en la corrección de las mutaciones asociadas a las distrofias musculares, como DMD. Estas mutaciones han sido corregidas mediante la técnica de edición genética CRISPR-Cas9 en células humanas y diversos modelos animales, la cual tiene características muy ventajosas, ya que potencialmente podría corregir la mutación con un tratamiento único. Sin embargo, numerosos avances quedan aún por hacer en lo que respecta al traslado de la tecnología CRISPR-Cas9 a la clínica (Chemello et al., 2023).

Otra posible línea de investigación a futuro es el uso de células madre pluripotentes humanas (hPSCs) in vitro. Se ha reportado la capacidad de obtener fibras musculares junto a CS tras el cultivo durante un mes de hPSCs, lo que fue posible induciendo un protocolo de diferenciación basado en los eventos de señalización que dan lugar a la miogénesis en el embrión (Chal et al., 2016). Los trasplantes autólogos de hPSCs presentan varias dificultades, ya que son un proceso lento y duradero debido a las técnicas de manipulación de la línea celular que se requieren antes del trasplante. Es por ello que las técnicas de manipulación genética abren una ventana aún más prometedora en este enfoque, ya que permiten la creación de hPSCs alogénicas “prefabricadas” que no generan una respuesta inmune agresiva en el recipiente, gracias a la manipulación de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (Deuse et al., 2019).

En definitiva, el perfeccionamiento de las técnicas ya existentes desde hace años y el desarrollo de aquellas que han surgido recientemente, junto a la creación de nuevas terapias a través de enfoques aún no estudiados, marcará el desarrollo de la

medicina regenerativa en los próximos años, pudiendo ser realmente prometedor en el ámbito de la regeneración muscular.

5 CONCLUSIÓN

En base a la revisión bibliográfica realizada en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El proceso de regeneración muscular es sumamente complejo debido a la regulación extrínseca e intrínseca del ciclo de las células satélite. Es necesario profundizar en el estudio de los factores que modulan su actividad, así como en la influencia de las células que las rodean y las complejas redes de señalización a través de las que interactúan, para lograr una mejor comprensión de este proceso.
- El descubrimiento de nuevos reguladores de la regeneración muscular permitirá desarrollar enfoques innovadores para optimizar las características de las células satélite en condiciones patológicas o de envejecimiento.
- Las terapias basadas en el trasplante autólogo o alogénico de células satélite conforman una prometedora línea de investigación a futuro. Desafortunadamente, diversos obstáculos, principalmente en relación a su cultivo in-vitro, hacen necesario el perfeccionamiento de esta técnica en vista a su aplicación clínica.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Araújo, S. J., Asakura, A., Aranega, A. E., Rodriguez-Outeiriño, L., Hernandez-Torres, F., Ramírez-De Acuña, F., Matías-Valiente, L., Sanchez-Fernandez, C., & Franco, D. (2021). *Muscle Satellite Cell Heterogeneity: Does Embryonic Origin Matter?* <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.750534>
- Asfour, H. A., Allouh, M. Z., & Said, R. S. (2018). Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Experimental Biology and Medicine*, 243(2), 118. <https://doi.org/10.1177/1535370217749494>
- Baghdadi, M. B., Castel, D., Machado, L., Fukada, S. I., Birk, D. E., Relaix, F., Tajbakhsh, S., & Mourikis, P. (2018). Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature*, 557(7707), 714–718. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0144-9>
- Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., & Rudnicki, M. A. (2012). Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(2). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A008342>
- Bernet, J. D., Doles, J. D., Hall, J. K., Kelly Tanaka, K., Carter, T. A., & Olwin, B. B. (2014). p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nature Medicine* 2014 20:3, 20(3), 265–271. <https://doi.org/10.1038/nm.3465>
- Bjornson, C. R. R., Cheung, T. H., Liu, L., Tripathi, P. V., Steeper, K. M., & Rando, T. A. (2012). Notch Signaling Is Necessary to Maintain Quiescence in Adult Muscle Stem Cells. *Stem Cells*, 30(2), 232–242. <https://doi.org/10.1002/STEM.773>
- Blanc, R. S., Kallenbach, J. G., Bachman, J. F., Mitchell, A., Paris, N. D., & Chakkalakal, J. V. (2020). Inhibition of inflammatory CCR2 signaling promotes aged muscle regeneration and strength recovery after injury. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17620-8>
- Brack, A. S. (2014). Pax7 is back. *Skeletal Muscle*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/S13395-014-0024-4>
- Brack, A. S., Conboy, M. J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C. J., Keller, C., & Rando, T. A. (2007). Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*, 317(5839), 807–810. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1144090/SUPPL_FILE/BRACK.SOM.PDF
- Brack, A. S., & Rando, T. A. (2012). Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. *Cell Stem Cell*, 10(5), 504–514. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2012.04.001>
- Buckingham, M., & Relaix, F. (2015). PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 44, 115–125. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2015.09.017>

- Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J. L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T. G., Wagers, A. J., Benoist, C., & Mathis, D. (2013). A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell*, 155(6). <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.10.054>
- Carlson, M. E., Hsu, M., & Conboy, I. M. (2008). Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 2008 454:7203, 454(7203), 528–532. <https://doi.org/10.1038/nature07034>
- Cavanagh, B. L., Walker, T., Norazit, A., & Meedeniya, A. C. B. (2011). molecules Thymidine Analogues for Tracking DNA Synthesis. *Molecules*, 16, 7980–7993. <https://doi.org/10.3390/molecules16097980>
- Chakkalakal, J. V., Christensen, J., Xiang, W., Tierney, M. T., Boscolo, F. S., Sacco, A., & Brack, A. S. (2014). Early forming label-retaining muscle stem cells require p27kip1 for maintenance of the primitive state. *Development*, 141(8), 1649–1659. <https://doi.org/10.1242/DEV.100842>
- Chakkalakal, J. V., Jones, K. M., Basson, M. A., & Brack, A. S. (2012). The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* 2012 490:7420, 490(7420), 355–360. <https://doi.org/10.1038/nature11438>
- Chal, J., Al Tanoury, Z., Hestin, M., Gobert, B., Aivio, S., Hick, A., Cherrier, T., Nesmith, A. P., Parker, K. K., & Pourquié, O. (2016). Generation of human muscle fibers and satellite-like cells from human pluripotent stem cells in vitro. *Nature Protocols*, 11(10), 1833–1850. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2016.110>
- Charville, G. W., Cheung, T. H., Yoo, B., Santos, P. J., Lee, G. K., Shrager, J. B., & Rando, T. A. (2015). Ex Vivo Expansion and In Vivo Self-Renewal of Human Muscle Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 5(4), 621–632. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2015.08.004>
- Chemello, F., Olson, E. N., & Bassel-Duby, R. (2023). CRISPR-Editing Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Human Gene Therapy*, 34(9–10), 379. <https://doi.org/10.1089/HUM.2023.053>
- Chen, Z., Bu, N., Qiao, X., Zuo, Z., Shu, Y., Liu, Z., Qian, Z., Chen, J., & Hou, Y. (2018). Forkhead Box M1 Transcriptionally Regulates the Expression of Long Noncoding RNAs Snhg8 and Gm26917 to Promote Proliferation and Survival of Muscle Satellite Cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 36(7), 1097–1108. <https://doi.org/10.1002/STEM.2824>
- Chiristov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F. J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., & Gherardi, R. K. (2007). Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells: Close Neighbors and Privileged Partners. *Molecular Biology of the Cell*, 18(4), 1397. <https://doi.org/10.1091/MBC.E06-08-0693>
- Cho, D. S., & Doles, J. D. (2017). Single cell transcriptome analysis of muscle satellite cells reveals widespread transcriptional heterogeneity. *Gene*, 636, 54–63. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.09.014>

- Conboy, I. H., Conboy, M. J., Smythe, G. M., & Rando, T. A. (2003). Notch-Mediated Restoration of Regenerative Potential to Aged Muscle. *Science*, 302(5650), 1575–1577. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1087573/SUPPL_FILE/CONBOY.SOM.PDF
- Conboy, I. M., Conboy, M. J., Wagers, A. J., Girma, E. R., Weismann, I. L., & Rando, T. A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*, 433(7027), 760–764. <https://doi.org/10.1038/NATURE03260>
- Conboy, I. M., & Rando, T. A. (2002). The Regulation of Notch Signaling Controls Satellite Cell Activation and Cell Fate Determination in Postnatal Myogenesis. *Developmental Cell*, 3, 397–409. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.01.003>
- Deuse, T., Hu, X., Gravina, A., Wang, D., Tediashvili, G., De, C., Thayer, W. O., Wahl, A., Garcia, J. V., Reichenspurner, H., Davis, M. M., Lanier, L. L., & Schrepfer, S. (2019). Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nature Biotechnology*, 37(3), 252. <https://doi.org/10.1038/S41587-019-0016-3>
- Dey, B. K., Gagan, J., & Dutta, A. (2011). miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Molecular and Cellular Biology*, 31(1), 203–214. <https://doi.org/10.1128/MCB.01009-10>
- Du, H., Shih, C. H., Wosczyzna, M. N., Mueller, A. A., Cho, J., Aggarwal, A., Rando, T. A., & Feldman, B. J. (2017). Macrophage-released ADAMTS1 promotes muscle stem cell activation. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00522-7>
- Dumont, N. A., Wang, Y. X., & Rudnicki, M. A. (2015). Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development (Cambridge, England)*, 142(9), 1572. <https://doi.org/10.1242/DEV.114223>
- Elabd, C., Cousin, W., Upadhyayula, P., Chen, R. Y., Chooljian, M. S., Li, J., Kung, S., Jiang, K. P., & Conboy, I. M. (2014). Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nature Communications* 2014 5:1, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5082>
- Evano, B., Khalilian, S., Le Carrou, G., Almouzni, G., & Tajbakhsh, S. (2020). Dynamics of Asymmetric and Symmetric Divisions of Muscle Stem Cells In Vivo and on Artificial Niches. *Cell Reports*, 30(10), 3195–3206.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.01.097>
- Feige, P., Brun, C. E., Ritso, M., & Rudnicki, M. A. (2018). *Orienting Muscle Stem Cells for Regeneration in Homeostasis, Aging, and Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.006>
- Forcina, L., Cosentino, M., & Musarò, A. (2020). Mechanisms Regulating Muscle Regeneration: Insights into the Interrelated and Time-Dependent Phases of Tissue Healing. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/CELLS9051297>

- Franco, I., Johansson, A., Olsson, K., Vrtačnik, P., Lundin, P., Helgadottir, H. T., Larsson, M., Revêchon, G., Bosia, C., Pagnani, A., Provero, P., Gustafsson, T., Fischer, H., & Eriksson, M. (2018). Somatic mutagenesis in satellite cells associates with human skeletal muscle aging. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03244-6>
- Fu, X., Xiao, J., Wei, Y., Li, S., Liu, Y., Yin, J., Sun, K., Sun, H., Wang, H., Zhang, Z., Zhang, B. T., Sheng, C., Wang, H., & Hu, P. (2015). Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion. *Cell Research*, 25(6), 655–673. <https://doi.org/10.1038/CR.2015.58>
- Fukada, S., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y., & Takeda, S. (2007). Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(10), 2448–2459. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2007-0019>
- Ganassi, M., & Zammit, P. S. (2022). Involvement of muscle satellite cell dysfunction in neuromuscular disorders: Expanding the portfolio of satellite cell-opathies. *European Journal of Translational Myology*, 32(1), 2022. <https://doi.org/10.4081/EJTM.2022.10064>
- García-Prat, L., Martínez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-Ubreva, J., Rebollo, E., Ruiz-Bonilla, V., Gutarra, S., Ballestar, E., Serrano, A. L., Sandri, M., & Muñoz-Cánoves, P. (2016). Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* 2016 529:7584, 529(7584), 37–42. <https://doi.org/10.1038/nature16187>
- García-Prat, L., Perdiguero, E., Alonso-Martín, S., Dell’Orso, S., Ravichandran, S., Brooks, S. R., Juan, A. H., Campanario, S., Jiang, K., Hong, X., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Flández, M., Moiseeva, V., Rebollo, E., Jardí, M., Sun, H. W., Musarò, A., Sandri, M., ... Muñoz-Cánoves, P. (2020). FoxO maintains a genuine muscle stem-cell quiescent state until geriatric age. *Nature Cell Biology* 2020 22:11, 22(11), 1307–1318. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00593-7>
- García-Prat, L., Sousa-Victor, P., & Muñoz-Cánoves, P. (2017). Proteostatic and Metabolic Control of Stemness. *Cell Stem Cell*, 20(5), 593–608. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2017.04.011>
- Goel, A. J., Rieder, M. K., Arnold, H. H., Radice, G. L., & Krauss, R. S. (2017). Niche Cadherins Control the Quiescence-to-Activation Transition in Muscle Stem Cells. *Cell Reports*, 21(8), 2236–2250. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.10.102>
- Gros, J., Manceau, M., Thomé, V., & Marcelle, C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature*, 435(7044), 954–958. <https://doi.org/10.1038/NATURE03572>
- Han, W. M., Anderson, S. E., Mohiuddin, M., Barros, D., Nakhai, S. A., Shin, E., Amaral, I. F., Pêgo, A. P., García, A. J., & Jang, Y. C. (2018). Synthetic matrix enhances transplanted satellite cell engraftment in dystrophic and aged skeletal muscle with comorbid trauma. *Science Advances*, 4(8). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAR4008>

- Hausburg, M. A., Doles, J. D., Clement, S. L., Cadwallader, A. B., Hall, M. N., Blackshear, P. J., Lykke-Andersen, J., & Olwin, B. B. (2015). Post-transcriptional regulation of satellite cell quiescence by TTP-mediated mRNA decay. *ELife*, 4(4). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.03390>
- Hoffmann, C., Höcke, S., Kappler, L., Hrabě De Angelis, M., Häring, H. U., & Weigert, C. (2018). The effect of differentiation and TGF β on mitochondrial respiration and mitochondrial enzyme abundance in cultured primary human skeletal muscle cells. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18658-3>
- Hong, X., Campanario, S., Ramírez-Pardo, I., Grima-Terrén, M., Isern, J., & Muñoz-Cánoves, P. (2022). Stem cell aging in the skeletal muscle: The importance of communication. *Ageing Research Reviews*, 73, 101528. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101528>
- Hwang, A. B., & Brack, A. S. (2018). Muscle Stem Cells and Aging. *Current Topics in Developmental Biology*, 126, 299–322. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2017.08.008>
- Judson, R. N., & Rossi, F. M. V. (2020). Towards stem cell therapies for skeletal muscle repair. *Npj Regenerative Medicine* 2020 5:1, 5(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-0094-3>
- Kawabe, Y. I., Wang, Y. X., McKinnell, I. W., Bedford, M. T., & Rudnicki, M. A. (2012). *Carm1* regulates Pax7 transcriptional activity through MLL1/2 recruitment during asymmetric satellite stem cell divisions. *Cell Stem Cell*, 11(3), 333–345. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.001>
- Kostallari, E., Baba-Amer, Y., Alonso-Martin, S., Ngoh, P., Relaix, F., Lafuste, P., & Gherardi, R. K. (2015). Pericytes in the myovascular niche promote post-natal myofiber growth and satellite cell quiescence. *Development (Cambridge, England)*, 142(7), 1242–1253. <https://doi.org/10.1242/DEV.115386>
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., & Rudnicki, M. A. (2007). Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell*, 129(5), 999–1010. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.03.044>
- Kuswanto, W., Burzyn, D., Panduro, M., Wang, K. K., Jang, Y. C., Wagers, A. J., Benoist, C., & Mathis, D. (2016). Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity*, 44(2), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.009>
- Latroche, C., Weiss-Gayet, M., Muller, L., Gitiaux, C., Leblanc, P., Liot, S., Ben-Larbi, S., Abou-Khalil, R., Verger, N., Bardot, P., Magnan, M., Chrétien, F., Mounier, R., Germain, S., & Chazaud, B. (2017). Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages. *Stem Cell Reports*, 9(6), 2018–2033. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2017.10.027>

- Le Grand, F., Jones, A. E., Seale, V., Scimè, A., & Rudnicki, M. A. (2009). Wnt7a Activates the Planar Cell Polarity Pathway to Drive the Symmetric Expansion of Satellite Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 4(6), 535–547. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.013>
- Lean, G., Halloran, M., Mariscal, O., Jamet, S., Lumb, J.-P., & Crist, C. (2019). Ex vivo expansion of skeletal muscle stem cells with a novel small compound inhibitor of eIF2 α dephosphorylation. *BioRxiv*, 567461. <https://doi.org/10.1101/567461>
- Li, H., Chen, Q., Li, C., Zhong, R., Zhao, Y., Zhang, Q., Tong, W., Zhu, D., & Zhang, Y. (2019). Muscle-secreted granulocyte colony-stimulating factor functions as metabolic niche factor ameliorating loss of muscle stem cells in aged mice. *The EMBO Journal*, 38(24). https://doi.org/10.15252/EMBJ.2019102154/SUPPL_FILE/EMBJ2019102154-SUP-0007-SDATAFIGEV4ANDEV5.ZIP
- Liu, L., Cheung, T. H., Charville, G. W., Hurgo, B. M. C., Leavitt, T., Shih, J., Brunet, A., & Rando, T. A. (2013). Chromatin Modifications as Determinants of Muscle Stem Cell Quiescence and Chronological Aging. *Cell Reports*, 4(1), 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.043>
- Liu, W., Wen, Y., Bi, P., Lai, X., Liu, X. S., Liu, X., & Kuang, S. (2012). Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation. *Development*, 139(16), 2857–2865. <https://doi.org/10.1242/DEV.079665>
- Low, S. H., Barnes, J. L., Zammit, P. S., & Beauchamp, J. R. (2018). Delta-Like 4 Activates Notch 3 to Regulate Self-Renewal in Skeletal Muscle Stem Cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 36(3), 458–466. <https://doi.org/10.1002/STEM.2757>
- Lukjanenko, L., Jung, M. J., Hegde, N., Perruisseau-Carrier, C., Migliavacca, E., Rozo, M., Karaz, S., Jacot, G., Schmidt, M., Li, L., Metairon, S., Raymond, F., Lee, U., Sizzano, F., Wilson, D. H., Dumont, N. A., Palini, A., Fässler, R., Steiner, P., ... Bentzinger, C. F. (2016). Loss of fibronectin from the aged stem cell niche affects the regenerative capacity of skeletal muscle in mice. *Nature Medicine* 2016 22:8, 22(8), 897–905. <https://doi.org/10.1038/nm.4126>
- Lukjanenko, L., Karaz, S., Stuelsatz, P., Gurriaran-Rodriguez, U., Michaud, J., Dammone, G., Sizzano, F., Mashinchian, O., Ancel, S., Migliavacca, E., Liot, S., Jacot, G., Metairon, S., Raymond, F., Descombes, P., Palini, A., Chazaud, B., Rudnicki, M. A., Bentzinger, C. F., & Feige, J. N. (2019). Aging Disrupts Muscle Stem Cell Function by Impairing Matricellular WISP1 Secretion from Fibro-Adipogenic Progenitors. *Cell Stem Cell*, 24(3), 433-446.e7. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2018.12.014>
- Luo, D., De Morree, A., Boutet, S., Quach, N., Natu, V., Rustagi, A., & Rando, T. A. (2017). Deltex2 represses MyoD expression and inhibits myogenic differentiation by acting as a negative regulator of Jmjd1c. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 114(15), E3071–E3080.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1613592114/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Malecova, B., Gatto, S., Etzaniz, U., Passafaro, M., Cortez, A., Nicoletti, C., Giordani, L., Torcinaro, A., De Bardi, M., Bicciato, S., De Santa, F., Madaro, L., & Puri, P. L. (2018). Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy. *Nature Communications*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/S41467-018-06068-6>
- Massenet, J., Gardner, E., Chazaud, B., & Dilworth, F. J. (2021). Epigenetic regulation of satellite cell fate during skeletal muscle regeneration. *Skeletal Muscle*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S13395-020-00259-W>
- MAURO, A. (1961). SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 9(2), 493.
<https://doi.org/10.1083/JCB.9.2.493>
- McKinnell, I. W., Ishibashi, J., Le Grand, F., Punch, V. G. J., Addicks, G. C., Greenblatt, J. F., Dilworth, F. J., & Rudnicki, M. A. (2008). Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nature Cell Biology*, 10(1), 77. <https://doi.org/10.1038/NCB1671>
- Molina, T., Fabre, P., & Dumont, N. A. (2021). Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis, regeneration and diseases. *Open Biology*, 11(12).
<https://doi.org/10.1098/RSOB.210110>
- Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T., & Buckingham, M. (2005). Developmental biology: Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*, 309(5743), 2064–2067.
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1114758/SUPPL_FILE/MONTARRAS-SOM.PDF
- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006 441:7097, 441(7097), 1068–1074.
<https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Moss, F. P., & Leblond, C. P. (1971). Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *The Anatomical Record*, 170(4), 421–435.
<https://doi.org/10.1002/AR.1091700405>
- Mourikis, P., Gopalakrishnan, S., Sambasivan, R., & Tajbakhsh, S. (2012). Cell-autonomous Notch activity maintains the temporal specification potential of skeletal muscle stem cells. *Development*, 139(24), 4536–4548.
<https://doi.org/10.1242/DEV.084756>
- Naito, M., Mori, M., Inagawa, M., Miyata, K., Hashimoto, N., Tanaka, S., & Asahara, H. (2016). Dnmt3a Regulates Proliferation of Muscle Satellite Cells via p57Kip2. *PLoS Genetics*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006167>
- Pala, F., Di Girolamo, D., Mella, S., Yennek, S., Chatre, L., Ricchetti, M., & Tajbakhsh, S. (2018). Distinct metabolic states govern skeletal muscle stem cell fates during

- prenatal and postnatal myogenesis. *Journal of Cell Science*, 131(14). <https://doi.org/10.1242/JCS.212977/56828>
- Palacios, D., Mozzetta, C., Consalvi, S., Caretti, G., Saccone, V., Proserpio, V., Marquez, V. E., Valente, S., Mai, A., Forcales, S. V., Sartorelli, V., & Puri, P. L. (2010). TNF/p38 α /polycomb signaling to Pax7 locus in satellite cells links inflammation to the epigenetic control of muscle regeneration. *Cell Stem Cell*, 7(4), 455–469. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.08.013>
- Patsalos, A., Simandi, Z., Hays, T. T., Peloquin, M., Hajian, M., Restrepo, I., Coen, P. M., Russell, A. J., & Nagy, L. (2018). In vivo GDF3 administration abrogates aging related muscle regeneration delay following acute sterile injury. *Aging Cell*, 17(5), e12815. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12815>
- Perdiguero, E., Ruiz-Bonilla, V., Gresh, L., Hui, L., Ballestar, E., Sousa-Victor, P., Baeza-Raja, B., Jardí, M., Bosch-Comas, A., Esteller, M., Caelles, C., Serrano, A. L., Wagner, E. F., & Muñoz-Cánoves, P. (2007). Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38 α in abrogating myoblast proliferation. *The EMBO Journal*, 26(5), 1245. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601587>
- Price, F. D., Von Maltzahn, J., Bentzinger, C. F., Dumont, N. A., Yin, H., Chang, N. C., Wilson, D. H., Frenette, J., & Rudnicki, M. A. (2014). Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function. *Nature Medicine* 20:10, 20(10), 1174–1181. <https://doi.org/10.1038/nm.3655>
- Quarta, M., Brett, J. O., DiMarco, R., De Morree, A., Boutet, S. C., Chacon, R., Gibbons, M. C., Garcia, V. A., Su, J., Shrager, J. B., Heilshorn, S., & Rando, T. A. (2016). An artificial niche preserves the quiescence of muscle stem cells and enhances their therapeutic efficacy. *Nature Biotechnology* 2016 34:7, 34(7), 752–759. <https://doi.org/10.1038/nbt.3576>
- Rayagiri, S. S., Ranaldi, D., Raven, A., Mohamad Azhar, N. I. F., Lefebvre, O., Zammit, P. S., & Borycki, A. G. (2018). Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03425-3>
- Relaix, F., Bencze, M., Borok, M. J., Der Vartanian, A., Gattazzo, F., Mademtzoglou, D., Perez-Diaz, S., Prola, A., Reyes-Fernandez, P. C., Rotini, A., & Taglietti. (2021). Perspectives on skeletal muscle stem cells. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20760-6>
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A., & Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *The Journal of Cell Biology*, 172(1), 91–102. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508044>
- Rocheteau, P., Gayraud-Morel, B., Siegl-Cachedenier, I., Blasco, M. A., & Tajbakhsh, S. (2012). A Subpopulation of Adult Skeletal Muscle Stem Cells Retains All Template DNA Strands after Cell Division. *Cell*, 148(1–2), 112–125. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.11.049>

- Ryall, J. G., Dell'Orso, S., Derfoul, A., Juan, A., Zare, H., Feng, X., Clermont, D., Koulis, M., Gutierrez-Cruz, G., Fulco, M., & Sartorelli, V. (2015). The NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell Stem Cell*, 16(2), 171–183. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2014.12.004>
- Sahu, A., Mamiya, H., Shinde, S. N., Cheikhi, A., Winter, L. L., Vo, N. V., Stolz, D., Roginskaya, V., Tang, W. Y., St. Croix, C., Sanders, L. H., Franti, M., Van Houten, B., Rando, T. A., Barchowsky, A., & Ambrosio, F. (2018). Age-related declines in α -Klotho drive progenitor cell mitochondrial dysfunction and impaired muscle regeneration. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07253-3>
- Sampath, S. C., Sampath, S. C., Ho, A. T. V., Corbel, S. Y., Millstone, J. D., Lamb, J., Walker, J., Kinzel, B., Schmedt, C., & Blau, H. M. (2018). Induction of muscle stem cell quiescence by the secreted niche factor Oncostatin M. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03876-8>
- Schwörer, S., Becker, F., Feller, C., Baig, A. H., Köber, U., Henze, H., Kraus, J. M., Xin, B., Lechel, A., Lipka, D. B., Varghese, C. S., Schmidt, M., Rohs, R., Aebersold, R., Medina, K. L., Kestler, H. A., Neri, F., Von Maltzahn, J., Tümpel, S., & Rudolph, K. L. (2016). Epigenetic stress responses induce muscle stem-cell ageing by Hoxa9 developmental signals. *Nature* 2016 540:7633, 540(7633), 428–432. <https://doi.org/10.1038/nature20603>
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., & Rudnicki, M. A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6), 777–786. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00066-0)
- Shea, K. L., Xiang, W., LaPorta, V. S., Licht, J. D., Keller, C., Basson, M. A., & Brack, A. S. (2010). Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration. *Cell Stem Cell*, 6(2), 117–129. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2009.12.015>
- Shirakawa, T., Toyono, T., Inoue, A., Matsubara, T., Kawamoto, T., & Kokabu, S. (2022). Factors Regulating or Regulated by Myogenic Regulatory Factors in Skeletal Muscle Stem Cells. *Cells*, 11(9), 1493. <https://doi.org/10.3390/CELLS11091493>
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J. M., Pazin, M. J., Davie, J. R., & Peterson, C. L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 311(5762), 844–847. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1124000/SUPPL_FILE/SHOGREN-KNAAK.SOM.PDF
- Snow, M. H. (1977). Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing II. An autoradiographic study. *The Anatomical Record*, 188(2), 201–217. <https://doi.org/10.1002/AR.1091880206>

- Sousa-Victor, P., García-Prat, L., & Muñoz-Cánoves, P. (2021). Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 23:3, 23(3), 204–226. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00421-2>
- Tidball, J. G. (2017). Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 17(3), 165–178. <https://doi.org/10.1038/NRI.2016.150>
- Varga, T., Mounier, R., Patsalos, A., Gogolák, P., Peloquin, M., Horvath, A., Pap, A., Daniel, B., Nagy, G., Pintye, E., Poliska, S., Cuvellier, S., Ben Larbi, S., Sansbury, B. E., Spite, M., Brown, C. W., Chazaud, B., & Nagy, L. (2016). Macrophage PPAR γ , a Lipid Activated Transcription Factor Controls the Growth Factor GDF3 and Skeletal Muscle Regeneration. *Immunity*, 45(5), 1038–1051. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2016.10.016>
- Verma, M., Asakura, Y., Murakonda, B. S. R., Pengo, T., Latroche, C., Chazaud, B., McLoon, L. K., & Asakura, A. (2018). Muscle Satellite Cell Cross-Talk with a Vascular Niche Maintains Quiescence via VEGF and Notch Signaling. *Cell Stem Cell*, 23(4), 530-543.e9. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2018.09.007>
- Von Maltzahn, J., Jones, A. E., Parks, R. J., & Rudnicki, M. A. (2013). Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(41), 16474–16479. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1307680110/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Wellen, K. E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U. M., Bui, T. V., Cross, J. R., & Thompson, C. B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1076. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1164097>
- Wen, Y., Bi, P., Liu, W., Asakura, A., Keller, C., & Kuang, S. (2012). Constitutive Notch Activation Upregulates Pax7 and Promotes the Self-Renewal of Skeletal Muscle Satellite Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 32(12), 2300. <https://doi.org/10.1128/MCB.06753-11>
- Wu, Z., Woodring, P. J., Bhakta, K. S., Tamura, K., Wen, F., Feramisco, J. R., Karin, M., Wang, J. Y. J., & Puri, P. L. (2000). p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate the Myogenic Program at Multiple Steps. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11), 3951. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.3951-3964.2000>
- Xin Wang, Y., & Rudnicki, M. A. (2012). *Satellite cells, the engines of muscle repair*. <https://doi.org/10.1038/nrm3265>
- Yin, H., Price, F., & Rudnicki, M. A. (2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Rev*, 93, 23–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011.-Adult>
- Yucel, N., Wang, Y. X., Mai, T., Porpiglia, E., Lund, P. J., Markov, G., Garcia, B. A., Bendall, S. C., Angelo, M., & Blau, H. M. (2019). Glucose Metabolism Drives

Histone Acetylation Landscape Transitions that Dictate Muscle Stem Cell Function. *Cell Reports*, 27(13), 3939-3955.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.05.092>

Yue, L., Wan, R., Luan, S., Zeng, W., & Cheung, T. H. (2020). Dek Modulates Global Intron Retention during Muscle Stem Cells Quiescence Exit. *Developmental Cell*, 53(6), 661-676.e6. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2020.05.006>

Zhang, C., Cheng, N., Qiao, B., Zhang, F., Wu, J., Liu, C., Li, Y., & Du, J. (2020). Age-related decline of interferon-gamma responses in macrophage impairs satellite cell proliferation and regeneration. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 11(5), 1291–1305. <https://doi.org/10.1002/JCSM.12584>