

Avances en el desarrollo de la terapia celular para las distrofias musculares

Advances in the development of cell therapy for muscular dystrophies

R Mondragón-González,* Bulmaro Cisneros Vega*

* Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), México, D.F.

Dirección para correspondencia:
Dr. Bulmaro Cisneros Vega
Av. IPN Núm. 2508,
Col. San Pedro Zacatenco, 07360,
Delegación Gustavo A. Madero,
Ciudad de México, D.F.
Tel: +52 55 5061 3339
Fax: +52 55 5061 3931
E-mail: bcisnero@cinvestav.mx

Recibido: 5 de junio de 2015.
Aceptado: 14 de junio de 2015.

Este artículo puede ser consultado
en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Abreviaturas:

DMD = distrofia muscular de Duchenne.
DM1 = distrofia miotónica 1.
DMB = distrofia muscular de Becker.
EDMD = distrofia muscular de Emery-Dreifuss.
FHSD = distrofia muscular facioescapulohumeral.
LGMD = distrofia muscular de la cintura y extremidades.
OPMD = distrofia oculofaríngea.
MDSC = células madre derivadas de músculo.
ESC = células madre embrionarias.
EB = cuerpos embrionarios.
iPSC = células madre pluripotenciales inducidas.
TALEN = nucleasas efectoras parecidas a activadores de la transcripción.
CRISPR-Cas = repetidos palindrómicos cortos regularmente espaciados y agrupados.

Resumen

Las distrofias musculares son enfermedades que generan principalmente debilidad y desgaste muscular de manera progresiva. Actualmente, no existe alguna cura o terapia eficiente que regenere el tejido muscular dañado, por lo que se siguen desarrollando diferentes estrategias experimentales para lograr ese fin. Uno de los enfoques más prometedores implica el trasplante de células sanas que promuevan la regeneración muscular en los pacientes con distrofia muscular. En los últimos años, se ha experimentado con diferentes poblaciones de células madre específicas de tejido para utilizarlas en la terapia celular contra diferentes distrofias musculares. Recientemente, el empleo de células madre embrionarias y células madre pluripotenciales inducidas ha arrojado resultados alentadores en modelos murinos. En la presente revisión se recapitulan los estudios y estrategias experimentales que se han desarrollado con el fin de establecer una terapia celular eficiente para combatir las distrofias musculares.

Abstract

Muscular dystrophies are genetic diseases characterized by progressive muscular wasting. So far, no therapy is available to cure or ameliorate the course of these pathologies; however, different experimental strategies are currently in development to tackle them. One promising approach involves the transfer of healthy cells to the patient, in order to regenerate muscle tissue. In recent years, different populations of tissue-specific stem cells have been used in cell therapy to fight muscular dystrophies. Recently, the use of embryonic stem cells and induced stem cells has provided promising results in dystrophic murine models. In this review, we recapitulated a series of studies and experimental strategies designed toward the development of an efficient cell therapy against muscular dystrophies.

Palabras clave: Distrofia muscular, terapia celular, células madre, células satelitales, células madre embrionarias, células madre pluripotenciales inducidas.

Key words: Muscular dystrophy, cell therapy, stem cells, satellite cells, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells.

Introducción

Las distrofias musculares

Las distrofias musculares comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias cuya característica principal es generar debilidad y desgaste muscular de manera progresiva en el paciente. La severidad del daño, la edad de inicio de la enfermedad y los músculos afectados varían entre los diferentes tipos de distrofia muscular.¹ Se estima que aproximadamente 19-25 de cada 100,000 individuos presentan algún tipo de distrofia muscular; entre ellas, las más comunes son la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia miotónica 1 (DM1).²

La DMD es la distrofia muscular con mayor incidencia (1:3,500-5,000).^{2,3} Esta enfermedad tiene un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X, por lo que afecta casi exclusivamente a los varones. La DMD es causada por mutaciones en el gen DMD que provocan la deficiencia o ausencia de la distrofina. Esta proteína es necesaria para mantener la integridad de la fibra muscular, por lo que su disfunción ocasiona desgaste y debilidad muscular severos.⁴ Los pacientes con DMD pierden la locomoción desde las etapas tempranas de la adolescencia y, por lo general, fallecen por afecciones cardiorrespiratorias en la segunda década de vida.

Debido a que los pacientes con DMD mueren en la adultez temprana, la distrofia muscular con mayor prevalencia en adultos es la DM1 (1:8,000).^{2,5} La DM1 es causada por la expansión de repetidos de trinucleótidos CTG en la región no traducida 3' del gen DMPK.⁶ Esta enfermedad es de tipo multisistémico y genera daños principalmente en el sistema muscular, el sistema nervioso central y el corazón.⁵ Las manifestaciones clínicas se pueden presentar desde el nacimiento, en la infancia o en la adultez. La característica particular de la DM1 es la miotonía, que consiste en una hiperexcitabilidad muscular que provoca un retraso en el tiempo de relajación poste-

rior a la contracción muscular.⁷ Otras manifestaciones incluyen debilidad muscular, anomalías en los conductos cardíacos, daños cognitivos, cataratas y problemas respiratorios.⁵

Además de la DMD y la DM1, otras distrofias musculares frecuentes incluyen a la distrofia muscular de Becker (DMB), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), distrofia muscular facioescapulohumeral (FHSD), distrofia muscular de la cintura y extremidades (LGMD) y distrofia oculofaríngea (OPMD).

Utilización de células madre específicas de tejido para la terapia celular de las distrofias musculares

A pesar de que se conoce la patogénesis de la mayoría de las distrofias musculares, no existe actualmente alguna cura para el fenotipo muscular de estas enfermedades.⁸ Una de las estrategias experimentales más estudiadas en los últimos años es la terapia celular basada en células madre, cuya finalidad es promover la regeneración muscular en los pacientes con distrofia muscular. La terapia celular implica el trasplante de células vivas al individuo, y la utilización de células madre ha despertado gran interés para este tipo de terapia porque poseen la capacidad de autorrenovación (proliferación ilimitada) y de diferenciación hacia uno o diferentes tipos de tejidos.⁹ En el caso de las distrofias musculares, un reto importante consiste en encontrar una población adecuada de células progenitoras que pueda adaptarse al tejido muscular y promover su regeneración.

CÉLULAS SATELITALES

El músculo esquelético tiene la capacidad de regenerarse después de sufrir una lesión gracias a una población de células madre musculares llamadas «células satelitales». Estas se encuentran en un estado indiferenciado, pero comprometidas a un destino

muscular. Las células satelitales fueron descritas morfológicamente en 1961 por Alexander Mauro como una población de células mononucleadas que se encuentran ubicadas entre la lámina basal y la membrana plasmática de las fibras musculares.¹⁰ Normalmente, las células satelitales se encuentran en un estado quiescente; sin embargo, al haber condiciones de estrés en las fibras musculares (por ejercicio o lesión), las células se activan, proliferan y se fusionan para formar nuevas miofibras.¹¹ Debido a su capacidad de reparación de las fibras musculares, las primeras células utilizadas para llevar a cabo una terapia celular para las distrofias musculares fueron los mioblastos (células satelitales activadas y en proliferación). En 1989, Patridge y colaboradores trasplantaron una línea celular de mioblastos de ratón (C2C12) a un ratón *mdx* (modelo murino de la DMD) y demostraron que los mioblastos trasplantados podían adaptarse al tejido muscular del ratón y generar nuevas miofibras que expresaban distrofina.¹² Resultados similares se obtuvieron al trasplantar mioblastos aislados de un ratón adulto y mioblastos humanos,^{13,14} por lo que en los años 90 se realizaron las primeras pruebas clínicas de trasplante de mioblastos en pacientes con DMD. Los resultados obtenidos no fueron exitosos, ya que los mioblastos trasplantados tuvieron una deficiente adaptación y migración en el tejido muscular de los sujetos.¹⁵⁻¹⁷

OTRAS CÉLULAS MADRE ESTUDIADAS PARA LA TERAPIA DE DISTROFIAS MUSCULARES

Además de las células satelitales, se han identificado otras poblaciones de células madre con potencial capacidad de regeneración muscular. Entre las más estudiadas, se encuentran los mesoangioblastos (pericitos), las células madre derivadas de músculo (MDSC) y una población de células progenitoras que expresa el marcador CD133 (CD133⁺).

Los mesoangioblastos (en ratón) o pericitos (en humano) son células madre que se encuentran rodeando a las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Se ha demostrado que estas células son capaces de diferenciarse hacia diferentes tejidos mesodérmicos, incluyendo el músculo esquelético. Además, estas células tienen la capacidad de migrar a través del endotelio vascular, por lo que son de gran interés para lograr un trasplante sistémico en pacientes con distrofia muscular.¹⁸ El trasplante intraarterial de mesoangioblastos en modelos murinos y caninos de distrofia muscular ha evidenciado la capacidad de estas células para migrar al tejido muscular, recupe-

rar la morfología y mejorar el funcionamiento de este tejido.^{19,20} Además, al igual que los mesoangioblastos, los pericitos presentan la capacidad de generar nuevas miofibras y contribuir con la población de células satelitales cuando se inyectan de manera intraarterial en ratones *mdx*.²¹ La limitante más importante en el uso de estas células es la obtención de un número de pericitos funcionales en cultivo que sea suficiente para su aplicación en terapia celular.

Las células madre derivadas de músculo (MDSC) se identificaron en el espacio intersticial del músculo de ratón²² y se purificaron tomando ventaja de su capacidad de adhesión a placas cubiertas de colágeno.²³ Estas células tienen la capacidad de autorrenovación y diferenciación a varios linajes mesodérmicos, como sangre, hueso y músculo. De manera interesante, estas células tienen la característica de adherirse y transmigrar hacia el tejido muscular cuando se administran de manera intravenosa (IV) e intraarterial.^{24,25} Sin embargo, la adaptación de las células trasplantadas al tejido muscular es deficiente, por lo que no han podido ser utilizadas como terapia contra las distrofias musculares.²⁶

Otra población celular de interés es la que presenta el marcador CD133⁺. Estas células se aislaron en un principio de sangre periférica y, posteriormente, de músculo esquelético. Las células CD133⁺ presentan marcadores miogénicos y se ha demostrado que poseen la capacidad de adaptarse al tejido muscular de ratones *mdx*, promoviendo la recuperación de la función muscular.^{27,28} Sin embargo, la fracción de células CD133⁺ es baja en el músculo esquelético, por lo que su aplicación está limitada por las dificultades técnicas de su purificación y expansión en cultivo.²⁹

Empleo de células pluripotenciales para la terapia celular de las distrofias musculares

CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

El auge reciente en la investigación de las células madre embrionarias (ESC) ha dado un impulso decisivo a la terapia celular dirigida contra las distrofias musculares. Las ESC son obtenidas de la masa interna del blastocisto.³⁰ Estas células son de gran interés para el desarrollo de terapias contra diferentes enfermedades, ya que se autorrenuevan en su forma indiferenciada y se diferencian hacia tejidos derivados del ectodermo, endodermo y mesodermo (pluripotencialidad).

El uso de las ESC para la terapia celular contra las distrofias musculares tuvo un avance lento al inicio, ya

que el trasplante de estas células genera tumores formados por tejidos embrionarios, llamados teratomas.³¹ Fue, entonces, necesario generar condiciones de cultivo que permitieran enriquecer poblaciones miogénicas para ser trasplantadas como posible terapia celular. Se describió que cuando las ESC son cultivadas en ausencia de fibroblastos embrionarios alimentadores, se forman estructuras tridimensionales denominadas «cuerpos embrionarios» (EB), los cuales contienen fibras musculares multinucleadas.³² Los primeros intentos por enriquecer una población miogénica a partir de ESC involucraron el cocultivo de los EB con células precursoras musculares previamente a su trasplante en un ratón con distrofia muscular.³³ En otro estudio, las ESC se cultivaron en condiciones que favorecían su diferenciación hacia células mesenquimales, lo cual generó mioblastos que fueron trasplantados posteriormente en un ratón inmunodeficiente.³⁴ A pesar de que en ambos intentos se obtuvieron células miogénicas, no se logró el enriquecimiento esperado de la población progenitora muscular. En el año 2008, Darabi y colaboradores³⁵ propusieron que la baja producción de progenitores miogénicos a partir de ESC se debe a que durante la formación de EB no se genera el desarrollo del mesodermo paraxial, estructura clave en la miogénesis embrionaria. Para estimular la población miogénica del mesodermo paraxial, se indujo la expresión transitoria de Pax3, factor de transcripción clave para la miogénesis. De esta manera, la selección de las células conforme a los marcadores de superficie PDGFR α R⁺/Flk1⁻ enriqueció una población celular correspondiente a los progenitores miogénicos del mesodermo paraxial de ratón. Al trasplantar esta población de progenitores miogénicos sanos derivados de ESC en ratones *mdx*, se observó una buena adaptación de las células al tejido muscular, ausencia de teratomas y la formación de nuevas fibras musculares que expresaban distrofina; ello, en consecuencia, mejoró la función muscular del ratón distrófico.³⁵⁻³⁷

La utilización de las ESC para combatir diferentes enfermedades es prometedora; sin embargo, existen dos limitantes principales: la regulación ética actual —que no permite el uso de células embrionarias para terapia en el humano— y el rechazo inmunológico de las células trasplantadas. Un segundo enfoque que sobrepasa estas limitaciones es la generación de células madre pluripotenciales inducidas.

CÉLULAS MADRE PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS

Yamanaka y colaboradores demostraron que es posible reprogramar células somáticas de adulto (fibro-

blastos de ratón y humano) hacia un estado parecido al embrionario a través de la introducción mediada por vectores virales de una serie definida de factores de transcripción que incluye Oct3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4.^{38,39} A estas células reprogramadas se les llamó «células madre pluripotenciales inducidas» (iPSC). La comunidad científica logró reproducir de manera exitosa los resultados observados por Yamanaka y se demostró que las iPSC tienen características muy similares a las ESC en lo que respecta a su capacidad de autorrenovación y pluripotencialidad.³⁸⁻⁴⁷ El empleo de las iPSC ha generado muchas expectativas, ya que al no tener un origen embrionario, no existen limitantes éticas para su empleo en la clínica. Por otro lado, se abre la posibilidad de desarrollar una terapia autóloga, es decir, utilizar células somáticas del propio paciente (fibroblastos de la piel) para reprogramarlas a iPSC, corregir en ellas el defecto causante de la patología por medio de terapia génica, derivarlas posteriormente hacia un linaje de tejido específico y regresarlas nuevamente al individuo mediante trasplante (*Figura 1*). De esta manera, se evitaría el rechazo inmunológico que ocurre en el enfoque de trasplante alogénico.

Al igual que con las ESC, la terapia celular basada en las iPSC requiere de una población de células específicas del tejido deseado para evitar la formación de teratomas. Además, se requiere de la adaptación de las células derivadas de las iPSC al tejido trasplantado. En el área de las distrofias musculares, los enfoques previamente descritos para la generación de progenitores miogénicos a partir de ESC han servido de base para examinar el potencial terapéutico de las iPSC. Darabi y colaboradores lograron purificar progenitores miogénicos mediante la inducción transitoria de Pax7 durante la diferenciación de EB generados a partir de iPSC de ratón.⁴⁸ De manera interesante, este grupo de investigación logró producir progenitores miogénicos a partir de iPSC de humano, las cuales restablecieron la expresión de la distrofina y mejoraron el funcionamiento muscular del ratón distrófico *mdx*.⁴⁹ Por otro lado, Awaya y su equipo desarrollaron células mesenquimales miogénicas a partir de iPSC utilizando condiciones controladas de cultivo. Estas células formaron miotubos *in vitro* y se adaptaron al tejido muscular de un ratón inmunodeficiente, logrando finalmente inducir regeneración muscular después de una lesión.⁵⁰

Una vez que se ha logrado la generación de progenitores miogénicos derivados de iPSC, el siguiente paso por abordar es la terapia autóloga, lo que implica la corrección molecular de las iPSC para que los progenitores miogénicos ya no porten la mutación causante

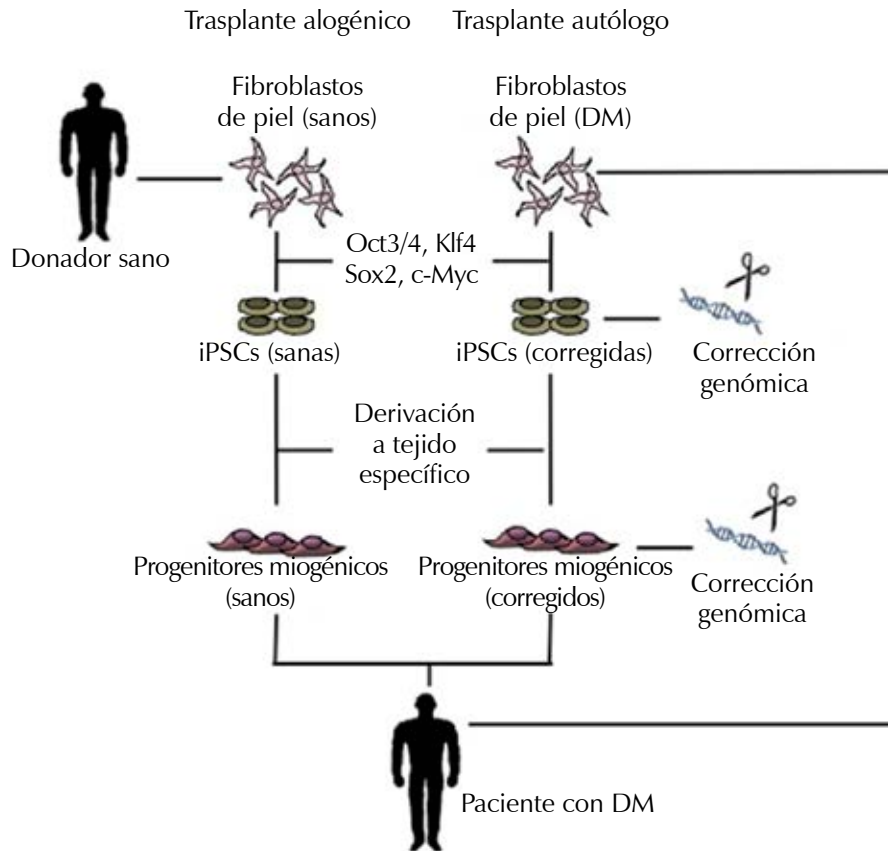


Figura 1. Trasplantes alotópico y autólogo basados en iPSC para la terapia celular de distrofias musculares. El trasplante alotópico implica la producción de iPSC a partir de un donador sano. Posteriormente, las células reprogramadas deben ser diferenciadas a un linaje muscular antes de ser trasplantadas a un paciente con distrofia muscular (DM). Es un requisito indispensable que exista una compatibilidad inmunológica entre el donador y el receptor para evitar el rechazo de las células trasplantadas. El trasplante autólogo involucra la generación de iPSC a partir de células del sujeto con DM. Posteriormente, las iPSC se corrigen para eliminar la mutación causante de la DM o, alternativamente, se diferencian a progenitores miogénicos para realizar entonces la corrección genómica de las células. En cualquier caso, se obtienen progenitores miogénicos corregidos que pueden ser regresados al individuo mediante trasplante autólogo para evitar, así, el rechazo inmunológico.

de la distrofia muscular. A este respecto, Filareto y colegas reprogramaron fibroblastos obtenidos de la cola de un ratón con fenotipo severo de DMD y, posteriormente, les introdujeron el minigen de la utrofina, proteína homóloga de la distrofina que reemplaza parcialmente su función. De manera interesante, se observó que el ratón distrófico recuperó parcialmente su fuerza muscular después del trasplante de los progenitores miogénicos corregidos.⁵¹

Por su parte, Tedesco y su grupo obtuvieron células con características de mesoangioblastos a partir de iPSC de individuos sanos y de pacientes con distrofia de cintura y extremidades (LGMD). Después, repararon el defecto genético de los mesoangioblastos

mediante la transducción viral del gen silvestre que codifica para el α -sarcoglicano (gen SGCA), y las células corregidas se trasplantaron por vía intravenosa e intraarterial a un ratón modelo de la LGMD. De acuerdo con las expectativas, las células trasplantadas formaron miofibras que expresaban el α -sarcoglicano y, consecuentemente, indujeron un aumento en la fuerza y resistencia muscular del ratón distrófico.⁵²

Recientemente, Hongmei y colaboradores lograron corregir el genoma de iPSCs provenientes de un paciente con DMD,⁵³ utilizando las herramientas moleculares TALEN (nucleasas efectoras parecidas a activadores de la transcripción) y CRISPR-Cas (repetidos palindrómicos cortos regularmente espaciados y

agrupados). Posteriormente las iPSCs corregidas se diferenciaron hacia células de músculo esquelético y se demostró que expresaban distrofina; sin embargo, el impacto terapéutico de estas células no se ha probado en un sistema *in vivo*.⁵³

A pesar de los resultados prometedores obtenidos con la terapia celular que utiliza iPSC corregidas, se requiere mejorar algunos aspectos antes de su aplicación a nivel clínico. Se deben buscar alternativas para la reprogramación celular que no involucren vectores virales. Así mismo, se debe elegir la ruta de administración que asegure una distribución sistémica eficiente de las células trasplantadas (intravenosa o intraarterial). Finalmente, es necesario monitorear a través del tiempo las células trasplantadas para verificar que mantienen su estado diferenciado y descartar el riesgo de formación de tumores.

Conclusiones

El uso de células madre de tejido específico para la terapia celular de las distrofias musculares ha generado gran interés en las últimas dos décadas. Sin embargo, aún existen limitantes en cuanto a la expansión adecuada de estas células *in vitro* que permita contar con un número suficiente de ellas para el trasplante. Además, las células trasplantadas no han mostrado la adaptación y expansión necesarias para la recuperación de la función muscular en modelos animales de distrofia. En este sentido, la derivación de progenitores miogénicos a partir de células madre embrionarias representa un modelo potencial de terapia celular alogénica para las distrofias musculares; no obstante, existen limitantes éticas e inmunológicas propias de este tipo de terapia que dificultan su uso real en la clínica. Ante este escenario, la generación de células madre pluripotenciales inducidas a partir de células somáticas de adulto constituye un avance crucial para el desarrollo de la terapia celular, ya que las iPSC mantienen las ventajas de autorrenovación y pluripotencialidad de las ESC sin las limitantes éticas de estas últimas. La utilización de progenitores miogénicos derivados de iPSC ha generado resultados prometedores en la regeneración muscular dentro del enfoque de trasplante alogénico. Además, los recientes avances de la biología molecular, que posibilitan la edición del genoma en regiones específicas, permitirán el uso de iPSC con un enfoque de terapia autóloga para los pacientes con distrofia muscular. Entre los aspectos clave que se deben consolidar para utilizar la terapia celular basada en iPSC en la clínica se incluyen la elección de una vía de administración que permita la distribución

sistémica de los progenitores miogénicos derivados de iPSC y la exclusión del uso de vectores virales para la reprogramación y corrección de las células.

Bibliografía

1. Flanigan KM. The muscular dystrophies. *Semin Neurol*. 2012; 32: 255-263. doi: 10.1055/s-0032-1329199.
2. Theadom A et al. Prevalence of muscular dystrophies: a systematic literature review. *Neuroepidemiology*. 2014; 43: 259-268. doi: 10.1159/000369343.
3. Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey. *Neuromuscul Disord*. 1991; 1: 19-29.
4. Kumar A, Khandelwal N, Malya R, Reid MB, Boriek AM. Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers. *FASEB J*. 2004; 18: 102-113. doi: 10.1096/fj.03-0453com.
5. Harper PS, van Engelen BG, Eymard B, Rogers M, Wilcox D. 99th ENMC international workshop: myotonic dystrophy: present management, future therapy. 9-11 November 2001, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2002; 12: 596-599.
6. Mahadevan M et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science*. 1992; 255: 1253-1255.
7. Schara U, Schoser BG. Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects. *Semin Pediatr Neurol*. 2006; 13: 71-79. doi: 10.1016/j.spen.2006.06.002.
8. Shieh PB. Muscular dystrophies and other genetic myopathies. *Neurol Clin*. 2013; 31: 1009-1029. doi: 10.1016/j.ncl.2013.04.004.
9. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000; 100: 157-168.
10. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961; 9: 493-495.
11. Carlson BM. The regeneration of skeletal muscle. A review. *Am J Anat*. 1973; 137: 119-149. doi: 10.1002/aja.1001370202.
12. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibers from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*. 1989; 337: 176-179. doi: 10.1038/337176a0.
13. Huard J, Verreault S, Roy R, Tremblay M, Tremblay JP. High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J Clin Invest*. 1994; 93: 586-599. doi: 10.1172/JCI117011.
14. Kinoshita I et al. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve*. 1994; 17: 1407-1415. doi: 10.1002/mus.880171210.
15. Gussoni E, Blau HM, Kunkel LM. The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nature Medicine*. 1997; 3: 970-977.

16. Mendell JR et al. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*. 1995; 333: 832-838. doi: 10.1056/NEJM199509283331303.
17. Miller RG et al. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve*. 1997; 20: 469-478.
18. Minasi MG et al. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*. 2002; 129: 2773-2783.
19. Sampaioles M et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*. 2006; 444: 574-579. doi: 10.1038/nature05282.
20. Sampaioles M et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 2003; 301: 487-492. doi: 10.1126/science.1082254.
21. Dellavalle A et al. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat Commun*. 2001; 2: 499. doi: 10.1038/ncomms1508.
22. Qu-Petersen Z et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol*. 2002; 157: 851-864. doi: 10.1083/jcb.200108150.
23. Sarig R, Baruchi Z, Fuchs O, Nudel U, Yaffe D. Regeneration and transdifferentiation potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. *Stem Cells*. 2006; 24: 1769-1778. doi: 10.1634/stemcells.2005-0547.
24. Torrente Y et al. Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscular dystrophy model. *J Cell Biol*. 2003; 162: 511-520. doi: 10.1083/jcb.200210006.
25. Torrente Y et al. Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol*. 2001; 152: 335-348.
26. Chirieleison SM, Feduska JM, Schugar RC, Askew Y, Deasy BM. Human muscle-derived cell populations isolated by differential adhesion rates: phenotype and contribution to skeletal muscle regeneration in Mdx/SCID mice. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18: 232-241. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0553.
27. Torrente Y et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2004; 114: 182-195. doi: 10.1172/JCI20325.
28. Torrente Y et al. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant*. 2007; 16: 563-577.
29. Meng J, Muntoni F, Morgan JE. Stem cells to treat muscular dystrophies—where are we? *Neuromuscul Disord*. 2011; 21: 4-12. doi: 10.1016/j.nmd.2010.10.004.
30. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292: 154-156.
31. Bodnar MS, Meneses JJ, Rodriguez RT, Firpo MT. Propagation and maintenance of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2004; 13: 243-253. doi: 10.1089/154732804323099172.
32. Sanchez A, Jones WK, Gulick J, Doetschman T, Robbins J. Myosin heavy chain gene expression in mouse embryoid bodies. An *in vitro* developmental study. *J Biol Chem*. 1991; 266: 22419-22426.
33. Bhagavati S, Xu W. Generation of skeletal muscle from transplanted embryonic stem cells in dystrophic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 333: 644-649. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.135.
34. Barberi T et al. Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med*. 2007; 13: 642-648. doi: 10.1038/nm1533.
35. Darabi R et al. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med*. 2008; 14: 134-143. doi: 10.1038/nm1705.
36. Darabi R et al. Engraftment of embryonic stem cell-derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy. *Experimental Neurology*. 2009; 220: 212-216. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.002.
37. Filareto A, Darabi R, Perlingeiro RC. Engraftment of ES-derived myogenic progenitors in a severe mouse model of muscular dystrophy. *J Stem Cell Res Ther*. 2012; 10: doi: 10.4172/2157-7633.S10-001.
38. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*. 2007; 2: 3081-3089. doi: 10.1038/nprot.2007.418.
39. Takahashi K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
40. Yuan TF, Arias-Carrion O. Locally induced neural stem cells/pluripotent stem cells for *in vivo* cell replacement therapy. *Int Arch Med*. 2008; 1: 17. doi: 10.1186/1755-7682-1-17.
41. Mali P et al. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells*. 2008; 26: 1998-2005. doi: 10.1634/stemcells.2008-0346.
42. Ebert AD et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009; 457: 277-280. doi: 10.1038/nature07677.
43. Park IH et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008; 451: 141-146. doi: 10.1038/nature06534.
44. Maherali N et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 2007; 1: 55-70. doi: 10.1016/j.stem.2007.05.014.
45. Wernig M et al. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007; 448: 318-324. doi: 10.1038/nature05944.
46. Masaki H et al. Heterogeneity of pluripotent marker gene expression in colonies generated in human iPS cell induction culture. *Stem Cell Res*. 2007; 1: 105-115. doi: 10.1016/j.scr.2008.01.001.
47. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007; 448: 313-317. doi: 10.1038/nature05934.

48. Darabi R et al. Functional myogenic engraftment from mouse iPS cells. *Stem Cell Reviews*. 2011; 7: 948-957. doi: 10.1007/s12015-011-9258-2.
49. Darabi R et al. Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore dystrophin and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 2012; 10: 610-619. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.015.
50. Awaya T et al. Selective development of myogenic mesenchymal cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2012; 7: e51638. doi: 10.1371/journal.pone.0051638.
51. Filareto A et al. An ex vivo gene therapy approach to treat muscular dystrophy using inducible pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2013; 4: 1549. doi: 10.1038/ncomms2550.
52. Tedesco FS et al. Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Sci Transl Med*. 2012; 4: 140ra189. doi: 10.1126/scitranslmed.3003541.
53. Li HL et al. Precise correction of the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*. 2015; 4: 143-154. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.10.013.