



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Caracterización de ratones mutantes condicionales Myf5 Cre +/- / Pitx2 LoxP - LoxP

Alumno: Álvaro López Peñuela

Jaén, Julio de 2017

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Miogénesis: formación y mantenimiento del músculo esquelético	2
2.2. Miogénesis embrionaria	3
2.2.1. <i>Somitogénesis</i>	3
2.2.1.1. <i>Factores de transcripción “Paired-Homeobox” Pax3 y Pax7</i>	6
2.2.1.2. <i>Factores reguladores de la miogénesis embrionaria</i>	7
2.3. Miogénesis adulta y regeneración muscular	8
2.3.1. <i>Células satélite</i>	8
2.3.2. <i>Origen de las células satélite</i>	10
2.4. Pitx2 en la miogénesis	10
2.4.1. <i>Estructura genómica</i>	11
2.4.2. <i>Pitx2c en el tejido muscular esquelético</i>	12
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Obtención de los ratones mutantes condicionales	15
4.1.1. <i>Descripción de los ratones Control B195AP-Cre (Myf5 Cre^{+/-})</i>	15
4.1.2. <i>Descripción de los ratones Salvaje C57B6/J (Pitx2 LoxP-LoxP)</i>	15
4.2. Sistema de recombinación Cre-LoxP	15
4.2.1. <i>Obtención de los ratones Heterocigoto (Myf5 Cre^{+/-}; Pitx2 LoxP-wt)</i>	16
4.2.2. <i>Obtención de los ratones Nulo (Myf5 Cre^{+/-}; Pitx2 LoxP-LoxP)</i>	17
4.3. Determinación de genotipos	18
4.3.1. <i>Extracción de ADN</i>	19
4.3.2. <i>Identificación de ratones por Electroforesis en gel de Agarosa.</i>	19
4.3.2.1. <i>Identificación de los ratones Myf5Cre</i>	19
4.3.2.2. <i>Identificación de los ratones Pitx2LoxP</i>	20
4.4. PCR a tiempo real (qRT-PCR)	22
4.4.1. <i>Extracción de ARN total</i>	22
4.4.1.1. <i>Tratamiento con DNAsas</i>	23
4.4.2. <i>Cuantificación y cualificación de ARN</i>	24
4.4.3. <i>Cuantificación de ARN en qRT-PCR</i>	25

4.4.3.1. <i>Retrotranscripción</i>	25
4.4.3.2. <i>PCR cuantitativa en tiempo real</i>	26
4.5. Inmunohistoquímica	27
4.5.1. <i>Obtención de cortes transversales</i>	27
4.5.2. <i>Realización de inmunohistoquímica</i>	28
5. RESULTADOS	30
5.1. Determinación y elección de genotipos de ratón	30
5.2. Caracterización de la supervivencia en estadio adulto	32
5.3. Caracterización molecular de los mutantes condicionales de Pitx2 en estadio adulto	33
5.4. Cuantificación del número de células satélite	35
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIÓN	39
9. BIBLIOGRAFÍA	40

1. RESUMEN

La génesis del músculo esquelético durante el desarrollo embrionario y la vida postnatal es un proceso controlado por una red reguladora extremadamente elaborada que combina la interacción de agentes extrínsecos (por ejemplo, morfógenos, eje neurohormonal, daño muscular, etc.) y elementos intrínsecos (elementos reguladores de genes). Los elementos intrínsecos forman interacciones jerárquicas entre reguladores transcripcionales, ARN reguladores y factores de remodelado de la cromatina. En este sentido, durante la embriogénesis, los progenitores musculares se especifican mediante la expresión secuencial de una red de factores de transcripción compuestos de *Pax3* Y *Pax7*, y los factores reguladores miogénicos (MRFs) *MyoD*, *Myf5*, *Myf6* (también denominado *MRF4*) y *Myogenina*. Durante las dos últimas décadas el factor de transcripción “homeobox” *Pitx2* ha surgido como un elemento clave dentro de los elaborados mecanismos que regulan el desarrollo del músculo esquelético. En este trabajo hemos usado los mutantes condicionales para dilucidar la función de *Pitx2* en la especificación vs. determinación durante la miogénesis del tronco y de las extremidades.

Summary

The genesis of skeletal muscle during embryonic development and postnatal life is a process controlled by an extremely elaborate regulatory network that combines the interplay of extrinsic (e.g., morphogens, neurohormonal input, muscle damage, etc.) and intrinsic elements (gene regulatory elements). The intrinsic elements form hierarchical interactions between transcriptional regulators, regulatory RNAs, and chromatin-remodeling factors. In this sense, during embryogenesis, muscle progenitors are specified by the sequential expression of a network of transcription factors composed of *Pax3* and *Pax7*, and the basic helix-loop-helix (bHLH) myogenic regulatory factors (MRFs) *MyoD*, *Myf5*, *Myf6* (also called *MRF4*), and *Myogenin*. During the last two decades the homeobox transcription factor *Pitx2* has emerged as a key element in the finetuning mechanism that regulates skeletal-muscle development. In the present work we have used the conditional mutant mice *Myf5Cre^{+/-}/Pitx2 LoxP-LoxP* to elucidate the function of *Pitx2* in specification vs. determination during trunk and limb myogenesis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Miogénesis: formación y mantenimiento del músculo esquelético

El músculo esquelético es un tejido de gran complejidad y heterogéneo el cual presenta capacidad regenerativa. El proceso de generación muscular (miogénesis) comienza originalmente en el embrión y es rememorado en el músculo esquelético maduro para su mantenimiento y reparación.

Durante la miogénesis embrionaria, las estructuras derivadas del mesodermo generan las primeras fibras musculares del cuerpo, y posteriormente otras fibras adicionales son generadas a lo largo de estas primeras fibras (Parker et al., 2003). En la fase perinatal que es poco conocida, los precursores miogénicos presentes en el músculo inicialmente proliferan extensivamente, y posteriormente con la disminución de los mionúcleos se alcanza un estado estacionario y también se alcanza un pico en la síntesis de miofibrillas proteicas (Schultz, 1996).

En el tejido muscular sus progenitores entran en quiescencia y residen bajo la lámina basal como células satélite. El músculo esquelético depende de un mecanismo que compensa la proliferación/diferenciación de las células terminalmente diferenciadas para el mantenimiento de la homeostasis del tejido (Schmalbruch and Lewis, 2000). Este tipo de miogénesis depende de la activación de las células satélite que tienen el potencial para diferenciarse en nuevas fibras musculares (Charge and Rudnicki 2004). La forma estudiada más comprensible de miogénesis toma lugar en donde el músculo esquelético es dañado y la multitud de células satélite se expanden mitóticamente y se diferencian para reparar el tejido y restablecer la homeostasis (Rudnicki et al., 2004).

Muchas similitudes, como factores de transcripción comunes y señalización de moléculas, entre la miogénesis embrionaria y la regeneración del músculo esquelético han sido descubiertas en diferentes estudios (Tajbakhsh, 2009). Como el carácter pluripotente de las células fundadoras embrionarias está retenido en las células satélite, su investigación es de gran importancia para la aplicación de su potencialidad en otras ramas o finalidades.

2.2. Miogénesis embrionaria

2.2.1. Somitogénesis

La posición e identidad de las células que formarán las tres capas germinales están determinadas tempranamente en la gestación (Arnold and Robenson, 2009). El embrión desarrolla dichas capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. El mesodermo está anatómicamente dividido en mesodermo paraxial, mesodermo intermedio y mesodermo lateral, con respecto a la posición de la línea media. En el transcurso del desarrollo, las variaciones locales de la expresión génica y gradientes de morfógenos inducen a condensaciones en parejas del mesodermo paraxial formando los somitos, los cuales se desarrolla progresivamente de la cabeza a la cola (Aulehla and Pourquie, 2006). Después de que las células abandonen la región caudal, la expresión cíclica de los genes se detiene, y se incrementa los niveles de ácido retinoico estableciendo polaridad en el somito, el cual a continuación desarrolla unos compartimentos dorso-ventrales bien definidos (Figura 1) (Takahashi, 2001; Parker et al., 2003).

La parte más ventral forma el esclerotoma mesenquimal, el cual contiene los precursores de cartílagos y huesos, mientras que la parte más dorsal del somito se mantiene epitelial y se convierte en dermomiótomo. Los músculos esqueléticos del cuerpo, a excepción de algunos músculos de la cabeza, son derivados de las células de esta última estructura.

Las células del dermomiótomo están marcadas por la expresión de los factores de transcripción "Paired-box" *Pax3* y *Pax7* y también están marcadas en menor medida por la expresión del factor de transcripción *Myf5* "helix-loop-helix". (Jostes et al., 1990; Goulding et al., 1991; Kiefer and Hauschka, 2001).

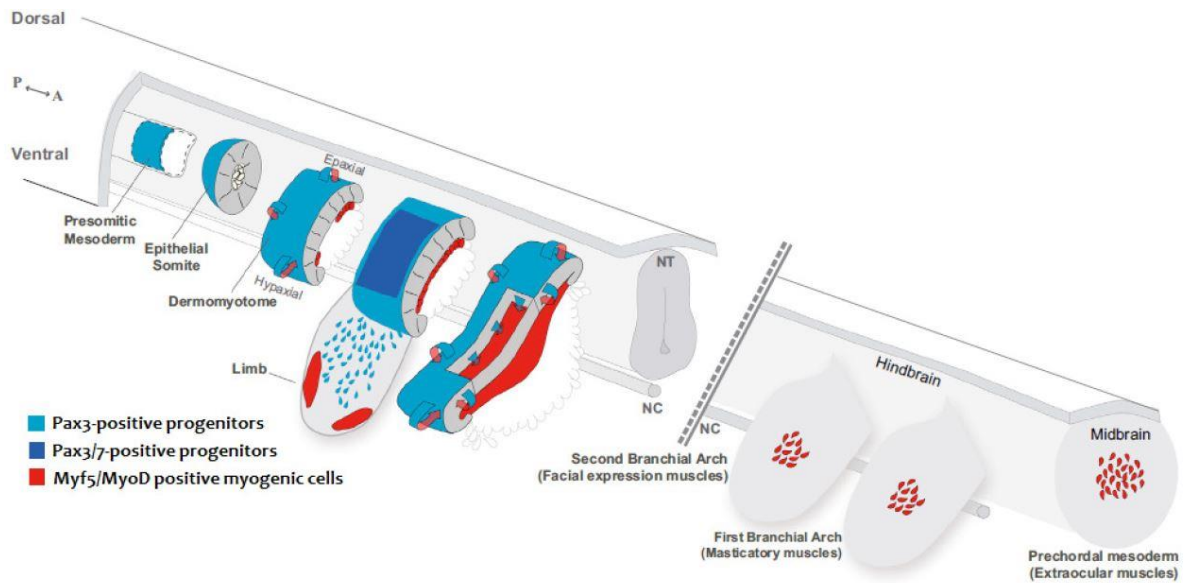


Figura 1: Representación esquemática de los somitos, primer y segundo arco branquial y mesodermo precordial que son el origen del músculo esquelético. Tomada de M. Buckingham, *Cell Development Review*, 2013.

Los labios del dermomiótomo madurarán en hacia miótomo, una estructura muscular primitiva que contienen células musculares que expresan altos niveles de *MyoD*, otro miembro básico de los factores de transcripción “helix-loop-helix”, y *Myf5* (Sassoon et al. 1989; Cinnamon et al. 2001; Kiefer and Hauschka 2001; Ordahl et al. 2001). *MyoD* y *Myf5* son considerados como los marcadores de especificación terminal de la línea muscular (Pownall et al., 2002). En la mayor parte de los músculos progenitores, *MyoD* funciona aguas abajo desde *Pax3* y *Pax7* en la jerarquía genética de reguladores miogénicos (Figura 2), mientras que *Myf5*, dependiendo del contexto, puede también actuar en paralelo con los factores de transcripción Pax (Bryson-Richardson and Currie 2008; Punch et al. 2009; Bismuth and Relaix 2010).

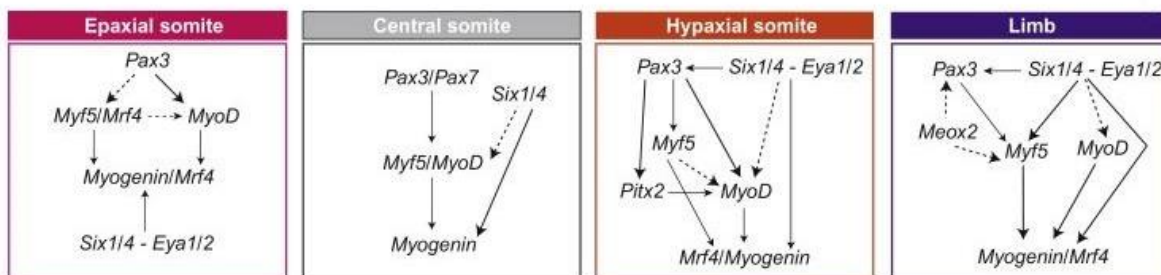


Figura 2: Regulación genética de la miogénesis en el tronco y los miembros. Diferentes jerarquías genéticas regulan el inicio de la miogénesis en los dominios epiaxial, central o hipoaxial del somito o miembro. Las flechas indican la regulación genética establecida, mientras que las flechas punteadas indican interacciones o regulaciones sugeridas en una breve ventana de tiempo. Figura tomada de Buckingham y Mayeuf, 2012.

Mientras que el embrión se desarrolla, la parte central del dermomiótomo se desintegra, y los progenitores musculares se intercalan en el miótomo primario (Ben-Yair and Kalcheim 2005; Gros et al. 2005; Manceau et al. 2008). Esta población de progenitores da lugar a una fracción de las células satélite que residen en el músculo esquelético postnatal (Gros et al., 2005; Kassir-Duchossoy et al. 2005; Relaix et al. 2005; Schienda et al. 2006). Los músculos dorsales son generados desde la parte epiaxial del dermomiótomo y miótomo, mientras que los músculos del tronco lateral y extremidades son derivados desde el dominio hipoaxial (Parker et al., 2003). Los músculos hipoaxiales del cuerpo son generados por una elongación ventral del dermomiótomo y miótomo (Figura 3) (Cinamon et al., 1999). Los músculos de las extremidades y el diafragma son derivados de las células miogénicas con una capacidad migratoria extensa, los cuales delaminan del labio ventrolateral del dermomiótomo al nivel de las extremidades (Vasyutina and Birchmeier, 2006).

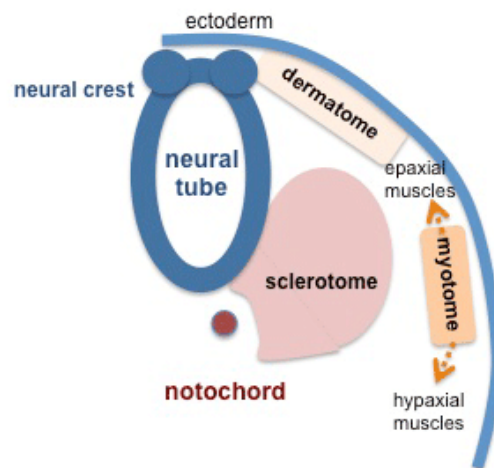


Figura 3: Representación del destino celular del miótomo, formando los músculos epiaxiales hacia la parte dorsal del miótomo, y los músculos hipoaxiales hacia la parte ventral del miótomo. Figura tomada de Embriology, 2017.

Los músculos de la cabeza son creados por células en el mesodermo precordial y mesodermo faringeal de la cabeza. La generación de estos grupos de músculos está controlada diferencialmente desde el tronco y extremidades y ha sido extensamente discutido en otras partes (Shih et al., 2008).

Las células comprometidas en el somito son altamente dependientes de los factores extrínsecos. Las células epiteliales en el somito nuevamente formado tiene el potencial de adoptar un destino esclerotomal o dermomiotal. Según experimentos de trasplantes clásicos de somitos inmaduros, los cuales fueron injertados con una rotación de 180°, revelaron que los patrones de destino celular en el esclerotomo y dermomiotal no fueron alterados (Aoyama and Asamoto, 1988), sugiriendo así la existencia de gradiente de morfógenos que controlan el desarrollo de estas estructuras.

2.2.1.1. Factores de transcripción "Paired-Homeobox" *Pax3* y *Pax7*

La jerarquía genética utiliza los factores de transcripción "Paired-Homeobox" *Pax3* y *Pax7* controlar la miogénesis embrionaria. Las células del dermomiotal de ratón expresan tanto *Pax3* como *Pax7*, con altos niveles de *Pax7* en el dominio central y una expresión preferente de *Pax3* en los labios dorsales y ventrales (Kassar-Duchossoy et al., 2005). Sin embargo, solo *Pax3* es expresado en las células migratorias de largo alcance, las cuales forman la musculatura inicial de la extremidad. Embriones de ratón homocigóticos mutantes por pérdida de función de *Pax3* no desarrollan el dominio hipoaxial del somito y por consiguiente no desarrolla la extremidad o los músculos del diafragma, aunque los músculos derivados del dominio epiaxial son menos afectados (Bober et al., 1994; Daston et al., 1996; Tremblay et al., 1998).

Por otro lado, *Pax7* parece ser dispensable para el desarrollo embrionario muscular (Seale et al., 2000). Sugiriendo que *Pax3* y *Pax7* son capaces de al menos compensarse parcialmente durante la miogénesis embrionaria, la formación del músculo es más deficiente en los embriones doble *knockout* de *Pax3-Pax7* cuando se compara con los mutantes sólo *Splotch*, y solamente el miotomo temprano se desarrolla (Relaix et al., 2005). Además, cuando *Pax7* es llamado en el locus de *Pax3*, la mayoría de las funciones de *Pax3* son restauradas (Relaix et al., 2004).

Hutcheson y colaboradores vieron en 2009 que la pérdida del linaje *Pax3* es letal en el embrión y previene la aparición de células *Pax7* positivas, mientras que la pérdida de células que expresen *Pax7* sólo conlleva a defectos en los estadios tardíos del

desarrollo, causando músculos de un tamaño menor y con menos miofibrillas en las extremidades del nacimiento (Seale et al., 2000). Todo ello lleva a la hipótesis de que las células positivas para *Pax3* son las células fundadoras que forman una determinada plantilla de fibras iniciales en las extremidades, en donde las células *Pax7* positivas contribuyen posteriormente a la formación de fibras secundarias y al establecimiento de un reservorio de células en el músculo adulto (Maqbool and Jagla, 2007).

2.2.1.2. Factores reguladores de la miogénesis embrionaria

Primeros estudios de hibridación usando librerías de ADNc de mioblastos en 1987 identificaron al factor MyoD (“basic helix-loop-helix”) (Davis et al., 1987). Después, se descubrieron otros 3 tipos de factores miogénicos “basic helix-loop-helix”, los cuales son Myf5, miogenina y MRF4, capaces de transformar mioblastos en células musculares. Los genes *MyoD*, *Myf5*, *miogenina* y *MRF4* son conjuntamente expresados en el linaje del músculo esquelético y se les denominan desde su descubrimiento como los Factores Reguladores Miogénicos (MRFs) (Rudniki and Jaenisch, 1995).

Myf5 es el primer MRF expresado durante el desarrollo embrionario, siendo sobreexpresado de manera transitoria en el mesodermo paraxial y más tarde en conjunto con el resto de MRFs durante la formación del miotomo (Ott et al., 1991, Buckingham, 1992).

Los factores *Myf5* y *MyoD* actúan principalmente en la miogénesis temprana. Ambos están implicados en la determinación celular hacia el linaje muscular esquelético y en la regulación del balance entre la proliferación y la diferenciación en los mioblastos. Además, numerosos análisis de los transcritos revelaron que *MyoD* regula directamente múltiples pasos del proceso de miogénesis (determinación, ciclo celular, salida del ciclo celular, ...) (Chanoine et al., 2004).

Los factores de transcripción *Miogenina* y *MRF4* actúan principalmente en la miogénesis tardía, expresándose por tanto más tarde que *MyoD* y *Myf5*. *Miogenina* y *MRF4* están implicados en el mantenimiento del linaje miogénico y en el control de la fase inicial de la diferenciación en los miotubos mediante la activación de los genes específicos del músculo esquelético. En los ratones nulos *Miogenina*^{-/-} los

mioblastos se forman pero no se unen para formar los miotubos. Esto sugiere que este gen es requerido para el paso que se da en la fusión de los mioblastos a miotubos durante la miogénesis. No obstante, la sobreexpresión de *MRF4* en los ratones *Miogenina*^{-/-} propicia la fusión de los miotubos y el desarrollo de la musculatura completamente diferenciada, indicando el papel redundante entre ambos factores de transcripción (Sumariwalla and Klein, 2001).

2.3. Miogénesis adulta y regeneración muscular

A diferencia de la formación del músculo en el embrión, la regeneración muscular en los vertebrados superiores depende del tejido lesionado y de la presencia del andamiaje de la matriz extracelular, la cual sirve como molde para la formación de fibras musculares (Ciciliot and Schiaffino, 2010). La regeneración muscular requiere de la intervención de progenitores indiferenciados hacia el sitio dañado. En el músculo esquelético maduro, dicha función lo realizan las denominadas células satélite (Rudnicki et al. 2008).

2.3.1. Células satélite

Las células satélite son células madre específicas del músculo esquelético que residen entre la lámina basal y sarcolema de las fibras musculares (Figura 4) (Mauro, 1961; Sacco et al., 2008). Sus funciones críticas de crecimiento, mantenimiento y reparación del músculo esquelético están bien establecidos (Zammit et al., 2006). La transplatación de una fibra muscular, con la presencia de células satélite intacta, es suficiente no sólo para mantener una regeneración significativa en el miembro muscular hospedador, sino también para la reposición del nicho de células satélite (Collins et al., 2005).

Un nicho de células madre es un compartimento de un órgano que presenta auto-renovación de células madre mientras que previene sus formas diferenciadas (Scadden, 2006). El microambiente del nicho también ordena el compromiso de las células madre en los respectivos linajes celulares específicos de órganos.

La eliminación de las células madre somáticas de su nicho está por consiguiente acompañado por una pérdida de las propiedades de células pluripotentes a través

del tiempo. En su nicho, estas células satélite se disponen muy cerca de la miofibra y están cubiertas por matriz extracelular de la membrana basal (Mauro, 1961).

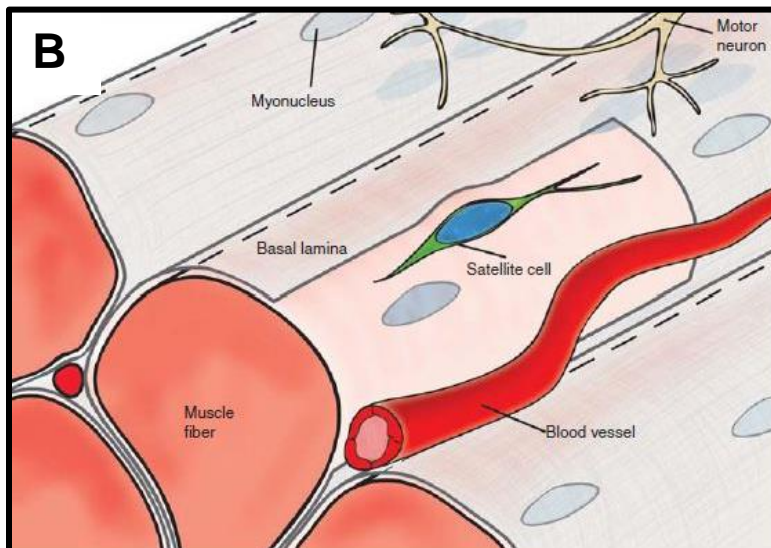
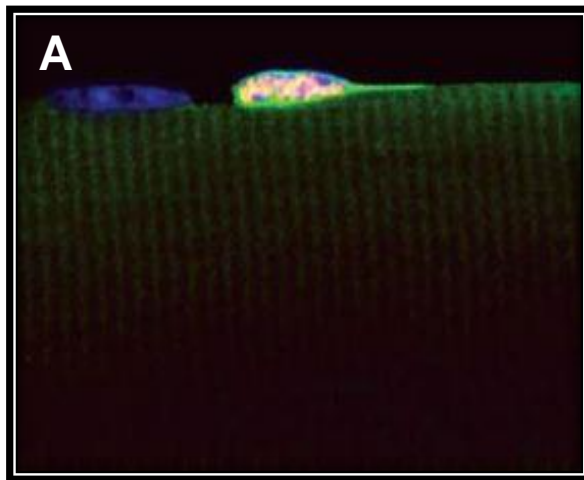


Figura 4: Esquema de tejido muscular y nicho de células satélite. A): Las células satélites residen a lo largo de la fibra del músculo huésped y están marcadas por la expresión de Pax7 (rojo); Núcleos (azul); Citoplasma (verde). B): Representación de tejido muscular esquelético y célula satélite. Las señales moleculares dentro del nicho gobiernan la respuesta de comportamiento de las células satélite en el mantenimiento de la quiescencia o la activación durante la lesión. Dibujo y fotografía tomada de Bentzinger, Wang y Rudnicki (2012).

Además, están situados muy próximos a los capilares, los cuales aportan a ellos los componentes esenciales (Christov et al., 2007). Si las células satélite adultas no están activadas por daño muscular o por otro estímulo, el nicho permite que éstas se mantengan quiescentes, en un estado no proliferativo, lo cual es muy importante para el mantenimiento a largo plazo (Shea et al. 2010).

El músculo esquelético tiene una importante capacidad regenerativa, e incluso sufriendo múltiples procesos de daño el grupo de células satélite se mantiene en tamaño constante. Esto sugiere la existencia de una reposición en la población de estas células o bien un proceso de auto-renovación en dichas células satélite. La auto-renovación requiere bien de una diferenciación estocástica o bien una división

asimétrica. En la diferenciación estocástica, una célula madre se divide para dar lugar a dos células hijas comprometidas, mientras que otra célula madre da lugar a dos células madre hijas idénticas para mantener el nicho progenitor. Por el contrario, las divisiones asimétricas dan lugar a una célula paterna que es idéntica a la célula madre y a una célula hija comprometida (Shinin et al. 2006; Conboy et al. 2007).

2.3.2. Origen de las células satélite

Varios estudios han demostrado por medios directos o indirectos que las células satélites adultas se originan por células multipotentes de los somitos. Cuando la muerte celular mediada por la toxina Difteria es inducida en células que expresan *Pax3* y *Pax7* en el desarrollo del somito de ratón, no se encontraron progenitores musculares en las extremidades (Hutcheson et al., 2009). Experimentos de seguimiento de linajes demostraron que el origen de las células satélite se encuentra en las células que expresan *Pax3* y *Pax7* dentro del dermomiótomo (Hutcheson et al., 2009; Lepper and fan, 2010). Sin embargo, cuando las células satélite de músculo adulto que expresan *Pax7* son suprimidas por la toxina Difteria, ningún otro tipo de célula aparece para reponer el grupo de células satélites o reparar el tejido después de la lesión (Lepper et al., 2011). Ello demuestra que las células satélite que expresan *Pax7* son los principales o únicos mediadores para la regeneración de las miofibras en adulto. Todas las células satélite, sin importar su origen, expresan *Pax7*, y en algunos músculos también expresan *Pax3* a lo largo de la vida del organismo (Kuang and Rudnicki, 2008). Ratones knockout para *Pax7* presentan una pérdida de células satélite, manifestándose después de su nacimiento (Seale et al., 2000). *Pax7* es requerido hasta la tercera semana después del nacimiento, una fase de intensa proliferación de precursores miogénicos en la posición de las células satélite, aunque su función tras dicho temprano crecimiento queda aún por conocer (Lepper et al., 2009).

2.4. Pitx2 en la miogénesis

El gen *Pitx2* ("Pituitary homeobox gene 2") codifica una proteína la cual pertenece a la familia de factores de transcripción tipo *bicoid*, conteniendo una secuencia denominada Homeodominio que permite su interacción con el ADN para poder llevar a cabo su función (Gage and Camper, 1997).

Pitx2 es expresado en gran cantidad en tejidos durante el desarrollo, incluyendo la placa lateral derecha del mesodermo, derivados del primer arco branquial, el ojo, el cerebro, la glándula pituitaria, mandíbula, corazón, extremidades y músculo (Martínez Fernández et al., 2006).

Como factor de transcripción, Pitx2 se une a lugares de unión consenso y no consenso para factores de transcripción de tipo *bicoid*, activando o reprimiendo la transcripción de estos genes diana para llevar a cabo funciones celulares específicas.

Los ratones deficientes de Pitx2 se caracterizan por fallos en el cierre de las paredes corporales, defectos oculares, isomerismo pulmonar derecho, defectos cardíacos, en dientes y en el desarrollo de la pituitaria (Martínez Fernández et al., 2006).

2.4.1. Estructura genómica

En ratón, el gen *Pitx2* está localizado en el cromosoma 3 (3G3; 3 57.84 cM) (Gage and Camper, 1997) y está transcrito en tres isoformas distintas: *Pitx2a*, *Pitx2b* y *Pitx2c*. *Pitx2a* y *Pitx2b* comparten el mismo promotor mientras que *Pitx2c* utiliza una alternativa “aguas arriba” del exón 4 (Schweickert et al., 2000). En humanos, *Pitx2* se localiza en el cromosoma 4 (4q25) y presenta una estructura genética similar al del ratón, pero además presenta una cuarta isoforma (*Pitx2d*). Dicha isoforma es generada por el promotor alternativo de *Pitx2c* y por un empalme diferencial, siendo capaz de suprimir la actividad transcripcional de las otras isoformas de *Pitx2* (Cox et al., 2002). Todas las isoformas comparten homeodominio de unión al ADN 50K, el cual se une con la secuencia de consenso TAATCC (Figura 5) (Chaney et al., 2005).

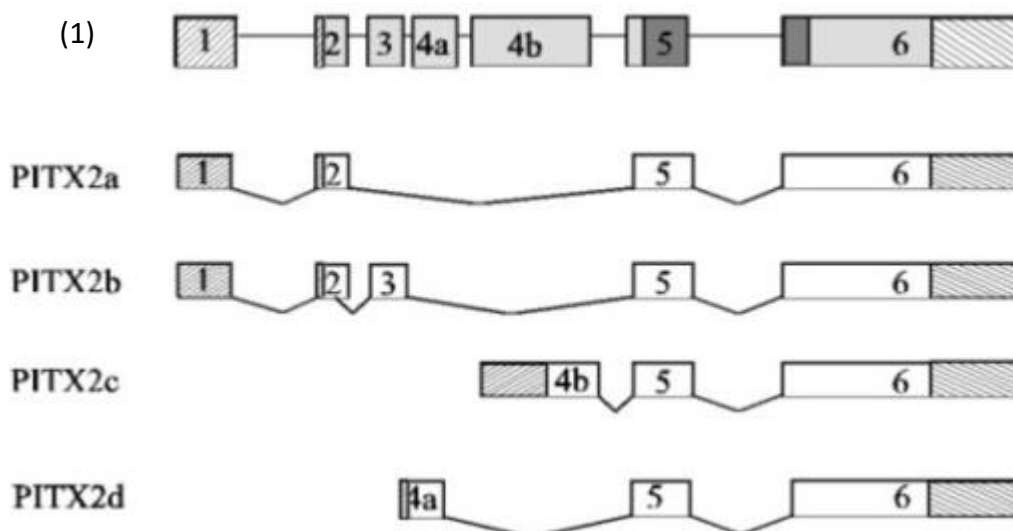


Figura 5: Diagrama esquemático de las isoformas de *Pitx2* a, b, c y d. La organización genómica de este gen se describe en la parte superior (1). Los exones están numerados, y las UTR's 5' y 3' de los posibles diferentes transcritos están indicados en las cajas rayadas. El homeodominio están indicados de color gris o scuro. Imagen obtenida de Muncke et al., 2005.

Aunque la mayor parte de las investigaciones se centraban en el rol de este gen en el desarrollo de las estructuras cerebrales, los autores señalan la expresión de *Pitx2* en la mesénquima ocular, en el primer y segundo arco branquial y las extremidades anteriores y posteriores, así como en el dermomiótomo en el estadio de los somitos E8,5 y E10,5 en ratón, siendo esto último similar en pollo. Poco después, una función de *Pitx2* también fue descrita en la asimetría izquierda-derecha, siendo propuesto como el transductor molecular de la señalización embrionaria izquierda-derecha durante las primeras etapas del desarrollo a nivel de órganos como el corazón, el intestino y/o el estómago (Yoshioka et al., 1998, Campione et al., 1999).

2.4.2. *Pitx2c* en el tejido muscular esquelético

Pitx2c ha sido detectado en mioblastos del brote de las extremidades durante la miogénesis de embriones de ratón, los cuales también expresan *Pax3* y *MyoD*, sugiriendo que *Pitx2* juega un papel importante durante los procesos de diferenciación de la musculatura esquelética (Lozano-Velasco, 2011).

El gen *Pitx2c* se ha mostrado previamente como aquel que es expresado durante la miogénesis embrionaria (L'Honoré et al., 2007; Shih et al., 2007b) de diferentes tipos musculares, incluyendo los músculos extraoculares, branquioméricos, tronco y extremidades. Mientras que *Pitx2* regula la transcripción de MRF en los músculos extraoculares y branquioméricos también está implicado en la proliferación y supervivencia de las células precursoras musculares en los músculos branquioméricos (Dong et al., 2006). Durante el desarrollo de la musculatura corporal, *Pitx2* se expresa en las células progenitoras musculares y en células tempranamente diferenciadas, y su expresión disminuye en la diferenciación terminal (L'Honoré et al., 2007). Además, existe una cascada molecular *Pitx2*-miRNAs que controla la proliferación en mioblastos y células satélite. La cascada molecular *Pitx2* - *miR-106b* controla la expresión de *Myf5* en las células satélite aumentando la población celular comprometida a linaje miogénico.

Estudios recientes han propuesto que *Pitx2* puede actuar como un activador del proceso de miogénesis y de cooperar con la vía *Myf5/Myf4* para controlar el proceso de la miogénesis (L'Honoré et al., 2010). *MyoD* forma parte de la red básica de

regulación que rige el proceso de miogénesis de la musculatura esquelética, actuando como determinante esencial del destino celular miogénico. Algunos autores indican que *Pitx2* es requerido para la activación inicial de *MyoD* en los precursores miogénicos mediante la unión directa de *Pitx2* a la región potenciadora de *MyoD*. *Myf5* y *Mrf4* son prescindibles para determinar el destino de las células progenitoras del músculo, sin embargo su inactivación traen como consecuencia una drástica disminución de la expresión de *MyoD* en la extremidad. Por tanto, *Pitx2* y *Myf5* contribuyen de manera paralela en el establecimiento de las vías genéticas de la miogénesis de extremidades (Lozano-Velasco, 2011).

Además, hay que destacar que los ratones mutantes Splotch de la investigación de L'Honoré et al. (2010) mostraron un déficit en la expresión de Pitx2, cuya expresión solamente aparece en el miotomo. Dicho déficit no se observa en las células de la mesénquima, indicando que Pitx2 está "aguas abajo" de Pax3 durante la miogénesis del miotomo. No obstante, y a pesar de dichos trabajos, no todas las células que expresan Pitx2 fueron positivas para Pax3, mientras que en las extremidades precede la expresión de Pitx2 antes que la de Myf5. Por ello, estudios adicionales usando la inactivación condicional de Pitx2 en poblaciones de células miogénicas específicas podría ayudar a aclarar la función de Pitx2 en la miogénesis embrionaria (Francisco Hernández-Torres et al., 2017).

En este trabajo queremos analizar los efectos de la pérdida de función de *Pitx2*. Para ello hemos generado una línea de ratones mutantes que tienen deleccionado el homeodominio *Pitx2* sólo en las células precursoras del tejido muscular esquelético.

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es investigar en profundidad el papel que tiene el factor de transcripción *Pitx2* en la miogénesis embrionaria y adulta, en concreto en los progenitores celulares que ya han adquirido compromiso miogénico (células que expresan *Myf5*) mediante el uso de los mutantes condicionales *Myf5Cre^{+/-} / Pitx2 LoxP-LoxP*.

Los objetivos específicos son:

- a) Caracterizar la supervivencia de los ratones mutantes para *Myf5Cre^{+/-} / Pitx2 LoxP-LoxP*.
- b) Analizar el efecto de la delección del gen *Pitx2* en las cascadas moleculares que conducen a la miogénesis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de los ratones mutantes condicionales

El modelo animal con el que se realizó este trabajo es el ratón “*Mus musculus*”. Para el análisis del papel de *Pitx2* en el desarrollo del músculo esquelético hemos utilizado fundamentalmente dos líneas de ratones: B195AP-Cre (*Myf5 Cre^{+/-}*) y C57B6/J (*Pitx2 LoxP-LoxP*). Los ratones adultos utilizados procedieron del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Jaén. En este trabajo compararemos los siguientes genotipos: *Myf5 Cre^{-/-} / Pitx2 LoxP-LoxP*; *Myf5 Cre^{+/-} / Pitx2 wt-wt*; *Myf5 Cre^{+/-} / Pitx2 LoxP-wt* y *Myf5 Cre^{+/-} / Pitx2 LoxP-LoxP*.

Los ratones estuvieron sometidos a un fotoperiodo día/noche de 12 horas. La temperatura ambiente de las instalaciones se mantuvo entre 20-25°C. Los animales siempre tuvieron a su disposición comida y agua *ad libitum*.

4.1.1. Descripción de los ratones Control B195AP-Cre (*Myf5 Cre^{+/-}*)

La línea *Myf5 Cre^{+/-}* fue obtenida por el Centro Andaluz de Biología de Desarrollo, Sevilla y fue cedida por el investigador Jaime Carvajal. La creación de dicha línea se realizó usando el clon BAC B195APZ, el cual fue modificado por recombinación y transferido a células DY380, en donde fue sustituido el gen *niacZ* por el gen *Cre*.

4.1.2. Descripción de los ratones Salvaje C57B6/J (*Pitx2 LoxP-LoxP*)

Esta cepa fue obtenida mediante ingeniería genética en el Departamento de Genética Humana y Programa de Neurociencia dentro de *University of Michigan Medical School*, y fue cedido por la doctora Mariana Campione de la Universidad de Padua. Para ello partieron de la cepa C57B6/J a la cual le fue flanqueado con dos secuencias *LoxP* el exón 5 del gen *Pitx2* que codifica para el homeodominio.

4.2. Sistema de recombinación Cre-LoxP

Actualmente, los sistemas de knockout condicionales están basados en la recombinación específica de un sitio concreto, y el sistema de recombinación más empleado es el llamado Cre/LoxP (Figura 6, A).

La Cre recombinasa reconoce los denominados sitios LoxP, que son dos secuencias cortas iguales de 34 pb que delimitan el fragmento genético a recombinar.

La estrategia llevada a cabo es doble, por un lado se sitúa al gen de la Cre recombinasa bajo el control de un promotor específico del tejido mediante técnicas de biología molecular, generando así un ratón transgénico. En nuestro caso, el gen que actúa como promotor específico de tejido es Myf5, de manera que el ratón transgénico obtenido será denominado como Myf5Cre (B195-AP).

Por otro lado, se genera una copia exacta del gen a recombinar la cual se encuentra flanqueada por las secuencias LoxP. En nuestro caso, las secuencias LoxP se encuentran flanqueando al exón 5 de Pitx2, responsable de codificar para el homeodominio.

4.2.1. Obtención de los ratones Heterocigoto (Myf5 Cre^{+/-}; Pitx2 LoxP-wt)

Al cruzar las dos líneas de ratones transgénicos (Myf5 Cre^{+/-} ; Pitx2 LoxP-LoxP), obtenemos un doble transgénico que lleva ambas modificaciones en su genoma (figura 6, B). De este modo, en el tejido en el cual se expresa la Cre recombinasa, dicha enzima es capaz de reconocer las secuencias LoxP que flanquean el gen a inhibir, producir la recombinación en dicho tejido, y de esta manera eliminar dicho gen y evitar su expresión.

La obtención de ratones heterocigoto implicaría por tanto que en uno de sus alelos (marcados por las bandas de LoxP) se inhibiría la expresión del exón 5 por parte de Cre. Sin embargo, el otro alelo no marcado por LoxP si presenta expresión del exón 5, por lo que los ratones Heterocigoto son viables para su desarrollo y reproducción.

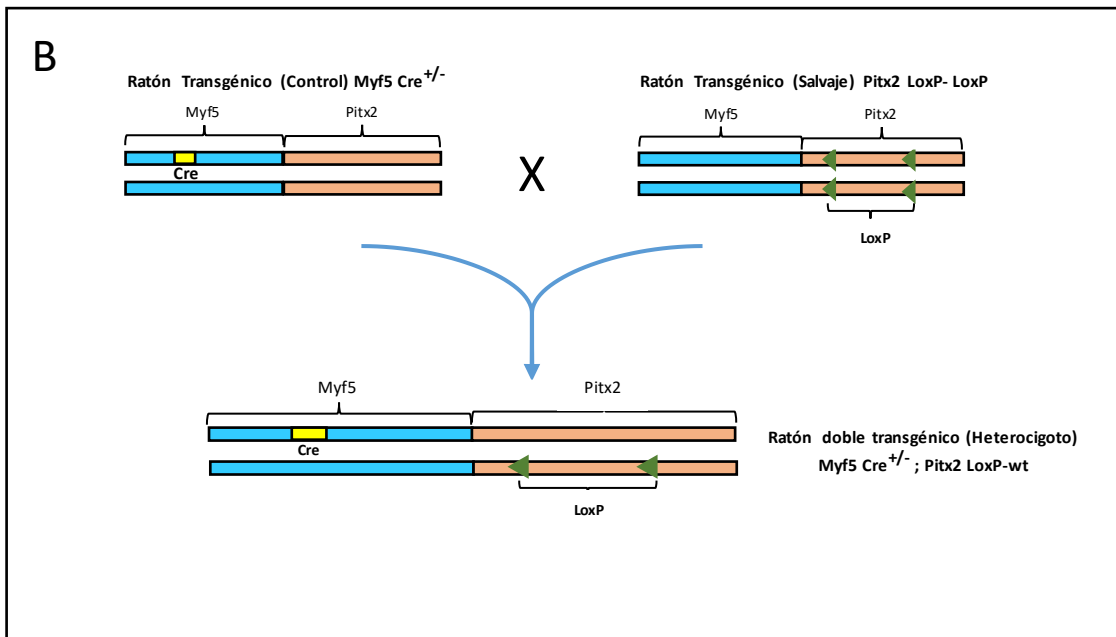
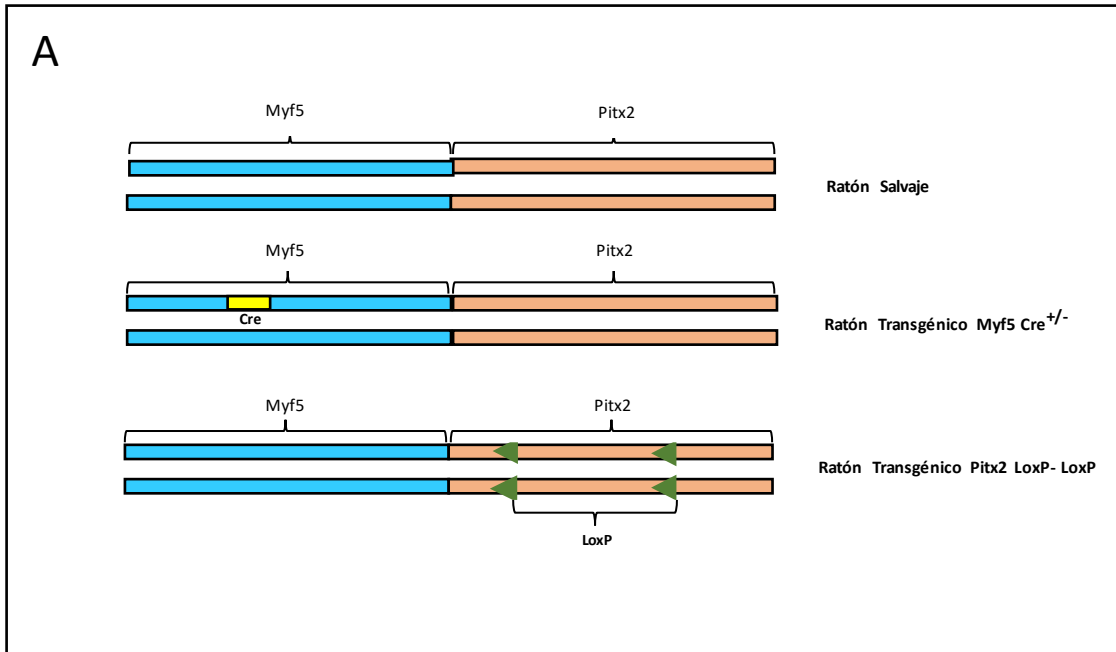


Figura 6: A) Representación gráfica de los alelos utilizados para la obtención de ratones Knock-out condicionales. B) Representación gráfica de la obtención de Heterocigoto a partir de distintas cepas mutantes (Salvaje y Control).

4.2.2. Obtención de los ratones Nulo (Myf5 Cre^{+/-} ; Pitx2 LoxP-LoxP)

Una vez que se han generado y desarrollado los ratones heterocigoto, procederemos al cruce de los mismos con la línea Pitx2 LoxP-LoxP (Figura 7). De

esta manera, se obtendrá ratones tanto con el gen *Cre* como con los dos alelos marcados por las secuencias *LoxP*, de tal manera que la expresión del exón 5 de cada alelo será inhibida por la acción de la enzima *Cre* recombinasa (procedente de *Cre*). Con ello, a esta nueva cepa se la denominará Nulo (*Myf5* *Cre*^{+/-} ; *Pitx2* *LoxP*-*LoxP*).

Por el momento no se han mostrado signos aparentes de variación fenotípica, debido a que los ratones de esta cepa se desarrollan y alcanzan la madurez sin ningún problema.

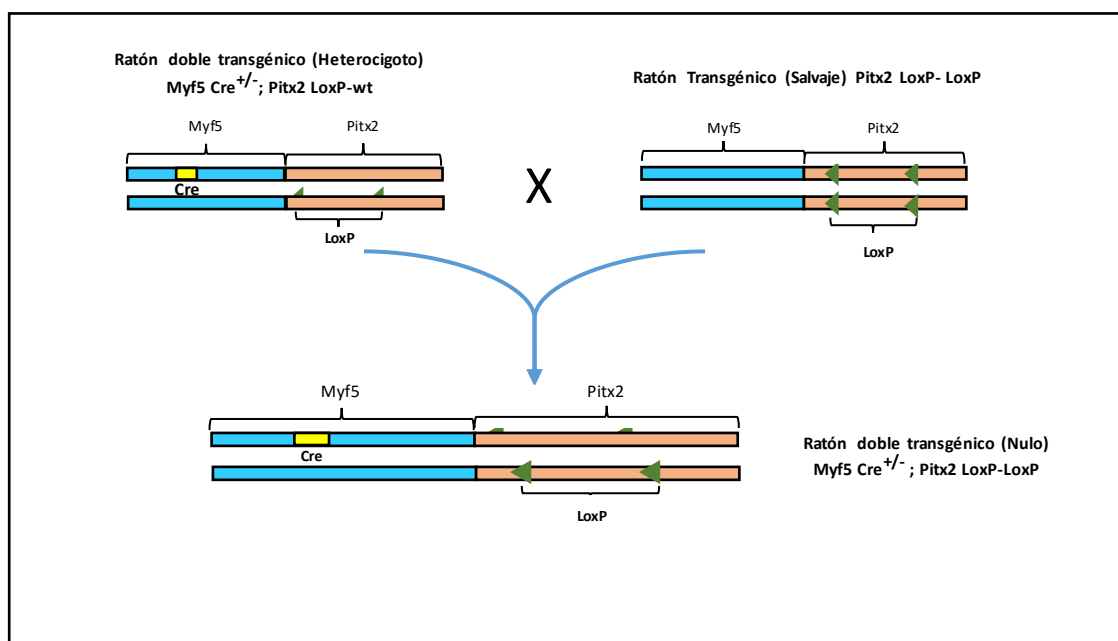


Figura 7: Representación gráfica de la obtención de Nulo a partir de distintas cepas mutantes (Heterocigoto y Salvaje).

4.3. Determinación de genotipos

En este trabajo es importante identificar los genotipos de los ratones que utilizemos en nuestro estudio, bien para saber cuáles de ellos tendremos que cruzar con otros y también para escoger aquellos que nos interesen para continuar con el trabajo.

Para la extracción de ADN genómico se procede a realizar dos pasos: Extracción de ADN e Identificación de ratones por Electroforesis en gel de Agarosa

4.3.1. Extracción de ADN

- 1) Se incuba el tejido del ratón (sección de oreja) durante una noche con una solución compuesta por 495 µl de tampón de Lisis y 5 µl de Proteinasa K.
- 2) Al día siguiente, se realiza vortex al Eppendorf con la muestra.
- 3) Se centrifuga durante 15 minutos a 1400 RPM, a 4°C.
- 4) Después, se extrae 350 µl de sobrenadante (retirando cuidadosamente el ADN con la punta de la micropipeta en las paredes del Eppendorf).
- 5) En un nuevo Eppendorf, se añade la cantidad de ADN extraído y otros 350 µl de Isopropanol frío.
- 6) Se mezcla manualmente mediante volteo.
- 7) Se procede a una centrifugación durante 15 minutos a 1400 RPM, a 4°C.
- 8) Retirar el sobrenadante obtenido (el ADN precipita por centrifugación, por lo que el precipitado contiene el material genético que nos interesa).
- 9) Lavar con 200 µl de Etanol 70°.
- 10) Centrifugar durante 5 minutos a 1400 RPM, a 4°C.
- 11) Eliminar el sobrenadante y se secar el Eppendorf.
- 12) Resuspender el ADN obtenido con 100 µl de agua MilliQ (Agua ultrapura).

4.3.2. Identificación de ratones por Electroforesis en gel de Agarosa.

4.3.2.1. Identificación de los ratones Myf5Cre

Para la hallar la presencia de la recombinasa Cre se ha seguido el protocolo recomendado por la casa comercial SIGMA. Este protocolo se basa en el uso de una pareja de cebadores diferentes, diseñados para detectar el alelo mutado en donde se expresa la Cre recombinasa:

Cebador	Secuencia 5' → 3'
AF-Cre1	CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AGG
AF-Cre2	CCA GAG ACG GAA ATC CAT CGC TCG

Polymerase Chain Reaction

Componentes de la reacción

Dream GreenTaq™	5 µl
Cebador 10 µl	1 µl
H ₂ O	3 µl
ADN	1 µl
Total	10 µl



<u>Etapa</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>
1	94°C	5 minutos
2	94°C	30 minutos
3	59°C	45 minutos
4	72°C	45 minutos
5	72°C	7 minutos
6	4°C	---

} 38 ciclos

Una vez realizada la PCR, el producto del mismo se someterá a una electroforesis en gel de Agarosa al 1,5% (0,75 gr Agarosa, 50ml TAE 0,5x), durante 30 minutos y a 100 Voltios.

En los ratones los cuales expresan la Cre recombinasa, se puede ver una banda de 190pb correspondiente a dicha enzima. En aquellos casos en los que el ratón no presente la Cre recombinasa, no se observa ninguna banda (Figura 8, A).

4.3.2.2. Identificación de los ratones Pitx2LoxP

Para determinar la presencia de las secuencias LoxP delimitando al gen Pitx2 se ha utilizado un protocolo basado en el uso de una sola pareja de cebadores diseñados para diferenciar entre el alelo salvaje y el alelo mutado.

Cebador	Secuencia 5'→ 3'	Tipo de cebador
Pitx2In4_f01	GGT GGG GGT GTC TGT AAA AC	Salvaje
Pitx2In5_f01	CAA GCC TTG CGT GTT TCT G	Mutante

Polymerase Chain Reaction

Componentes de la reacción

Dream GreenTaq™	10 µl
Cebador 10 µl	2 µl
H ₂ O	6 µl
ADN	2 µl
Total	20 µl



<u>Etapa</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>
1	94°C	3 minutos
2	94°C	30 segundos
3	65°C	1 minuto
4	72°C	1 minuto
5	72°C	2 minutos
6	4°C	---

35
ciclos

Posteriormente el producto de la PCR realizada se somete a una electroforesis en gel de Agarosa al 2% (1 gr de Agarosa, 50ml de TAE 0,5x), durante 45 minutos, un poco más que para la detección de Cre, debido a que Pitx2 tiene un peso molecular más grande, y a 100 Voltios.

En el caso de Pitx2, si el ratón es heterocigoto presentará una doble banda en el gel, si es homocigoto para LoxP se observará una única banda de 1065pb, mientras que si se trata de un salvaje aparecerá una sola banda de 997pb (Figura 8, B).

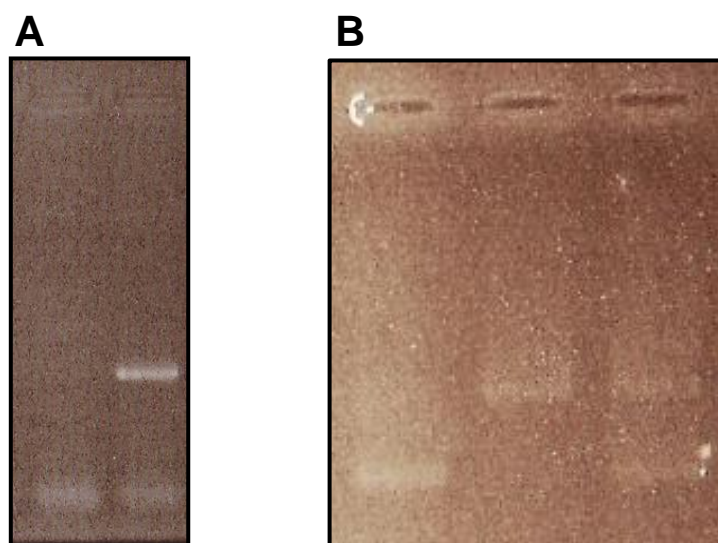


Figura 8: A) banda Izquierda correspondiente a muestra de ratón Sin Cre recombinasa, y banda derecha correspondiente a muestra de ratón con Cre recombinasa. Ambas muestras de ADN fueron corridas en gel de Agarosa 1,5% (30 minutos). B) 3 muestras de ADN de ratón corridas en gel de Agarosa 1,5% (45 minutos). La banda izquierda corresponde a un homocigoto *Pitx2* wild type, la banda central corresponde a ratón homocigoto para *Pitx2* LoxP-LoxP, mientras que la banda derecha corresponde a un heterocigoto *Pitx2* LoxP-

Una vez que finaliza la electroforesis para ambos casos, se procede a revelar los geles. Para ello, se incuban los mismos en una solución de bromuro de etidio diluido durante 25-30 minutos para posteriormente ser fotografiado.

4.4. PCR a tiempo real (qRT-PCR)

Una vez ya identificados los genotipos de cada uno de los ratones utilizados, y de escoger los genotipos que nos interesa para seguir con la experimentación, procederemos a la obtención de los tibiales anteriores de los ratones mutantes condicionales (con previo sacrificio correcto y ético de los ratones).

El uso y manipulación de muestras con ARN implica que se debe de trabajar en condiciones de limpieza y esterilidad óptimas (para evitar la degradación del ARN por las RNAsas), por lo que siempre es necesario limpiar tanto la poyata como los instrumentos a utilizar con lejía y alcohol.

4.4.1. Extracción de ARN total

- 1) Coger la muestra de ratón (tibial, previamente almacenada a -80° C, e introducir en un Eppendorf 2 ml con 2 bolitas de metal (desinfectadas) y 1 ml de Trizol (*Invitrogen*).
- 2) Introducir el Eppendorf en N_2 líquido y realizar disgregación mecánica mediante un homogeneizador de tejido automático TissueLyser (*Roche*).
- 3) Descongelar con las manos antes de introducir en el disgregador (en caso de n° impar, equilibrar con otro relleno de agua y dos bolitas de metal).
- 4) En el disgregador, agitar 3 veces, 30 segundos cada vez (sumergir el Eppendorf en N_2 líquido entre una otra durante apenas 2 segundos).
- 5) Centrifugar el Eppendorf a 10.000 RPM durante 10 minutos a 4° C.

- 6) Tomamos 750 μ l aproximadamente de sobrenadante y lo introducimos en un Eppendorf limpio junto a 750 μ l de Etanol a -95° C.
- 7) En una columna ya preparada (Figura 9), Introducimos 750 μ l de muestra y centrifugamos a 10300 RPM durante 1 minuto a 4° C. Repetimos la acción hasta completar el volumen. Los restos del tubo colector se desechan a un vaso con lejía.

8) Realizar el tratamiento con DNAsas.

- 9) Añadir 400 μ l de Direct-zolTM RNA PreWash en la columna y centrifugar 1 minuto a 10300 RPM, a 4° C. Eliminar el resto del tubo colector y repetir el paso.
- 10) Añadir 700 μ l de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugar 1 minuto a 10300 RPM, a 4° C. Eliminar los restos del tubo colector.
- 11) Volver a centrifugar a 2 minutos a 10300 RPM, a 4° C. Este paso se realiza para secar el filtro.
- 12) Introducir la columna en un tubo colector nuevo y añadir 50 μ l de DNAsa/RNAsa free Water directamente sobre la columna. Centrifugar a máxima potencia (14000 RPM), durante 1 minuto a 4° C.
- 13) Pasar lo obtenido en el tubo colector a un Eppendorf de 0,2 ml para almacenarlo a aproximadamente -80 C.

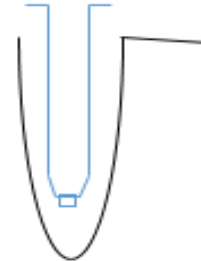


Figura 9: Representación esquemática de una columna colectorora.

4.4.1.1. Tratamiento con DNAsas

Para eliminar la contaminación con ADN genómico se realiza, entre los pasos 7 y 9 de la extracción de ARN, el tratamiento con DNAsa libre de RNAsa que incluye el propio kit comercial dentro de su protocolo. El protocolo es el siguiente:

- a) Lavar con 400 μ l de RNA Wash Buffer y centrifugar a 10000 RPM durante 1 minuto.
- b) Añadir 80 μ l de la mezcla de tratamiento con DNAsas e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- c) Centrifugar durante 30 segundos a 10000 RPM .

La mezcla que se utiliza en el paso b) es la siguiente:

DNAsa I (5U por reacción)	5 μ l
10x DNAsa I Reaction Buffer	8 μ l
DNAsa/RNAsa Free Water	3 μ l
RNA Wash Buffer	64 μ l
Total	80 μ l

4.4.2. Cuantificación y cualificación de ARN

La cuantificación del ARN se realiza para saber si la extracción del ARN se ha realizado de manera correcta y, por tanto, se utiliza para realizar la qRT-PCR. La muestra de ARN en cuestión se mide por espectrofotometría con el equipo Nanodrop, colocando con una cantidad de 2 μ l de la muestra, anotando el valor obtenido en ng/ μ l. También se anotaba la relación 260/280 y 230/260, puesto que si estos datos oscilan entre el 1,8 y 2, quiere decir la pureza de la muestra es correcta y no presenta contaminación.

Como apoyo a la cuantificación se puede también cualificar la muestra de ARN mediante electroforesis y revelado del gel utilizado.

Para ello, buscamos cargar 500 ng de ARN en el gel de Agarosa, y debido a que las concentraciones de los volúmenes de ARN son distintos, los volúmenes a cargar también serán distintos. Así pues, se debe de realizar cálculos para saber cuál volumen utilizar de la muestra con ARN para obtener 500 ng. Una vez sabido, se realiza la mezcla en una tira de Parafilm con los siguientes componentes:

Tampón de carga (Loading Buffer)	3 μ l
Volumen RNA (500ng/μl)	x μ l
H₂O MilliQ	10-(3+x) μ l
Total	10 μ l

La mezcla se carga en un gel de Agarosa libre de RNAsas, compuesto por 0,4 gr de Agarosa y 50ml de TAE 0,5x a 100 Varios durante 25 minutos (es recomendable

limpiar cada pieza para realizar la electroforesis con jabón y agua destilada para eliminar RNAsas).

Posteriormente se procede a revelar el gel incubándolo en Bromuro de Etidio durante 25 minutos aproximadamente y realizando después las correspondientes fotografías (Figura 10).

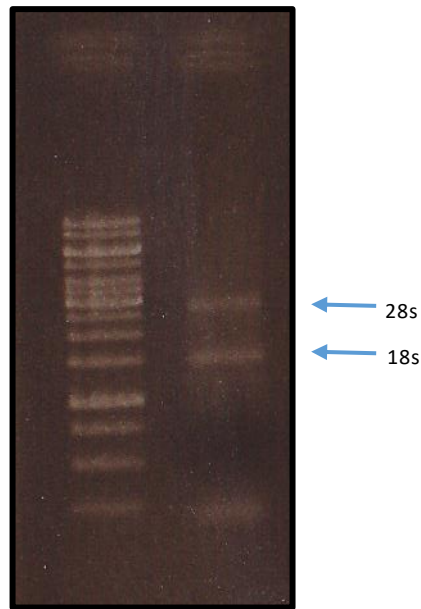


Figura 10: Fotografía obtenida en un gel donde se corrió una muestra de ARN. A la izquierda se observa el marcador molecular, y a la derecha se presenta la muestra de ARN corrida en el gel. Si se ha realizado correctamente la extracción, se observarán dos bandas correspondientes al ARNm ribosómico 28s y 18s.

4.4.3. Cuantificación de ARN en qRT-PCR

4.4.3.1. Retrotranscripción

La retrotranscripción se realiza sobre aquellas muestras que tienen una calidad óptima para trabajar sobre ellas. Dicha retrotranscripción se lleva a cabo siguiendo las instrucciones de la casa comercial *Thermo Scientific* (Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR).

Se debe de calcular el volumen de cada muestra para llevar a cabo la retrotranscripción con 1000 ng de ARN en todas las muestras.

EvaGreen qPCR Master Mix™	5 µl
Cebadores 2,5 µM	1 µl
H₂O MillQ	3 µl
ADNc	1 µl
Total	<u>10 µl</u>



<u>Etapa</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>
1	25°C	10 minutos
2	50°C	15 segundos
3	85°C	5 minuto
4	4°C	---

El control negativo que se realiza presenta todos los componentes citados menos la enzima, la cual es sustituida por 2 µl de agua MillQ. Esto se realiza para asegurarnos luego en la qRT-PCR que no ha habido ninguna contaminación por algunos de estos componentes en el caso de los controles negativos. Los productos de la retrotranscripción se deben de resuspender en 80 µl de agua MillQ hasta ser utilizados de nuevo.

4.4.3.2. PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR en tiempo real se realiza usando la enzima EvaGreen qPCR Master Mix™. Los componentes de la reacción de PCR son los siguientes:

Componentes de la reacción

5x Reaction Mix	4 µl
Enzima	2 µl
Volumen de ARN (1000ng/µl)	x µl
H₂O MillQ	20-(4+2+x) µl
Total	<u>20 µl</u>

El control negativo de la PCR está compuesto por todos los componentes anteriormente nombrados a excepción del ADNc, el cual es sustituido por agua MillQ. Además, los controles negativos de la retrotranscripción eran incluidos como una muestra más, no produciéndose por tanto amplificación de los mismos.

Todas las muestras que se prepararon para este ensayo se encontraban por triplicado, partiendo de la mezcla común con el fin de disminuir el error de pipeteo y obtener una medida representativa de cada muestra. El normalizador usado en este caso es el gen *GusB*. El programa utilizado para la cuantificación de los niveles de expresión de los diferentes genes en este trabajo es el siguiente:

<u>Etapa</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>	
1	95°C	30 segundos	} Repetir 40 ciclos
2	95°C	5 segundos	
3	60°C	10 segundos	
4	80°C	7 segundos	☀ Medida de fluorescencia
5	95°C	1 minuto	
6	65°C	15 segundos	☀ Medida de fluorescencia
7	95°C	15 segundos	

El kit utilizado contiene SYBR Green, un fluoróforo altamente sensible con capacidad para unirse al ADN. Este fluoróforo se dispone entre las moléculas de ADN y tiene la propiedad de emitir fluorescencia únicamente cuando se encuentra unido a una molécula de ADN bicatenario. Así, este compuesto se insertará en la doble cadena del producto de PCR que se formará de manera sucesiva, emitiendo fluorescencia en cada nuevo ciclo de reacción.

4.5. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica utilizada sobre los cortes transversales de los tibiales anteriores de los distintos genotipos de ratón nos permitirá tanto observar como el recuento de aquellas células en donde se halla la expresión de Pax7.

4.5.1. Obtención de cortes transversales

La muestra a manipular, como hemos nombrado ya anteriormente, son los tibiales anteriores de los distintos genotipos de ratón. Se cortan secciones de 15µm de espesor en el Criostato *Leica CM1050* situado en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén. Las muestras cortadas son

traspasadas a portaobjetos (6 cortes por cada portaobjeto), debidamente identificadas según el genotipo que corresponde y fecha, y almacenadas a -20° C hasta ser utilizadas de nuevo.

4.5.2. Realización de inmunohistoquímica

Se realizó la incubación de los cortes con anticuerpo primario frente a *Pax7* y anticuerpo secundario fluorescente Alexa 488 anti-mouse (Tabla 1), para saber si existe o no diferenciación prematura. Para esta técnica se sigue el siguiente protocolo:

Día 1

- 1) Atemperar los portaobjetos a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.
- 2) Lavar los cortes con PBS durante 3 minutos, dos veces cada una.
- 3) Bloquear los cortes con TBSA-BSAT durante 30 minutos – 1 hora a temperatura ambiente.
- 4) Eliminar la mayor parte del bloqueo de los portas (NO SECAR) y marcar con el bolígrafo graso el perímetro alrededor de las secciones.
- 5) Incubar los cortes con el anticuerpo primario diluido en TBSA-BSAT durante toda la noche en cámara húmeda a 4° C

Día 2

- 6) Lavar los cortes con TBSA-BSAT durante 5 minutos, dos veces cada una.
- 7) Incubar con el anticuerpo secundario diluido en TBSA-BSAT 2 horas a temperatura ambiente.
- 8) Lavar con TBSA-BSAT durante 5 minutos, dos veces cada una.
- 9) Lavar con PBS durante 5 minutos, dos veces cada una.
- 10) Para el revelado, incubar con DRAQ5 diluida en PBS 1/2000 durante 15 minutos.
- 11) Enjuagar con PBS durante 5 minutos, dos veces cada una.
- 12) Lavar con agua destilada durante 5 minutos, dos veces cada una.
- 13) Montar con PBS/Glicerol o Hydromount.

<u>Anticuerpo Primario</u>	<u>Referencia</u>	<u>Dilución utilizada</u>
Anti-Pax7	DHB	1:50
<u>Anticuerpo Secundario</u>	<u>Referencia</u>	<u>Dilución utilizada</u>
Alexa 488 anti-mouse IgG	Invitrogen (EEUU)	1:200

Tabla 1: Tipos de anticuerpos utilizados para la Inmunohistoquímica por fluorescencia, con la referencia y dilución utilizada en cada uno.

5. RESULTADOS

5.1. Determinación y elección de genotipos de ratón

El interés en esta parte consiste en seleccionar 4 tipos de genotipos distintos (Myf5 Cre^{-/-}; Pitx2 LoxP-LoxP, Myf5 Cre^{+/-}; Pitx2 wt-wt, Myf5 Cre^{+/-}; Pitx2 LoxP-wt y Myf5 Cre^{+/-}; Pitx2 LoxP-LoxP) para poder realizar los posteriores experimentos en referido al ARN e inmunohistoquímica, por lo tanto debemos de escoger 4 ratones en total, uno por cada genotipo.

Se realizó determinaciones de genotipo en distintas muestras de ratones, cuyos resultados fueron los siguientes:

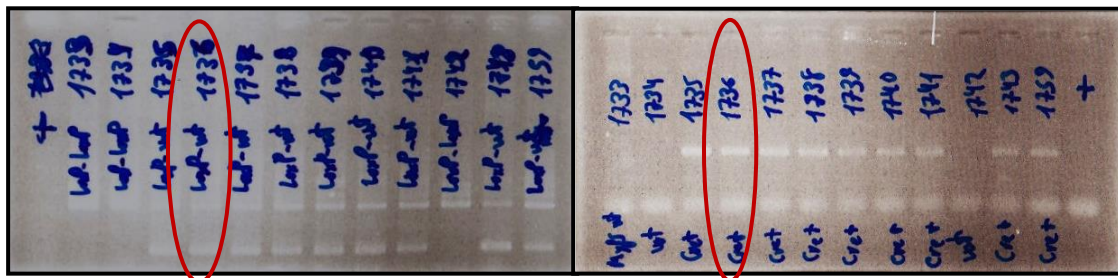


Figura 11: Determinación de genotipos para las muestras 1733,1734, 1735,...,1743 y 1759, mediante electroforesis en gel de Agarosa al 2%. La zona rodeada corresponde a la muestra seleccionada cuyo genotipo es Myf5 Cre^{+/-}; Pitx2 LoxP-wt.

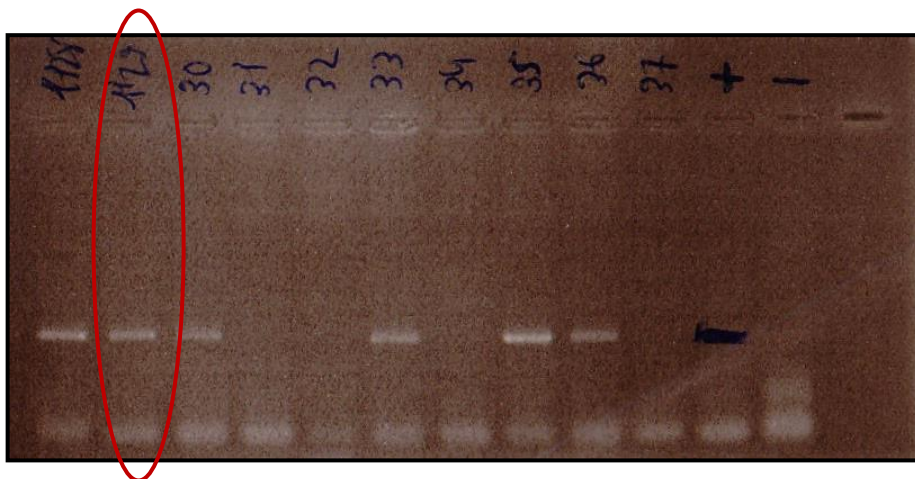


Figura 12: Determinación de genotipos para las muestras 1128, 1129, 1130,..., 1137, positivo y negativo, mediante electroforesis en gel de Agarosa al 2%. La zona rodeada corresponde a la muestra seleccionada cuyo genotipo es Myf5 Cre^{+/-}; Pitx2 wt-wt.

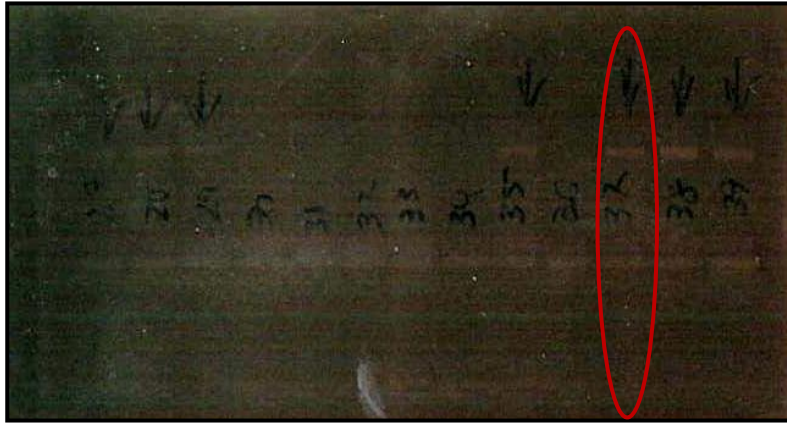


Figura 13: Determinación de genotipos para las muestras 1027, 1028, 1029, 1030,..., 1038 y 1039, mediante electroforesis en gel de Agarosa al 2%. La zona rodeada corresponde a la muestra seleccionada cuyo genotipo es *Myf5* *Cre*^{-/-}; *Pitx2* *LoxP-LoxP*.

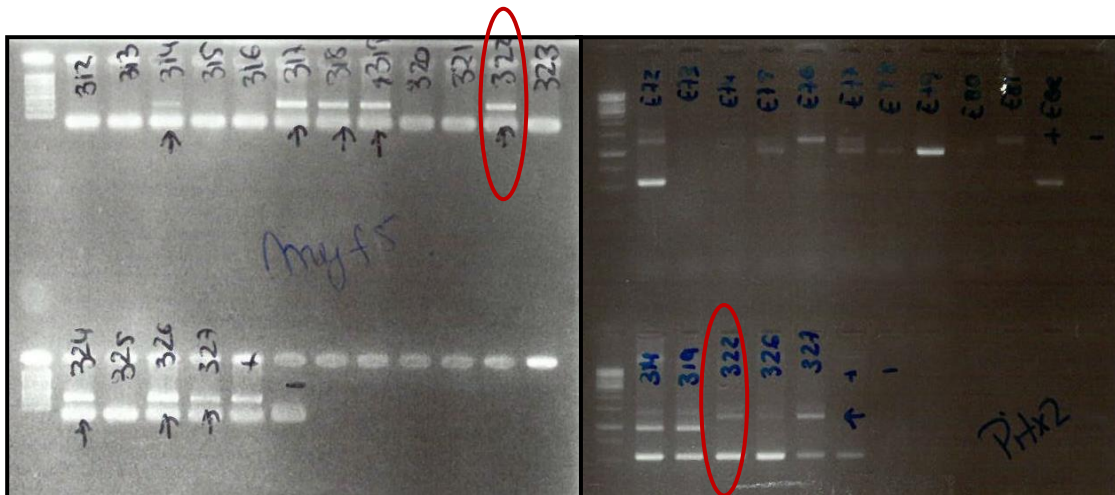


Figura 14: Determinación de genotipos para las muestras 314, 315, 316,.. 326 y 327, mediante electroforesis en gel de Agarosa al 2%. La zona rodeada corresponde a la muestra seleccionada cuyo genotipo es *Myf5* *Cre*^{+/-}; *Pitx2* *LoxP-LoxP*.

Por lo tanto, los siguientes genotipos fueron utilizados de ahora en adelante:

1736: *Myf5* *Cre*^{+/-}; *Pitx2* *LoxP-wt*

1129: *Myf5* *Cre*^{+/-}

1037: *Pitx2* *LoxP-LoxP*

322: *Myf5* *Cre*^{+/-}; *Pitx2* *LoxP-LoxP*

5.2. Caracterización de la supervivencia en estadio adulto

Nuestro primer punto de estudio se basa en la caracterización de la supervivencia de los ratones mutantes condicionales $MyfCre^{+/-}$ y en la comparación de la ratio mendeliana observada *versus* esperada.

Se diseñó la siguiente estrategia para conseguir una línea de ratones condicionales que nos permitiesen conocer los efectos que desembocan de la ausencia de este gen en los precursores musculares. De esta manera, la obtención de los mutantes condicionales se llevó a cabo mediante los siguientes cruces:

$$\text{♂Pitx2 LoxP-LoxP} \times 2 \text{ ♀Myf5Cre}^{+/-} \text{ Pitx2 LoxP-wt}$$

En la Tabla 2 podemos observar el ratio de genotipos obtenidos en las diferentes camadas. Tras este tipo de cruce, la ratio mendeliana esperable es la siguiente: $Pitx2LoxP-Wt$ (1/4), $Pitx2LoxP-LoxP$ (1/4), $MyfCre^{+/-} Pitx2LoxP-Wt$ (1/4) y $MyfCre^{+/-} Pitx2LoxP-LoxP$ (1/4).

		<u>$\frac{Myf5Cre^{+/-}}{Pitx2 LoxP-LoxP}$</u>	<u>$\frac{Myf5Cre^{+/-} Pitx2}{LoxP-Wt}$</u>	<u>$\frac{Pitx2 LoxP-LoxP}{LoxP}$</u>	<u>$\frac{Pitx2 LoxP-Wt}{LoxP-Wt}$</u>	<u>Total</u>
Adultos	1	4/16	4/16	5/16	3/16	16
	2	0/5	3/5	1/5	1/5	5
	3	3/16	2/16	4/16	7/16	16
Total		7/37	9/37	10/37	11/37	37

Tabla 2: Proporción de genotipos obtenidos en las distintas camadas de ratones mutantes condicionales. Las camadas (1,2 y 3) son el resultado de un cruce entre $Myf5Cre^{+/-} / Pitx2 LoxP-Wt$ con $Pitx2 LoxP-LoxP$.

De las 3 camadas de ratones mutantes adultos obtenidas, el genotipo *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-LoxP* representa un 14,58% (7 individuos), el genotipo *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-Wt* representa un 32,5% (9 individuos), el genotipo *Pitx2 LoxP-LoxP* representa un 25,42% (10 individuos) y el genotipo *Pitx2 LoxP-Wt* representa un 27,5% (11 individuos) de la población obtenida.

Las frecuencias esperadas en cada uno de los genotipos son de un 0,25 sobre 1. Con los resultados obtenidos de las camadas, observamos que el genotipo *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-LoxP* tiene una frecuencia de 0'15, el genotipo *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-Wt* tiene una frecuencia de 0'33, el genotipo *Pitx2 LoxP-LoxP* presenta una frecuencia de 0'25 y el genotipo *Pitx2 LoxP-Wt* tiene una frecuencia de 0'28. La frecuencia obtenida en *Pitx2 LoxP-LoxP* coincide exactamente con la esperada, y la obtenida en *Pitx2 LoxP-Wt* es ligeramente superior a la esperada. No obstante, los genotipos *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-LoxP* y *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-Wt* tienen una diferencia mayor de frecuencia real con respecto a la esperada.

En las tres camadas realizadas en este trabajo vemos que en todas ellas no hubo letalidad para cada uno de los genotipos estudiados.

5.3. Caracterización molecular de los mutantes condicionales de *Pitx2* en estadio adulto

Para conocer si la delección de *Pitx2* en las células progenitoras miogénicas *Myf5Cre^{+/-}* tiene algún efecto en los patrones de expresión de precursores miogénicos en el músculo adulto, hemos analizado la expresión de los factores miogénicos *Pax3* y *Pax7*. Por ello se analizaron, mediante qRT-PCR, *Pax3*, *Pax7* y *Pitx2* en los ratones mutantes condicionales heterocigotos.

En primer lugar, llevamos a cabo el análisis de la expresión de *Pitx2* en los ratones mutantes condicionales. Como es de esperar, se observa una disminución significativa de aproximadamente 50% de los niveles de expresión de *Pitx2* en los ratones *Myf5 Cre^{+/-}; Pitx2 LoxP-wt* frente a los *Myf5 Cre^{+/-}* (Figura 10, A), debido a la delección parcial de *Pitx2*.

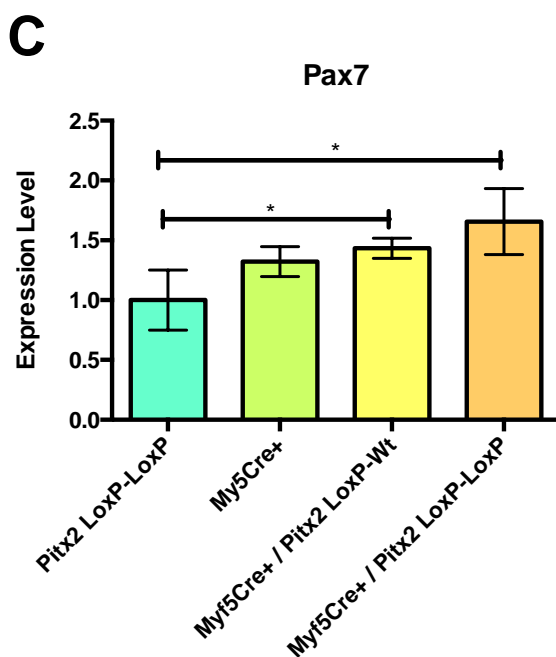
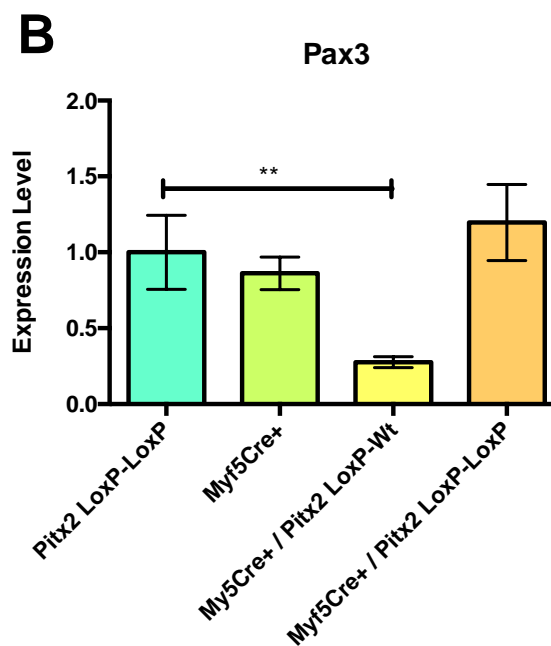
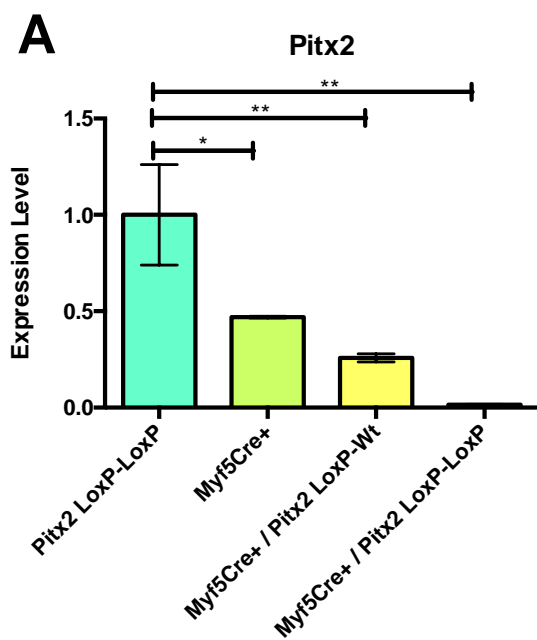


Figura 15: Determinación mediante qPCR de los niveles de expresión de *Pitx2*, *Pax3* y *Pax7* en tibiales anteriores de los ratones adultos. A) Niveles de expresión de *Pitx2*: Se puede observar una disminución significativa de dicho nivel de *Pitx2 LoxP-LoxP* con respecto a *Myf5 Cre+/Pitx2 LoxP-LoxP* y con respecto a *Myf5 Cre+/Pitx2 LoxP-LoxP* (ambos con $**P<0,001$), aunque hay una menor disminución significativa con respecto a *Myf5 Cre+* ($*P<0,01$). B) Niveles de expresión de *Pax3*: En este caso sólo hubo una disminución significativa entre *Pitx2 LoxP-LoxP* y *Myf5Cre+/Pitx2 LoxP-Wt* ($**P<0,001$), mientras que los demás genotipos analizados no tienen diferencias significativas entre ellos. C) Niveles de expresión de *Pax7*: Solamente se señala un aumento significativo entre *Pitx2 LoxP-LoxP* y *Myf5Cre+/Pitx2 LoxP-Wt*, al igual que con *Myf5 Cre+/Pitx2 LoxP-LoxP* ($*P<0,01$), y no guarda diferencia significativa con *Myf5Cre+*.

Los análisis en la expresión de *Pax3* indican una disminución significativa entre *Myf5* *Cre^{+/-}* y *Myf5* *Cre^{+/-}* ; *Pitx2* *LoxP-wt* (Figura 10, B), sabiendo que *Pax3* es un gen importante en el desarrollo embrionario debido a que activa las células de la cresta neural, haciendo que éstas se conviertan en células de la mesénquima, migrando por todo el cuerpo y convirtiéndose en músculos esqueléticos (Asher, J. et al, 1996)

La disminución de los niveles de *Pitx2* viene acompañada por el aumento de los niveles de *Pax7* (Figura 10, C). *Pax7* es un marcador de células satélite en estado quiescente. Sin embargo, cuando éstas se activan, los niveles de *Pax7* disminuyen para que sea posible la diferenciación celular (Martínez-Fernández, S., et al, 2006). Por ello, en los resultados obtenidos observamos que la disminución de los niveles de *Pitx2* ejerce un refuerzo del estado de quiescencia de las células satélite.

5.4. Cuantificación del número de células satélite

Debido a que los datos obtenidos hasta ahora indican que la disminución “in vitro” de *Pitx2* puede tener un efecto en la activación y diferenciación de las células satélite del músculo esquelético, decidimos testar si los ratones mutantes condicionales para *Pitx2* presentaban alguna alteración en el número de células satélite existente en los diferentes genotipos, es decir, si la delección de *Pitx2* parcial o total afecta a la presencia de células satélite en el músculo esquelético.

La prueba que realizamos consiste en el recuento de núcleos que, en su mismo lugar, presenta también expresión de *Pax7* (Figura 16), indicando así que se tratan por tanto de células satélite (Figura 17: A, B y C).

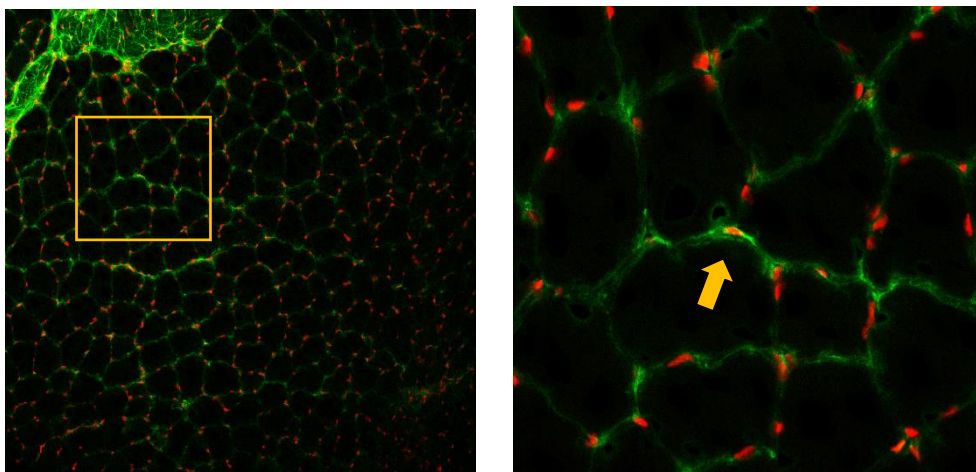


Figura 16: A la izquierda, fotografía obtenida a través de microscopio confocal de corte transversal de tibia de *Myf5Cre^{+/-} / Pitx2 LoxP-LoxP*. A la derecha, zoom que se realizó sobre la zona marcada en recuadro amarillo (izquierda), observándose por ejemplo la expresión de *Pax7* en varias células del tejido (flecha).

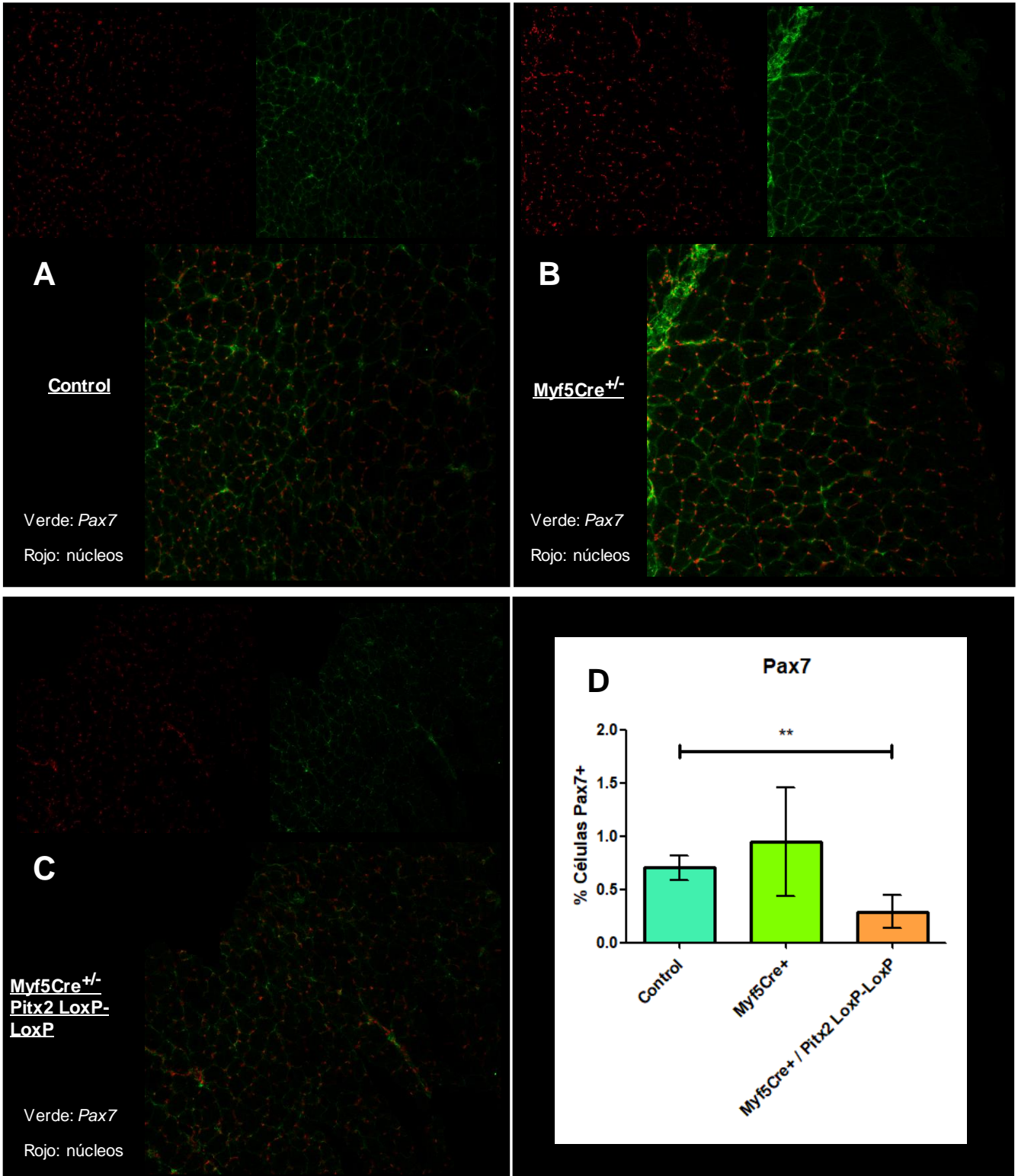


Figura 17: Inmunohistoquímica. A) Imagen representativa de las fibras musculares de tibial anterior de ratón *Pitx2* *LoxP-LoxP* (Control). B) Imagen representativa de las fibras musculares de tibial anterior de ratón *Myf5* *Cre*^{+/-}. C) Imagen representativa de las fibras musculares de tibial anterior de ratón *Myf5* *Cre*^{+/-} / *Pitx2* *LoxP-LoxP*. D) Porcentaje de células que expresan *Pax7*. Se aprecia una disminución significativa del porcentaje de células *Pax7*⁺ de los ratones *Myf5**Cre*^{+/-} / *Pitx2* *LoxP-LoxP* (***P*<0.001) frente al Control.

Los porcentajes de expresión de *Pax7* se corresponde con la presencia de núcleos con expresión de *Pax7* en las fotografías obtenidas, siendo *Myf5**Cre*^{+/-} / *Pitx2* *LoxP-LoxP* el genotipo que presenta una mayor cantidad de células satélite que *Myf5**Cre*^{+/-} / *Pitx2* *LoxP-LoxP*.

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tras los análisis de la qRT-PCR realizadas en los tibiales de cada uno de los genotipos muestran que, en el caso de *Pitx2*, los niveles de expresión de la misma son prácticamente inexistentes en el caso de los ratones *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-LoxP*, debido a que Cre Rcombinasa suprime la expresión de *Pitx2*, validando este modelo como sistema para deleccionar *Pitx2* en los músculos de las extremidades del ratón adulto.

En el caso de *Pax3*, gen principal que desencadena la miogénesis embrionaria y que es expresado en las células migratorias de largo alcance (Kassar-Duchossoy et al., 2005), su expresión en los músculos de los mutantes condicionales *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-Wt* analizados es anormalmente bajo. Estos resultados pueden estar indicando que la ausencia de *Pitx2* conduce o bien a una pérdida de migración de precursores miogénicos a las extremidades o a un bloqueo de la expresión de *Pax3* en ausencia de *Pitx2*. Experimentos adicionales y un aumento en el tamaño de la muestra nos ayudarán a discernir esta cuestión.

La expresión de ARNm de *Pax7* es significativamente alta en los genotipos *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-Wt* y *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-LoxP* cuando se compara su expresión en los genotipos *Pitx2 LoxP-LoxP*, lo que podría estar indicando una regulación al alza de *Pax7* en ausencia de *Pitx2*. Sin embargo, el recuento de células que expresan *Pax7* en los cortes de los músculos tibiales se observó que existe una disminución significativa de células que expresan *Pax7* en el genotipo *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-LoxP*. Esta discrepancia podría ser debida a dos razones: o bien la existencia de un mecanismo de regulación post-transcripcional que impida la traducción del transcrito para *Pax7*, o de lo contrario que aunque exista un número reducido de células progenitoras musculares (células satélite) en los ratones *Myf5Cre^{+/-} Pitx2 LoxP-LoxP*, éstas células presenten una expresión más elevada de *Pax7*. Una vez más un aumento del tamaño de la muestra en nuestro sistema, así como un análisis de posibles reguladores post-transcripcionales tales como los miRNAs nos ayudarán a explicar este hallazgo.

8. CONCLUSIÓN

Primera conclusión:

La línea de los ratones mutantes condicionales *Myf5Cre^{+/-} / Pitx2 LoxP-LoxP* no presenta letalidad embrionaria, con una supervivencia normal que no difiere de los ratones control.

Segunda conclusión:

El número de células madre musculares (células satélite *Pax7+*) en los ratones mutantes *Myf5Cre^{+/-} / Pitx2 LoxP-LoxP* es menor, aunque los niveles de expresión de *Pax7* están incrementados. Estudios adicionales nos permitirán dilucidar si ésta discrepancia se debe a un aumento de expresión de *Pax7* en las células satélite o la regulación post-transcripcional.

.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aoyama H, Asamoto K. 1988. "Determination of somite cells: Independence of cell differentiation and morphogenesis." *Development* 104: 15–28.
- Arnold SJ, Robertson EJ. 2009. "Making a commitment: Cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo." *Nat Rev* 10: 91–103.
- Asher, J. H.; Sommer, A.; Morell, R.; Friedman, T. B. 1996. "Missense mutation in the paired domain of PAX3 causes craniofacial-deafness-hand syndrome". *Human Mutation*. 7 (1): 30-35.
- Aulehla A, Pourquie O. 2006. "On periodicity and directionality of somitogenesis." *Anat Embryol* 211: 3–8.
- Ben-Yair R, Kalcheim C. 2005. "Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates." *Development* 132: 689–701.
- Bismuth K, Relaix F. 2010. "Genetic regulation of skeletal muscle development." *Exp Cell Res* 316: 3081–3086.
- Bryson-Richardson RJ, Currie PD. 2008. "The genetics of vertebrate myogenesis." *Nat Rev Genet* 9: 632–646.
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L. A., et al., 1999. "The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping." *Development* 126, 1225–1234.
- Chaney, B. A., Clark-Baldwin, K., Dave, V., Ma, J., and Rance, M., 2005. "Solution structure of the K50 class homeodomain PITX2 bound to DNA and implications for mutations that cause Rieger syndrome." *Biochemistry* 44, 7497–7511. doi: 10.1021/bi0473253
- Chanoine, C., Della Gaspera, B., and Charbonnier, F., 2004. "Myogenic regulatory factors: redundant or specific functions? Lessons from *Xenopus*." *Dev Dyn*, 231(4): p. 662-70.

- Charge SB, Rudnicki MA. 2004. "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." *Physiol Rev* 84: 209–238
- Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier FJ, Bassaglia Y, Shinin V, Tajbakhsh S, Chazaud B, et al. 2007. "Muscle satellite cells and endothelial cells: Close neighbors and privileged partners." *Mol Biol Cell* 18: 1397–1409.
- Ciciliot, S. and S. Schiaffino. 2010. "Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications." *Curr Pharm Des*, 16(8): p. 906-14.
- Cinnamon Y, Kahane N, Bachelet I, Kalcheim C. 2001. "The sub-lip domain— a distinct pathway for myotome precursors that demonstrate rostral–caudal migration." *Development* 128: 341–351.
- Cinnamon Y, Kahane N, Kalcheim C. 1999. "Characterization of the early development of specific hypaxial muscles from the ventrolateral myotome." *Development* 126: 4305–4315.
- Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. 2005. "Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche." *Cell*. 122:289-301.
- Conboy MJ, Karasov AO, Rando TA. 2007. "High incidence of nonrandom template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny." *PLoS Biol* 5: e102.
- Cox, C. J., Espinoza, H. M., McWilliams, B., Chappell, K., Morton, L., Hjalt, T. A., et al., 2002. "Differential regulation of gene expression by PITX2 isoforms." *J. Biol. Chem.* 277, 25001–25010. doi: 10.1074/jbc.M201737200
- Dong, F., Sun, X., Liu, W., Ai, D., Klysik, E., Lu, M. F., Hadley, J., Antoni, L., Chen, L., Baldini, A. et al., 2006. "Pitx2 promotes development of splanchnic mesoderm-derived branchiomic muscle." *Development* 133, 4891-4899.
- Gage, P.J. and S.A. Camper, 1997. "Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation." *Hum Mol Genet*, 6(3): p. 457-64.

- Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P. 1991. "*Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis.*" *EMBO J* 10: 1135–1147.
- Francisco Hernández-Torres, Lara Rodríguez Outeiriño, Diego Franco, Amelia E. Aránega, 2017. "*Pitx2 in Embryonic and Adult Myogenesis.*" *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(46): p.6. doi: 10.3389/fcell.2017.00046
- Gros J, Manceau M, Thome V, Marcelle C. 2005. "*A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells.*" *Nature* 435: 954–958.
- Hutcheson DA, Zhao J, Merrell A, Haldar M, Kardon G. 2009. "*Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for β -catenin.*" *Genes Dev* 23: 997–1013.
- Jostes B, Walther C, Gruss P. 1990. "*The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system.*" *Mech Dev* 33: 27–37.
- Juan Andrés Aldana Torres. 2002. "*Aspectos básicos de la miogénesis y algunas consideraciones prácticas.*" *Acta Biológica Colombiana*, 7(1): 59-60.
- Kassar-Duchossoy L, Giaccone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomes D, Tajbakhsh S. 2005. "*Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development.*" *Genes Dev* 19: 1426–1431.
- Kiefer JC, Hauschka SD. 2001. "*Myf-5 is transiently expressed in nonmuscle mesoderm and exhibits dynamic regional changes within the presegmented mesoderm and somites I-IV.*" *Dev Biol* 232: 77–90.
- Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. 2008. "*Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation.*" *Cell Stem Cell* 2: 22–31.

- L'Honoré, A., Coulon, V., Marcil, A., Lebel, M., Lafrance-Vanasse, J., Gage, P. J., Camper, S. A. and Drouin, J. 2007. "Sequential expression and redundancy of *Pitx2* and *Pitx3* genes during muscle development." *Dev. Biol.* 307, 421-433.
- L'honoré, A., Ouimette, J.-F., Lavertu-Jolin, M., and Drouin, J., 2010. "*Pitx2* defines alternate pathways acting through *MyoD* during limb and somitic myogenesis." *Development* 137, 3847–3856. doi: 10.1242/dev.053421
- Lepper C, Conway SJ, Fan CM. 2009. "Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements." *Nature* 460: 627–631.
- Lepper C, Partridge TA, Fan CM. 2011. "An absolute requirement for *Pax7*-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration." *Development* 138: 3639–3646.
- Lepper C, Fan CM. 2010. "Inducible lineage tracing of *Pax7*-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells." *Genesis* 48: 424–436.
- Manceau M, Gros J, Savage K, Thome V, McPherron A, Paterson B, Marcelle C. 2008. "Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors." *Genes Dev* 22: 668–681.
- Maqbool T, Jagla K. 2007. "Genetic control of muscle development: Learning from *Drosophila*." *J Muscle Res Cell Motil* 28: 397–407.
- Martinez-Fernandez, S., et al. 2006. "*Pitx2c* overexpression promotes cell proliferation and arrests differentiation in myoblasts." *Dev Dyn*, 235(11): 2930-9.
- Martinez-Fernandez, S., et al., 2006. "*Pitx2c* overexpression promotes cell proliferation and arrests differentiation in myoblasts." *Dev Dyn*, 235(11): p. 2930-9.
- Mauro A. 1961. "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol.* 9:493-495.
- Ordahl CP, Berdougo E, Venters SJ, Denetclaw WF Jr. 2001. "The dermomyotome dorsomedial lip drives growth and morphogenesis of both the primary myotome and dermomyotome epithelium." *Development* 128: 1731–1744.

- Ott MO, Bober E, Lyons G, Arnold H, Buckingham M. 1991. "Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo." *Development* 111: 1097–1107.
- Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. 2003. "Looking back to the embryo: Defining transcriptional networks in adult myogenesis." *Nat Rev Genet* 4: 497–507.
- Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. 2002. "Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos." *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 747–783.
- Punch VG, Jones AE, Rudnicki MA. 2009. "Transcriptional networks that regulate muscle stem cell function." *Wiley Interdiscip Rev* 1: 128–140.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. 2004. "Divergent functions of murine *Pax3* and *Pax7* in limb muscle development." *Genes Dev* 18: 1088–1105.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. 2005. "A *Pax3/ Pax7*-dependent population of skeletal muscle progenitor cells." *Nature* 435: 948–953.
- Rudnicki MA, Jaenisch R. 1995. "The *MyoD* family of transcription factors and skeletal myogenesis." *Bioessays* 17: 203–209.
- Rudnicki MA, Le Grand F, McKinnell I, Kuang S. 2008. "The molecular regulation of muscle stem cell function." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 323–331.
- Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, Vitorovic S, Blau HM. 2008. "Selfrenewal and expansion of single transplanted muscle stem cells." *Nature*. 456:502-506.
- Sassoon D, Lyons G, Wright WE, Lin V, Lassar A, Weintraub H, Buckingham M. 1989. "Expression of two myogenic regulatory factors *myogenin* and *MyoD1* during mouse embryogenesis." *Nature* 341: 303–307.
- Scadden DT. 2006. "The stem-cell niche as an entity of action." *Nature* 441: 1075–1079.

- Schienda J, Engleka KA, Jun S, Hansen MS, Epstein JA, Tabin CJ, Kunkel LM, Kardon G. 2006. "Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells." *Proc Natl Acad Sci* 103: 945–950.
- Schmalbruch H, Lewis DM. 2000. "Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles." *Muscle Nerve* 23:617–626.
- Schultz E. 1996. "Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles." *Dev Biol* 175: 84–94.
- Schweickert, A., Campione, M., Steinbeisser, H., and Blum, M., 2000. "Pitx2 isoforms: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry." *Mech. Dev.* 90, 41–51. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00227-0
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. 2000. "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells." *Cell* 102: 777–786.
- Shea KL, Xiang W, LaPorta VS, Licht JD, Keller C, Basson MA, Brack AS. 2010. "Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration." *Cell Stem Cell* 6: 117–129.
- Shih HP, Gross MK, Kioussi C. 2008. "Muscle development: Forming the head and trunk muscles." *Acta Histochem* 110: 97–108.
- Shih, H. P., Gross, M. K. and Kioussi, C., 2007b. "Expression pattern of the homeodomain transcription factor Pitx2 during muscle development." *Gene Expr. Patterns* 7, 441-451.
- Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D, Tajbakhsh S. 2006. "Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells." *Nat Cell Biol* 8: 677–687.
- Sumariwalla, V.M. and W.H. Klein. 2001. "Similar myogenic functions for myogenin and MRF4 but not MyoD in differentiated murine embryonic stem cells." *Genesis* 30(4): p. 239-49.

- Tajbakhsh S. 2009. "Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis." *J Intern Med* 266: 372–389.
- Takahashi Y. 2001. "Somitogenesis in vertebrate development." Wiley, New York.
- Vasyutina E, Birchmeier C. 2006. "The development of migrating muscle precursor cells." *Anat Embryol (Berl)* 211: 37–41.
- Yoshioka, H., Meno, C., Koshiba, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimaru, Y., et al., 1998. "Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a left signaling pathway in determination of left-right asymmetry." *Cell* 94, 299–305. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81473-7
- Zammit PS Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. 2006. "The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came, in from the cold." *J Histochem Cytochem.* 54(11):1177-1191.
- Lozano-Velasco, E., 2011. "Papel de Pitx2 en el control transcripcional y posttranscripcional de la miogénesis."
- L'Honore, A., et al., 2010. "Pitx2 defines alternate pathways acting through MyoD during limb and somitic myogenesis." *Development*, 137(22): p. 3847-56.