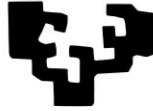


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Caracterización celular y molecular de la miogénesis dérmica de ratón y su posible traslación al humano

Neia Naldaiz Gastesi

2018



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

bi+odonostia
osasun ikerketa institutua
instituto de investigación sanitaria

Caracterización celular y molecular de la miogénesis dérmica de ratón y su posible traslación al humano

Neia Naldaiz Gastesi

Memoria presentada para optar al grado de Doctor
por la Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea

Departamento de Neurociencias
Facultad de Medicina y Odontología

Bajo la dirección de los Doctores

Adolfo López de Munain y Ander Izeta

Donostia - San Sebastián, enero de 2018

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Instituto Biodonostia gracias a una ayuda del Programa Predoctoral de Formación de Personal Investigador No Doctor del Departamento de Educación, Política Lingüística y Cultura del Gobierno Vasco - Eusko Jaurlaritza, a una ayuda para la Formación de Jóvenes Investigadores Predoctorales recibida de la Fundación Ilundain, y a las ayudas para la investigación recibidas del Instituto de Salud Carlos III, de la Fundación Isabel Gemio, de la Fundación Ilundain, de la Diputación Foral de Gipuzkoa, del Gobierno Vasco, del Gobierno Español y de la Unión Europea.

Aittona Joxeri

Nolabait, gertu edo urruti, edonola ere,
nire eguneroko bizitzaren parte izan diren guztiei

Zuri

AGRADECIMIENTOS

ESKERTZAK



Cuan importante fue para mí aquel día 2 de marzo de 2012, inicio de un largo periodo de aprendizaje profesional, pero sin duda también, de aprendizaje personal. Como al comienzo de este proyecto donde me sentía realmente agradecido por la oportunidad que me brindasteis, reitero mis agradecimientos ahora al término de esta aventura. He recibido con disposición vuestra formación y vuestros consejos que con tanta dedicación y afán me ofreciais en el laboratorio, en las reuniones, en las comidas de trabajo o en el autobús de camino al Instituto. Gracias por haber dirigido esta pequeña sinfonia.

Mis más sincero agradecimiento a todos vuestros colaboradores por haberme dado la oportunidad de formar parte de este gran puzzle infinito que es la investigación.

Gracias a ti por elaborar los croquis de este trabajo, por haberme guiado y haberme enseñado con tanta ilusión en mis inicios.

Gracias, mil, mil, mil gracias por reírte con nosotras y comprendernos, por toda tu ayuda, tu paciencia, por tu temple con los ratones, por pelearte con la aduana canadiense, por tratar de amigar a Soriano y Carvajal, por ceder parte de tu trabajo (y saber) a esta tesis, y sobre todo, gracias por escucharme siempre.

Zuri ere eskerrik asko, zure lana eta esportuak hermentze daukelako, moiz ere lagintzarik eta didatutako ukatu, beti hitz politak dauzkazulako eta bileratxoak egiteko irrikitan egoten zarela.

Ene haizeari, haizibat eta haizibatetan hauspora eman didazonari, mila mila esker, hegan egin ezinik geratuko nintzateke zu gabe. Lehortutako malko guttiengatik eta arnastutako algarra guttiengatik, eskerrak ene haize, beti gertu, beti lagun.

Eskerrik asko handi bat nere lerele kuttunari, zuek gabe ez dago eta "tridenterik". Tesiaren soinua-banda osatu ondoren, hainbat hizkuntzetan hitz zeharo berriak ikasi ondoren, batak bestearekin edo bertan lagundu ondoren, B, C eta D planak eratu ondoren, eta -erai kuntza honen parieten artean eta kanpoan itandako hainbat eta hainbat bitipen gati-gotoren ondoren, sokatxo ikusezinet behirako loturik geratu gara. Mila mila esker korapilo sendu bat sortzearen.

Ni beti izango naiz txiki, zu beti izango zara handi, eskerrik asko muxoli erinbesteko sostengu izateagatik, bai laborategian eta bai kalean ere.

Gracias a la hormiguita del labo, porque siempre nos entenderemos, por esas tantas conversaciones y por ese gran bigotí que tienes, mila esker.

Eskerrik asko Institutuko bertsozarrari, elkarriaketa zientzia betainbeste gustatzen zaigulako bizi, mila esker atseginet itandako muntza sarri guttiengatik.

Gracias a nuestra preferida, gracias por hacer que todo resulte más fácil y gracias por esa preciosa sonrisa que mejora cualquier situación.

Gainontzeko taldekoei, goiko eta behekoiei, itandakoei ere, mila mila esker, nolabait tesi hau aurrera eramateko lan giro ona sustatzeaz arduratu zaretebako, eta bereziki, atkena etorri zarenari, izututa alde egin ez dutulako, berri izanik, aspaldiko ermaten dutulako.

Y como no, eskerrik asko Prins! Formar esta wadrilla fue uno de los mejores consejos que pudimos seguir. Gracias por vuestra complicidad y compañerismo, por hacer del Instituto un lugar al que acudir sin miedo y con ilusión. Especialmente, un enorme gracias a todos aquellos que comenzaron a recorrer su propio camino junto a mis primeros pasos.

Unas verdaderas, sinceras, grandes, sentidas gracias para ti, pulpito, por ser una constante en esta compleja ecuación que es la vida. Gracias por creer tanto en mí, por ser tú mi inspiración y por darme a conocer a quienes me han transmitido su pasión por la investigación.

Eskerrik asko Kadrila osoari, beti hor zaudete baten penak entuteko eta itotzen laguntzeko ere, baina batez ere, eskerrik asko zuri nere baranda izateagatik, denboraren eta peripezien ostean beti nire ondan mantendu zarelako, behar izan denean eta behar izan ez denean, beti jopoz elkar tu garelako.

Nire familiari zer esan, "eskerrik asko denagatik" hain hutsala izanik motz geratzen denean. Sentitzen dudana ezin dezaket hitzet azaldu, zein harro nagan, zein forte onekoa naizen, zein baterainoko mirespena diuedan eta zer nolako kermena ematen didaun, zuei esker nago ni hermen. **Eskerrik asko.**

Era berean, beste aldeko familiari ere bihotzet eskerrik asko eman didaun babes, adore eta goxotasun guztiagatik.

Familiako adar bakoitzetik, bi lehengusu minei eskerrik asko, orain mozt baino gertuago sentitu zaituztedalako eta intereset entzun didazuelako, batarekin kafe, zumo eta pastak tartean zirela, eta bestearekin gau giron edo hondartako arean tartean zirela.

Nilu esker amona Maritzu, lan denboraldi honen testigu, askari, lo-koltxka eta belaraldi etberdinetatik datozenen arteko ulertezinak diren eran estimuz beteriko elkarrizketen artean, zure etxea izan da nire oasia.

Baita zuri ere aitona Joxe, benetan pena eta samina baitut zuk lan hau irakurri eta zutendu ezin izanagatik, zurekin batera landuko baimen dudarik gabe. Nahit eta ezin eman, eskerrik asko nere inspirazio izateagatik, munduarekiko zenuen jakin-minet beteriko itaera hark nire eredu izaten jarraituko du.

Eskerrik handienak zuretzat, zu, itsasoa zekar ala bare, ulertu
etean hala ere, trinko so geratzen dena zure begiradak
ermaten dit beste ezerk eman ezin didan indarra.
Eskerrik asko mattea.

Bestalde, gainontzeko senitarteksei, lagunei eta etagunei ere
eskerrik asko, inoiz ahartu gabe eginiko galderek eta zuen
interesak putz egiten zieten belei aurrera joateko premian.

Gracias a todos por hacer que esta sea la palabra más repetida
y más importante de esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE

I ÍNDICE GENERAL **3**

II ÍNDICE DE TABLAS **8**

III ÍNDICE DE FIGURAS **9**

I ÍNDICE GENERAL

1	ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	14
2	RESUMEN	20
3	INTRODUCCIÓN	22
3.1	El tejido muscular	22
3.1.1	El músculo esquelético	22
3.1.1.1	Desarrollo embrionario del músculo esquelético	28
3.1.1.2	Proceso de regeneración del músculo esquelético	31
3.1.1.3	Músculos cutáneos de los mamíferos	36
3.1.1.3.1	El panículo carnoso	36
3.1.1.4	Músculos humanos remanentes del panículo carnoso	39
3.1.1.5	El cremáster humano	42
3.2	Enfermedades asociadas al músculo esquelético	43
3.2.1	Enfermedades musculares genéticas	43
3.2.1.1	Distrofias musculares	44
3.2.2	Enfermedades musculares adquiridas	44
3.2.2.1	Sarcopenia	44
3.3	Terapia celular con células satélite y mioblastos	46
3.4	Estudio de la miogénesis <i>in vitro</i>	48
3.4.1	Expansión de precursores miogénicos en cultivos esferogénicos en suspensión	49
3.4.2	Factores determinantes para la diferenciación miogénica funcional	51
3.4.3	Células miogénicas primarias como material de partida	54
3.4.3.1	Diferenciación músculo-esquelética a partir de piel	55
4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	60
5	MATERIALES Y MÉTODOS	62
5.1	Materiales	62
5.2	Reactivos	63
5.3	Anticuerpos	66
5.4	Sondas para reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	70

5.5	Líneas de ratones	70
5.6	Pacientes	72
5.7	Métodos	72
5.7.1	Generación del ratón transgénico <i>B195AP^{Cre}</i>	72
5.7.2	Material biológico	73
5.7.2.1	Biopsia de piel dorsal de ratón	74
5.7.2.2	Biopsia de músculo tibial anterior (TA) de ratón	74
5.7.2.3	Biopsia de músculo cremáster humano	74
5.7.3	Histología	75
5.7.3.1	Análisis por microscopia electrónica de transmisión (MET)	75
5.7.3.2	Detección de β -galactosidasa	76
5.7.3.3	Detección de fosfatasa alcalina	76
5.7.3.4	Procesamiento de la biopsia para criopreservación	76
5.7.3.4.1	Preparación de muestras histológicas criopreservadas y su análisis	77
5.7.3.5	Estudio de las muestras histológicas criopreservadas	80
5.7.3.5.1	Observación de proteínas fluorescentes	80
5.7.3.5.2	Tinción de Hematoxilina-Eosina	80
5.7.3.5.3	Inmunofluorescencia	81
5.7.4	Cultivos celulares	83
5.7.4.1	Preparación de la ECM como soporte para cultivo en adhesión	83
5.7.4.1.1	Reactivos	83
5.7.4.1.2	Elaboración	83
5.7.4.2	Preparación de la poli-L-ornitina (PLO) como soporte para cultivo en adhesión	84
5.7.4.3	Aislamiento de células a partir de biopsias de piel dorsal y músculo TA de ratón y de biopsias de músculo cremáster humanas	85
5.7.4.3.1	Reactivos	85
5.7.4.3.2	Protocolo	85
5.7.4.4	Cultivo de células en suspensión: formación de esferas	86
5.7.4.4.1	Medio de cultivo	86
5.7.4.4.2	Protocolo	86
5.7.4.5	Cultivo de células en adhesión: diferenciación celular	87

5.7.4.5.1	Medio de cultivo	87
5.7.4.5.2	Protocolo	87
5.7.5	Caracterización celular	88
5.7.5.1	Procesamiento celular y análisis por MET	88
5.7.5.2	Detección de β -galactosidasa	89
5.7.5.3	Detección de fosfatasa alcalina	89
5.7.5.4	Tinción <i>Oil Red O</i>	89
5.7.5.5	Tinción cuantitativa de <i>Oil Red O</i>	90
5.7.5.5.1	Reactivos	90
5.7.5.5.2	Protocolo	90
5.7.5.6	Cuantificación de triglicéridos	90
5.7.5.7	Inmunofluorescencia	91
5.7.5.8	Extracción de proteínas	92
5.7.5.9	Análisis de proteínas por <i>Western blot</i>	93
5.7.5.9.1	Reactivos	93
5.7.5.9.2	Protocolo	93
5.7.5.10	Extracción de ARN	94
5.7.5.11	Análisis de ARN	95
5.7.5.11.1	PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	95
5.7.5.11.2	Análisis del transcriptoma	96
5.7.5.12	Análisis electrofisiológico	97
5.7.5.13	Análisis por citometría de flujo	99
5.7.5.13.1	BD Lyoplate™ <i>Mouse Cell Surface Marker Screening Panel</i>	100
5.7.5.13.2	Separación celular por fluorescencia	101
5.7.6	Ensayos <i>in vivo</i>	102
5.7.6.1	Trazados de linaje celulares mediante ratones transgénicos	102
5.7.6.2	Trazados de linaje celulares mediante ratones transgénicos inducibles	103
5.7.6.2.1	Trasplante de médula ósea de ratón	104
5.7.6.2.2	Ensayo de depleción celular <i>in vivo</i>	104
5.7.6.2.3	Ensayo de generación de herida en piel dorsal mediante punción	105
5.7.6.3	Ensayo de regeneración muscular	105
5.7.6.3.1	Trasplante de células de ratón	105

5.7.6.3.2	Trasplante de células humanas	106
5.7.7	Análisis estadísticos	107
6	RESULTADOS	110
6.1	Obtención de miotubos contráctiles <i>in vitro</i> a partir de precursores derivados de la piel	110
6.1.1	Caracterización músculo esquelética del cultivo celular en suspensión y en adhesión	113
6.1.2	Caracterización electrofisiológica de los miotubos contráctiles	125
6.1.3	Comparación del potencial miogénico del método utilizado con el de un protocolo descrito anteriormente	132
6.1.4	Estudio de la evolución a largo plazo del cultivo celular obtenido	140
6.2	Aplicación del protocolo de cultivo celular a muestras de músculo	144
6.3	Caracterización del músculo esquelético de la piel dorsal de ratón	147
6.3.1	Origen embrionario del PC y de sus células satélite	151
6.4	Cultivo, caracterización y análisis del potencial miogénico de las células derivadas del PC	155
6.4.1	Enriquecimiento en cultivo en suspensión de las células derivadas del PC	155
6.4.2	Formación de miotubos <i>in vitro</i> a partir de células derivadas del PC	159
6.4.3	Análisis de expresión de marcadores de superficie y aislamiento de la población miogénica derivada del PC	165
6.4.4	Implicación de las células satélite del PC en la formación de los miotubos <i>in vitro</i>	171
6.4.5	Potencial regenerativo de las células derivadas del PC en un modelo de daño muscular <i>in vivo</i>	173
6.5	Contribución de las células derivadas de la médula ósea al PC y a la formación de miotubos <i>in vitro</i>	175
6.6	Papel fisiológico del PC en homeostasis y en respuesta a herida	178
6.7	Traslación al humano: descripción del músculo cremáster	184
6.8	Cultivo y análisis del potencial miogénico de las células derivadas del cremáster	188
6.8.1	Expansión y formación de miotubos <i>in vitro</i> a partir de células derivadas del cremáster	188

6.8.2	Potencial regenerativo de las células derivadas del cremáster en un modelo de daño muscular <i>in vivo</i>	193
7	DISCUSIÓN	198
7.1	Método de cultivo <i>in vitro</i>	199
7.1.1	La variabilidad intrínseca del sistema	199
7.1.2	El equilibrio dinámico entre miogénesis y adipogénesis en el cultivo en adhesión	200
7.1.3	Origen del impulso de la contracción en el cultivo en adhesión	203
7.2	Identificación de los precursores miogénicos de la piel de ratón	204
7.2.1	Trazado de linaje de <i>Myf5^{CreSOR}</i> versus <i>B195AP^{Cre}</i>	204
7.2.2	Valoración de la capacidad miogénica de las fracciones negativas de los trazados de linaje	205
7.2.3	Expresión de marcadores de superficie por las poblaciones celulares de interés	206
7.2.4	Agrupamiento de las poblaciones celulares en base al transcriptoma	208
7.2.5	Participación de otras poblaciones celulares de la piel en la miogénesis <i>in vitro</i>	209
7.3	Papel fisiológico del PC	213
7.3.1	Posibles diferencias en la capacidad regenerativa de las células satélite de distintos músculos	213
7.3.2	Definiendo el papel del PC durante la cicatrización	214
7.4	Posibles extrapolaciones al ser humano	216
7.4.1	El músculo cremáster como posible remanente del PC y su aplicabilidad clínica	216
8	CONCLUSIONES	220
9	BIBLIOGRAFÍA	222
10	ANEXOS	250
10.1	Anexo I: BD Lyoplate™ <i>Mouse Cell Surface Marker Screening Panel</i>	250
10.2	Anexo II: Arrays utilizados para los análisis transcriptómicos	255
10.3	Anexo III: Controles experimentales	257
10.4	Anexo IV: Artículos publicados en relación al presente trabajo	260

II ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Marcadores moleculares de las células satélite quiescentes y activadas de ratón. Se enumeran los nombres más comúnmente utilizados.	28
Tabla 5.1. Materiales.	62
Tabla 5.2. Reactivos.	66
Tabla 5.3. Anticuerpos primarios empleados en las inmunofluorescencias.	67
Tabla 5.4. Anticuerpos secundarios empleados en las inmunofluorescencias. En la última fila se añade un péptido conjugado fluorescente utilizado también en esta técnica.	68
Tabla 5.5. Anticuerpos primarios para <i>Western blot</i> .	68
Tabla 5.6. Anticuerpos secundarios para <i>Western blot</i> .	68
Tabla 5.7. Anticuerpos primarios y control de isotipos utilizados por citometría de flujo en los experimentos con el BD Lyoplate™ <i>Mouse Cell Surface Marker Screening Panel</i> .	69
Tabla 5.8. Anticuerpos secundarios conjugados utilizados por citometría de flujo en los experimentos con el BD Lyoplate™ <i>Mouse Cell Surface Marker Screening Panel</i> . En la última fila se añade una proteína conjugada fluorescente utilizada en esos mismos experimentos como agente terciario.	69
Tabla 5.9. Anticuerpos primarios y control de isotipos conjugados utilizados en experimentos de separación celular por citometría de flujo.	69
Tabla 5.10. Proteína conjugada fluorescente utilizada en experimentos de separación celular por citometría de flujo como agente terciario.	69
Tabla 5.11. Sondas TaqMan® de expresión génica.	70
Tabla 5.12. Cepas de ratones utilizadas.	71
Tabla 5.13. Pacientes.	72
Tabla 5.14. Composición de la matriz extracelular.	83
Tabla 5.15. Reactivos utilizados en el aislamiento celular.	85
Tabla 5.16. Factores de crecimiento para el cultivo celular en suspensión.	86
Tabla 5.17. Soluciones empleadas en el <i>Western blot</i> .	93
Tabla 5.18. Programa utilizado para la RT-PCR.	95
Tabla 5.19. Programa utilizado para la RT-qPCR.	96
Tabla 10.1. Anticuerpos y controles que contiene la placa 1 del BD Lyoplate™.	253
Tabla 10.2. Anticuerpos y controles que contiene la placa 2 del BD Lyoplate™.	253
Tabla 10.3. Anticuerpos y controles que contiene la placa 3 del BD Lyoplate™.	254
Tabla 10.4. Lista de los <i>arrays</i> de la base de datos GEO utilizados en este trabajo.	256

III ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Estructura del músculo esquelético desde el nivel macroscópico hasta el microscópico.	24
Figura 3.2. Desarrollo embrionario de los músculos esqueléticos del tronco y de las extremidades.	29
Figura 3.3. Programa miogénico que regula la determinación miogénica y la formación de músculo esquelético.	30
Figura 3.4. Esquema donde se resumen los procesos biológicos que se desencadenan tras un daño en el músculo esquelético para recuperar la funcionalidad del tejido.	31
Figura 3.5. Papel de la célula satélite durante la regeneración del músculo esquelético centrándose en la regulación molecular que dirige las transformaciones que sufre.	33
Figura 3.6. Localización anatómica y extensión del panículo carnoso en el ratón.	38
Figura 3.7. Localización de los músculos vestigiales del panículo carnoso en el cuerpo humano así como de la de aquellos que pueden contener remanentes según diversos autores.	41
Figura 3.8. Anatomía del sistema reproductor masculino donde se identifica el músculo cremáster.	42
Figura 3.9. Representación de la piel de ratón y de la piel humana señalando su división en capas y las estructuras principales que contienen.	56
Figura 5.1. Ejemplo del esquema de portas y la distribución de los cortes seriados para el estudio de una biopsia completa.	78
Figura 5.2. Ejemplo del procedimiento de análisis de las muestras.	78
Figura 6.1. Esquema del protocolo de cultivo <i>in vitro</i> utilizado y descripción del cultivo celular obtenido en las distintas fases del procedimiento.	111
Figura 6.2. Análisis de las contracciones observadas a 7 días de cultivo en adhesión.	112
Figura 6.3. Secciones ultrafinas analizadas a través del MET del cultivo en suspensión a día 0 a los 7 días.	115
Figura 6.4. Cuantificación de la expresión de determinados genes miogénicos a día 0 y a día 7 del cultivo en suspensión por RT-qPCR.	116
Figura 6.5. Expresión de genes y proteínas miogénicas en el cultivo en suspensión.	118
Figura 6.6. Secciones ultrafinas y un corte semifino del análisis a través del MET del cultivo en adhesión a día 2 y a los 7 días.	120
Figura 6.7. Expresión de genes y proteínas miogénicas a los 7 días en el cultivo en adhesión.	122
Figura 6.8. Expresión de genes y proteínas conocidas de músculo esquelético y cardíaco en el cultivo en adhesión a día 7.	124
Figura 6.9. Medición de las corrientes iónicas y las variaciones en el voltaje de la membrana de los miofibros contráctiles de cultivos en adhesión a día 10.	126
Figura 6.10. Análisis de las variaciones de la concentración de calcio citosólico causados por la ACh en miofibros de cultivos en adhesión a 10 días.	127
Figura 6.11. Análisis del efecto de diversos compuestos en la concentración de calcio citosólico en cultivos en adhesión a 10 días.	129
Figura 6.12. Estudio de la presencia de células neuronales y signos de posibles interacciones entre neurona-músculo en cultivos en adhesión a los 7 días.	131
Figura 6.13. Esquema de los protocolos de cultivo <i>in vitro</i> utilizados en paralelo, siendo el de arriba el descrito en este trabajo y el de abajo el descrito por (Qiu <i>et al.</i> , 2010).	132
Figura 6.14. Cuantificación de la expresión de determinados genes miogénicos a día 1 y a día 12 del cultivo en adhesión con sustrato de PLO tras seguir el protocolo descrito por (Qiu <i>et al.</i> , 2010).	134

Figura 6.15. Cuantificación de la expresión de determinados genes miogénicos a día 1 y a día 12 del cultivo en adhesión con sustrato de ECM tras seguir el protocolo descrito en este trabajo.	135
Figura 6.16. Comparativa de la expresión de determinados genes miogénicos a día 12 de cultivo en adhesión entre los de sustrato de PLO y los de sustrato de ECM.	136
Figura 6.17. Detección de la proteína MYHC (todas las isoformas) por inmunofluorescencia en cultivos en adhesión diferenciados en paralelo.	138
Figura 6.18. Cuantificación de las células positivas para la proteína MIOGENINA detectada por inmunofluorescencia en cultivos en adhesión diferenciados en paralelo.	139
Figura 6.19. Caracterización de las células vesiculares presentes en los cultivos en adhesión a los 18 días.	140
Figura 6.20. Cuantificación de las células adipogénicas presentes en los cultivos en adhesión a lo largo del tiempo.	141
Figura 6.21. Estudio de la relación entre la población celular miogénica y la adipogénica durante el cultivo en adhesión a largo plazo.	144
Figura 6.22. Análisis del cultivo a partir de músculo esquelético TA.	145
Figura 6.23. Análisis del cultivo a partir de vejiga.	147
Figura 6.24. Análisis de los restos tisulares de cultivos en suspensión a día 0.	148
Figura 6.25. Análisis histológico de biopsias de piel dorsal de ratón.	148
Figura 6.26. Caracterización de las células madre del PC por análisis histológico.	150
Figura 6.27. Representación esquemática secuencial del desarrollo de las estructuras embrionarias por las que derivan y se forman los músculos esqueléticos en el embrión del ratón, desde el mesodermo presomítico hasta el miotomo, indicando a su vez la sucesión de factores de transcripción determinantes que se expresan en cada fase para la formación de esas estructuras y para la generación de precursores miogénicos.	151
Figura 6.28. Análisis cronológico de embriones de ratón portadores del constructo reportero de <i>Myf5 B195AP^{Cre}</i> cruzado con la cepa <i>R26R</i> .	152
Figura 6.29. Análisis histológico de la piel dorsal de los ratones transgénicos escogidos para los trazados de linaje del PC y de sus células satélite.	154
Figura 6.30. Expresión de determinados genes miogénicos a día 7 de cultivo en suspensión respecto a su expresión inicial.	156
Figura 6.31. Análisis de los trazados de linaje a nivel de cultivo celular en suspensión.	159
Figura 6.32. Análisis de los trazados de linaje a nivel de cultivo celular en adhesión.	160
Figura 6.33. Contribución a la diferenciación miogénica de las fracciones celulares linaje+ y linaje- separadas por citometría de flujo.	162
Figura 6.34. Contribución a la generación de los miotubos por parte de otras poblaciones celulares no-miogénicas <i>per se</i> .	165
Figura 6.35. Análisis masivo de la expresión de proteínas de superficie por citometría de flujo en poblaciones celulares determinadas por los trazados de linaje.	167
Figura 6.36. Análisis del potencial miogénico en cultivos en adhesión a los 7 días de las distintas fracciones separadas por citometría de flujo en base a la expresión de SYNDECAN-4.	169
Figura 6.37. Análisis del transcriptoma de las fracciones separadas por citometría de flujo comparadas entre sí y con los datos publicados en la base de datos GEO.	171
Figura 6.38. Cultivo celular analizado en adhesión a 7 días tras la supresión de la población de las células satélite del PC.	173

Figura 6.39. Contribución a la regeneración muscular <i>in vivo</i> por parte de células del trazado de <i>B195AP^{Cre}; R26YFP</i> cultivadas en suspensión hasta los 7 días.	175
Figura 6.40. Contribución de las células derivadas de la médula ósea al PC y a los cultivos en adhesión resultantes.	177
Figura 6.41. Caracterización de la capacidad regenerativa del PC en homeostasis y frente a daño a nivel histológico.	180
Figura 6.42. Contribución de las células satélite y su progenie al lecho de la herida durante la cicatrización a nivel histológico.	182
Figura 6.43. Presencia de fibras regenerativas <i>de novo</i> en el PC tras la herida.	183
Figura 6.44. Estudio de la morfología y estado regenerativo de las fibras del músculo cremáster.	185
Figura 6.45. Análisis del tipo de fibras del músculo cremáster por inmunofluorescencia.	186
Figura 6.46. Estudio de las células satélite y del nivel de renovación del tejido cremáster por inmunofluorescencia.	188
Figura 6.47. Esquema del protocolo de cultivo <i>in vitro</i> aplicado y descripción del cultivo de células humanas obtenido en las distintas fases del procedimiento.	189
Figura 6.48. Expresión de proteínas miogénicas durante el cultivo de células derivadas de cremáster detectadas por inmunofluorescencia.	191
Figura 6.49. Cuantificación de la expresión de determinados genes miogénicos por RT-qPCR en cultivos adherentes de células humanas a los 9 días.	192
Figura 6.50. Contribución <i>in vivo</i> a la regeneración muscular por parte de células humanas derivadas de cremáster cultivadas en suspensión hasta los 7 días.	195
Figura 10.1. Diseño de la placa 1 del BD Lyoplate™.	250
Figura 10.2. Diseño de la placa 2 del BD Lyoplate™.	250
Figura 10.3. Diseño de la placa 3 del BD Lyoplate™.	251
Figura 10.4. Tinciones para la detección de la fosfatasa alcalina y la β -gal en muestras procedentes de ratones control.	258
Figura 10.5. Controles negativos empleados en las inmunofluorescencias.	258
Figura 10.6. Controles aportados para los análisis por citometría de flujo.	259

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

1 ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ΔRn	Señal de fondo en una RT-qPCR (fluorescencia del reportero/fluorescencia de la referencia)
αPROTEÍNA	antiPROTEÍNA
α-SMA	α actina de músculo liso (<i>α-smooth muscle actin</i>)
β-gal	β -galactosidasa
μM	Micromolar
μm	Micrometro
5-aza	5-Azacidina
7-AAD	Aminoactinomicina D 7 (<i>7-Aminoactinomycin D</i>)
$[Ca^{2+}]_c$	Ión calcio citosólico
$^{\circ}C$	Grado Celsius
A260	Absorbancia a 260 nanometros
A280	Absorbancia a 280 nanometros
ACh	Acetilcolina (<i>Acetylcholine</i>)
AdipoQ	Adiponectina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AP	Fosfatasa alcalina (<i>Alkaline phosphatase</i>)
APC	Aloficocianina (<i>Allophycocyanin</i>)
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
BAC	Cromosoma artificial bacteriano (<i>Bacterial artificial chromosome</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
Ca^{2+}	Ión calcio
$CaCl_2$	Cloruro de calcio
CalcR	Receptor de calcitonina (<i>Calcitonin receptor</i>)
cGy	Centigray
C-Met	Receptor del factor de crecimiento hepático
CO_2	Dióxido de carbono
C_q	Ciclo de cuantificación (<i>Quantification cycle</i>), término estandarizado del ciclo umbral (<i>threshold cycle</i>)
CTX	Cardiotoxina
Cxcr4	Receptor quimiocina de motivo C-X-C tipo 4 (<i>C-X-C Motif chemokine receptor 4</i>)
DETA	N-1 [3-(trimetoxisilil)propil] dietilentriamina
DM	Distrofias musculares
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DMSO	Dimetil sulfóxido
d.p.c.	Días post coito (<i>Dies post coitum</i>)

DsRed	Proteína roja fluorescente (<i>Red fluorescent protein</i>)
DTA	Toxina diftérica A (<i>Diphtheria toxin A</i>)
dTC	d-tubocurarina
E	Módulo de Young o módulo de elasticidad longitudinal
E#	Día embrionario (<i>Embryonic day</i>)
ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular matrix</i>)
EDL	Músculo extensor largo de los dedos (<i>Musculus extensor digitorum longus</i>)
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal growth factor</i>)
EGFP	Proteína verde fluorescente potenciada (<i>Enhanced green fluorescent protein</i>)
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetraacético (<i>Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>)
et al.	Y colaboradores (<i>et alii</i>)
EYFP	Proteína amarilla fluorescente potenciada (<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>)
FABP4	Proteína de unión 4 a ácidos grasos (<i>Fatty acid binding protein 4</i>)
FAPs	Progenitores fibro/adipogénicos (<i>Fibro/adipogenic progenitors</i>)
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
FGF2	Factor 2 de crecimiento fibroblástico (<i>Fibroblast growth factor-2</i>)
FSC	Detector de dispersión frontal (<i>Forward Scatter</i>)
Fzd7	Receptor 7 de clase frizzled (<i>Frizzled class receptor 7</i>)
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GEO	Base de datos de expresión génica (<i>Gene Expression Omnibus</i>)
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
GO	Ontología génica (<i>Gene Ontology</i>)
GSEA	Análisis de enriquecimiento en grupos de genes (<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>)
Gy	Gray
H₂O	Dihidruro de oxígeno, agua
HBSS	Solución salina tamponada de Hank (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)
HCl	Ácido clorhídrico
HGF	Factor de crecimiento hepático (<i>Hepatocyte growth factor</i>)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etano-sulfónico (<i>4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
Hz	Hercio
I_{ACh}	Corriente provocada por acetilcolina
IFR	Intensidad de fluorescencia relativa
IgG	Inmunoglobulina G
K⁺	Ión de potasio

KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohercio
KOH	Hidróxido de potasio
kPa	Kilopascal
LSGS	Suplemento de crecimiento bajo en suero (<i>Low serum growth supplement</i>)
M	Molar
MΩ	Megaohmio
mA	Miliamperio
MAP2	Proteína 2 asociada a microtubulos (<i>Microtubule-associated protein 2</i>)
Mg²⁺	Ión magnesio
Mg-ATP	Sal magnesio adenosín trifosfato (
MgCl₂	Cloruro de magnesio
mM	Milimolar
MRFs	Factores reguladores miogénicos (<i>Myogenic regulatory factors</i>)
Mrf4	Factor regulador 4 específico de músculo (<i>Muscle-specific regulatory factor 4</i>)
MSigDB	Base de datos de firmas moleculares (<i>Molecular signatures data base</i>)
MV	Megavoltio
mV	Milivoltio
Myf5	Factor 5 miogénico (<i>Myogenic factor 5</i>)
MyH2	Cadena pesada de miosina de fibras adultas (<i>Adult myosin heavy chain</i>)
MyH3	Cadena pesada de miosina de fibras embrionarias (<i>Embryonic myosin heavy chain</i>)
MyHC	Cadena pesada de miosina (<i>Myosin heavy chain</i>)
MyoD1	Proteína 1 de diferenciación miogénica (<i>Myogenic differentiation protein 1</i>)
Na⁺	Ión sodio
nA	Nanoamperio
NaCl	Cloruro de sodio
Na-GTP	Sal sodio hidratado guanosín trifosfato
NaN₃	Azida de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
N-CAM	Molécula 1 de adhesión celular neural (<i>Neural cell adhesion molecule 1</i>)
nm	Nanometro
nmol	Nanomol
ON	Toda la noche (<i>Overnight</i>)
p57	Inhibidor cinasa 1C dependiente de ciclina (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>)
P#	Días postnatales
pA	Picoamperio
Pax3	Factor de transcripción 3 de caja emparejada (<i>Paired box transcriptional factor 3</i>)

Pax7	Factor de transcripción 7 de caja emparejada (<i>Paired box transcriptional factor 7</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBSMg	PBS 1X suplementado con cloruro de magnesio 2 mM
PC	Panículo carnoso (<i>Panniculus carnosus</i>)
PC1, 2, 3...	Primer, segundo, tercero... componente principal (<i>Principal component one...</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal component analysis</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDGFRα	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet-derived growth factor receptor A</i>)
PEG	Polietilengicol
PFA	Paraformaldehído
PICs	Células intersticiales PW1 positivas (<i>PW1 positive interstitial cells</i>)
PLO	Poli-L-ornitina
PPARγ	Receptor gamma activado por el factor proliferador de perosixoma (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>)
Prdm16	Dominio PR que contiene la proteína 16 (<i>PR domain containing protein 16</i>)
P/S	Penicilina/Estreptomicina
Q_{ACh}	Carga provocada por acetilcolina
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RFP	Proteína roja fluorescente (<i>Red fluorescent protein</i>)
RMA	Algoritmo robusto promedio de <i>multi-array</i> (<i>Robust multi-array average</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
rrEGF	Factor de crecimiento epidérmico recombinante de rata (<i>Recombinant rat epidermal growth factor</i>)
rrFGF2	Factor 2 de crecimiento fibroblástico recombinante de rata (<i>Recombinant rat fibroblast growth factor 2</i>)
RS	Retículo sarcoplásmico
RT	Temperatura ambiente (<i>Room temperature</i>)
RT-PCR	PCR de transcripción reversa (<i>Reverse-transcription PCR</i>)
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real (<i>Real time quantitative PCR</i>)
RyR1	Receptor de rianodina de músculo esquelético (<i>Skeletal muscle-type ryanodine receptor</i>)
RyR2	Receptor de rianodina de músculo cardíaco (<i>Cardiac muscle-type ryanodine receptor</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sodio (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
SEM	Error estándar de la media
SERCA-1	ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico de tipo 1 (<i>Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1</i>)
SKPs	Precusores derivados de la piel (<i>Skin-derived precursors</i>)
TA	Músculo tibial anterior (<i>Musculus tibialis anterior</i>)
TBP	Proteína de unión a TATA (<i>TATA box binding protein</i>)
TBS	Tampón tris salino (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBST	Tampón tris salino con Tween [®] 20 (<i>Tris-buffered saline with Tween[®]20</i>)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)

MET	Microscopía electrónica de transmisión
TEMED	Tetrametil etileno diamine
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TMX	Tamoxifeno
TTX	Tetrodotoxina
UAIF	Unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia
V	Voltio
V-CAM	Proteína 1 de adhesión celular vascular (<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>)
WT	Cepa silvestre (<i>Wild type</i>)

RESUMEN

2 RESUMEN

El estudio de la miogénesis adulta en humanos está limitado por la escasez de material biológico. En los últimos años, como consecuencia del desarrollo de los sistemas de diagnóstico molecular, se han reducido en gran medida el número de biopsias musculares que se realizan a pacientes con patología muscular con fines diagnósticos. En consecuencia, se han seguido diversas estrategias para poder disponer de modelos biológicos humanos adecuados y poder estudiar la miogénesis *in vitro* a nivel celular. En este contexto, la piel se ha propuesto como un tejido alternativo tanto para el estudio de la miogénesis como para diversas aplicaciones tanto diagnósticas como terapéuticas.

En este trabajo se ha identificado la célula precursora miogénica de la piel dorsal de ratón como la célula satélite del panículo carnoso (PC) mediante el uso de ratones transgénicos. Asimismo, se ha establecido un protocolo de cultivo optimizado, aplicable también a muestras de músculo esquelético, para la expansión y diferenciación de las células satélite y su progenie. Se ha demostrado que esta población celular es responsable de prácticamente todo el potencial miogénico que alberga este tejido, no habiéndose observado contribución relevante por parte de otras poblaciones celulares a la miogénesis *in vitro*. Además de haber medido la capacidad miogénica de estas células *in vitro*, también se ha evaluado su potencial regenerativo en un ensayo *in vivo*. Adicionalmente, se ha profundizado en el estudio del papel fisiológico del PC evaluando su posible contribución a distintos procesos biológicos como el injerto de células derivadas de la médula ósea trasplantada o el proceso de cicatrización de una herida cutánea. Por otro lado, se han intentado extrapolar estos resultados al humano, partiendo del músculo cremáster, considerado como un posible músculo remanente del PC y un tejido relativamente accesible. Basándose en el mismo protocolo de cultivo se ha conseguido expandir y diferenciar los precursores miogénicos del cremáster humano *in vitro*. Por último, se ha realizado un primer ensayo *in vivo* en ratones donde se ha evaluado positivamente la funcionalidad de estas células a la hora de regenerar el tejido muscular.

INTRODUCCIÓN

3 INTRODUCCIÓN

3.1 El tejido muscular

El tejido muscular está constituido por células especializadas capaces de convertir la energía química en energía mecánica. Generan los movimientos del cuerpo, siendo responsables tanto de los movimientos de órganos internos como de los movimientos del esqueleto asociados a la locomoción. El tejido muscular se subdivide en tres tipos de músculos, de acuerdo con las características de sus células y dependiendo de cómo se controlan: el cardíaco (estriado e involuntario), el liso (no estriado e involuntario) y el esquelético (estriado y voluntario) (Paniagua *et al.*, 2007; Standring, 2016). Este último tipo de músculo será el de referencia en este trabajo.

3.1.1 El músculo esquelético

El músculo esquelético es una forma de tejido muscular estriado que se encuentra mayoritariamente unido a huesos, a cartílagos o a un órgano a través de tendones, y que supone aproximadamente el 40% del peso total del cuerpo (Frontera and Ochala, 2015). Las principales funciones de los músculos esqueléticos son dar estabilidad y mantener la postura corporal, permitir el movimiento, ayudar a regular la temperatura del organismo produciendo calor, contribuir al metabolismo almacenando sustratos importantes como amino ácidos y carbohidratos, y participar en el control voluntario del sistema excretor digestivo y urinario a través del esfínter anal y uretral (Frontera and Ochala, 2015; Standring, 2016).

En general, el músculo esquelético presenta una organización estructural bien definida (**Figura 3.1**). Todos los músculos esqueléticos están compuestos por numerosos paquetes de fibras cilíndricas, alargadas y multinucleadas que se encuentran separadas en fascículos. Estas fibras a su vez están compuestas por miofibrillas formadas por filamentos gruesos de miosina (14 nm diámetro) y de filamentos delgados de actina (6 nm diámetro) junto con otras proteínas asociadas como la titina o la distrofina. Estos filamentos se superponen entre sí de manera organizada formando un patrón específico repetitivo de bandas transversales. Las denominadas bandas I contienen solo filamentos de actina (unos 0,4 μm de longitud en el músculo relajado) y las bandas A contienen filamentos de miosina y los extremos de los filamentos de actina que se superponen con las de miosina (unos 1,6 μm de longitud). Las bandas I se dividen en dos porciones iguales por la

línea Z y las bandas A por la banda H, que a su vez muestra en su parte central la línea M. La estructura comprendida entre dos líneas Z consecutivas se denomina sarcómero (unos 2,4 μm de longitud), la unidad contráctil básica (Paniagua *et al.*, 2007).

Las fibras musculares se pueden clasificar en base a distintos criterios, pero el más comúnmente utilizado para los músculos de las extremidades tiene en cuenta la expresión de isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC). Así, se diferencian fibras de tipo I que expresan la isoforma MyHC1 β (fibras de contracción lenta, con metabolismo oxidativo y resistentes a fatiga), de tipo IIa que expresan MyHCIIa (son de contracción rápida, con metabolismo oxidativo o glicolítico y susceptibles a fatiga), de tipo IIx/d que expresan MyHCIIx o MyHCIIId (son algo más rápidas, glicolíticas y susceptibles a fatiga), y de tipo IIb que expresan MyHCIIb (son las de contracción más rápida, glicolíticas, muy susceptibles a fatiga y que están presentes en roedores, marsupiales, cerdo y llama) (Pette and Staron, 2000; Graziotti, Ríos and Rivero, 2001; Scott, Stevens and Binder-Macleod, 2001; Kaasik *et al.*, 2012). Un músculo dado o incluso una única fibra muscular puede expresar de manera simultánea más de un tipo de cadena pesada de miosina (Frontera and Ochala, 2015).

Las miofibrillas se encuentran yuxtapuestas y empaquetadas en el citoplasma de la fibra muscular, llamado sarcoplasma, rodeadas de diversos orgánulos. Uno de los componentes especializados que rodean a estas miofibrillas es el retículo endoplasmático liso, aquí llamado retículo sarcoplásmico (RS), que es muy extenso y adquiere una disposición determinada de acuerdo con su función que es crucial para la contracción muscular como se explicará más adelante. En el sarcoplasma se encuentran además gran cantidad de mitocondrias, que se organizan en hilera, orientadas longitudinalmente y de forma paralela a las miofibrillas, localizándose entre ellas y en la periferia de la fibra. También abundan partículas de glucógeno y en menor proporción inclusiones lipídicas, el retículo endoplasmático rugoso, ribosomas, uno o varios complejos de Golgi poco desarrollados y algunos lisosomas. Además de estos orgánulos, cada fibra contiene numerosos núcleos que derivan de la fusión de células musculares mononucleadas, los mioblastos. Al formar el sincitio, los núcleos se posicionan en la periferia de las fibras y se vuelven mitóticamente inactivos cuando la fibra madura (Paniagua *et al.*, 2007; Abmayr and Pavlath, 2012; Cadot *et al.*, 2012; Metzger *et al.*, 2012; Falcone *et al.*, 2014; Hall, 2016).

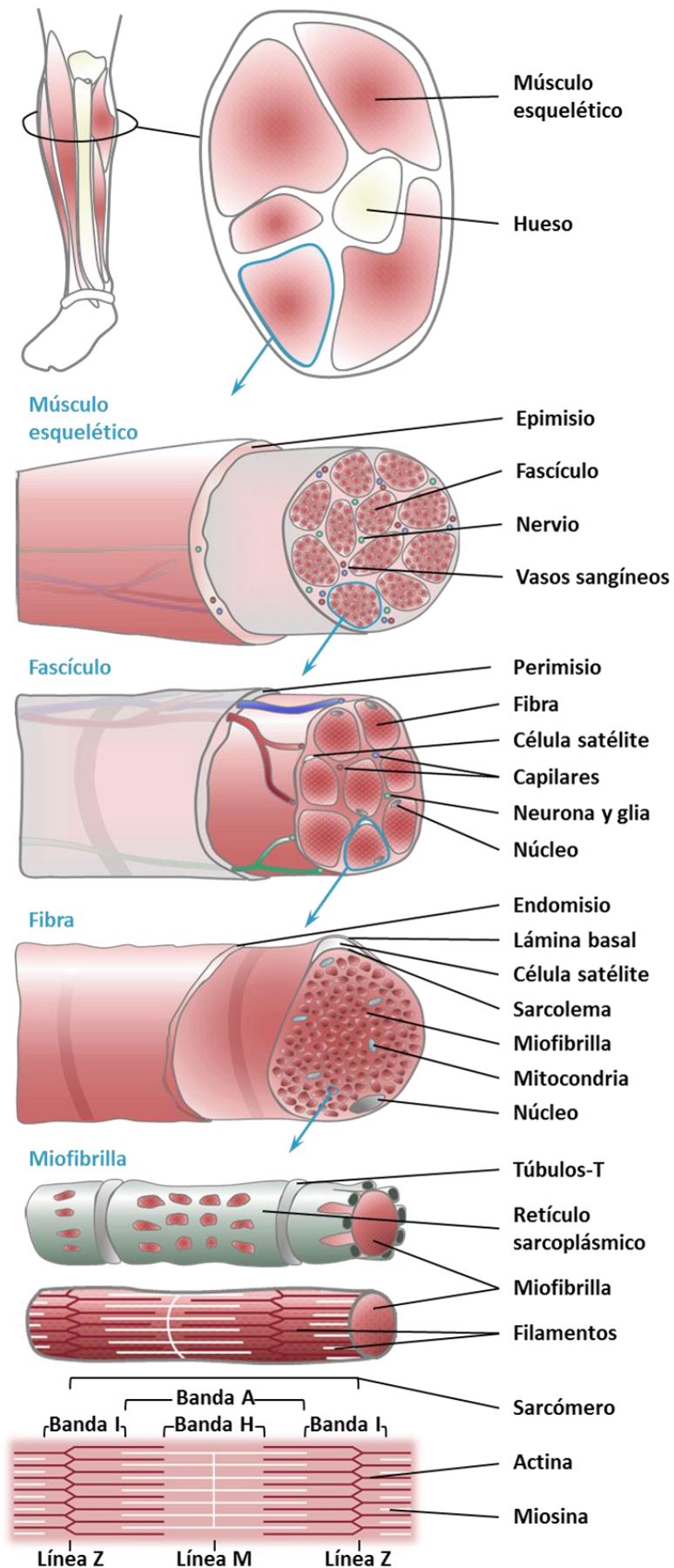


Figura 3.1. Estructura del músculo esquelético desde el nivel macroscópico hasta el microscópico.

El tejido conectivo de sostén de los órganos, también presente en el músculo esquelético, está compuesto mayoritariamente por un entramado de fibras proteicas insolubles (glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos) que son secretados por las propias células del tejido conjuntivo y que forman la matriz extracelular (ECM). Específicamente, estas fibras insolubles están compuestas por dos tipos de proteínas, colágenos y elastina; dentro de las glicoproteínas se incluyen glicoproteínas de adhesión como la laminina, la fibronectina, la tenascina y la vitronectina; y entre el grupo de proteoglicanos y glicosaminoglicanos destaca el ácido hialurónico, el único que no tiene un cuerpo proteico y que se encuentra altamente hidratado. Este espacio intercelular puede completarse de innumerables formas combinando las distintas macromoléculas y variando su organización, resultando en una gran diversidad de matrices extracelulares adaptadas a los requerimientos funcionales de cada tejido. Los componentes locales de la ECM determinan las propiedades morfofisiológicas del tejido conjuntivo que a su vez es el almacén del órgano. Los músculos esqueléticos se encuentran insertados en la fascia del sistema locomotor mediante tendones y ligamentos compuestos de tejido conjuntivo denso. Por otro lado, contienen un tejido conjuntivo intramuscular que forma las vainas conjuntivas de recubrimiento: cada músculo individual es recubierto por una primera capa llamada epimisio que consta principalmente de colágeno de tipo I y que engloba dentro de sí a otras estructuras y células próximas como los fibroblastos, pericitos, adipocitos, vasos sanguíneos y nervios. El perimisio es la vaina conjuntiva que contiene colágenos de tipo I y de tipo III y envuelve a cada fascículo de fibras, y por último, el endomisio que se compone de colágenos de tipo III y de tipo IV rodea a cada fibra. Esta última capa está asociada con la membrana basal y con la membrana celular de cada fibra muscular. Esta membrana celular llamada sarcolema, cuya función y composición bioquímica es similar a la de la membrana plasmática, separa cada fibra individual de su entorno y es clave en el acoplamiento de excitación y contracción (Turrina, Martínez-González and Stecco, 2013; Standring, 2016).

En respuesta a una señal procedente de la corteza motora, se genera un impulso nervioso en el sistema nervioso central que se propaga hasta alcanzar las uniones neuromusculares. En esta sinapsis, el potencial de acción de la neurona motora causa un influjo de Ca^{2+} en los axones y esto a su vez la liberación del neurotransmisor acetilcolina (ACh), que se une a receptores de ACh nicotínicos localizados en la fibra, que son canales iónicos activados por ACh. Esta unión causa la apertura de estos canales permitiendo la entrada de Na^+ y K^+ al interior de la célula que resulta en un cambio de distribución de las cargas eléctricas, lo que genera una despolarización de la

membrana. Esto supone un cambio en el potencial de membrana, que se traduce en un potencial de acción que se propaga a lo largo del sarcolema. Para acelerar este transporte del potencial de acción, el sarcolema forma unas estructuras especiales, unas invaginaciones tubulares transversales llamadas túbulos-T que recorren el músculo de lado a lado. Los túbulos-T están en contacto directo con el RS, cada tubo está rodeado por dos cisternas terminales de RS formando así las llamadas tríadas. De modo que el potencial eléctrico llega a los túbulos-T y activa los receptores dihidropiridínicos sensibles a cambios de voltaje, que son canales de calcio de tipo L, y que interaccionan físicamente con los receptores de rianodina del RS causando su apertura. A través de este canal abierto, los iones de calcio almacenados en el RS son expulsados hacia el sarcoplasma, donde interaccionan con las proteínas contráctiles generando finalmente un desplazamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos, que produce un acortamiento del sarcómero, es decir, la contracción del músculo. Algunos milisegundos después de la liberación de ACh, esta es destruida por la enzima acetilcolinesterasa que se encuentra en el espacio sináptico, y una vez el potencial de acción ha cesado y es necesario relajar el músculo, los iones de calcio citoplasmático retornan al RS a través de la ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico (SERCA-1) reestableciendo las condiciones basales (Paniagua *et al.*, 2007; Hall, 2016).

El músculo esquelético necesita de un sistema que active este proceso de contracción, así como un sistema de alimentación y de eliminación de desechos. Así, el músculo esquelético tiene un suministro nervioso y vascular que siguen los componentes del tejido conjuntivo dentro de un haz neuro-vascular. El epimisio lleva nervios y vasos sanguíneos de gran calibre y alberga los husos neuromusculares. Generalmente, una arteria y al menos una vena acompañan a cada nervio que penetra el epimisio para luego ramificarse en capilares y en grupos de nervios que se encuentran integrados en el tejido. Como el diámetro de cada fibra muscular es variable, los capilares presentan una distribución no uniforme alrededor de ellos, pero se encuentran interconectados para repartir el oxígeno de la manera más difusa posible. Como músculos voluntarios, los músculos esqueléticos son controlados por una red de neuronas motoras que inervan las fibras musculares formando uniones neuromusculares, pero también contienen componentes sensoriales. La unidad funcional de una única motoneurona cuyas ramificaciones axónicas inervan varias fibras constituye una unidad motora y varios cientos de ellas controlan cada músculo esquelético. En cuanto a la red linfática, los capilares linfáticos se extienden solamente hasta el perimisio y convergen en vasos mayores para el drenaje de los músculos esqueléticos (Korthuis, 2011; Standring, 2016).

Dentro de este complejo entramado de haces de fibras, vasos y nervios se encuentran las células madre específicas del músculo, que se denominan células satélite (Mauro, 1961). En concreto se localizan en la periferia de las fibras musculares en una área específica delimitada por la lámina basal y el sarcolema, lo que se conoce como el nicho de las células satélite. La naturaleza de estas células y su propia definición están esencialmente ligadas a su característica localización anatómica, tal y como fueron descritas inicialmente. Sin embargo, el nicho de las células satélite abarca mucho más que un simple compartimento estructural, ya que integra todas las interacciones dinámicas que suceden entre las células satélite, la ECM, las diferentes células circundantes, la red vascular y neuronal y las numerosas moléculas solubles. Estas interacciones regulan el comportamiento de estas células madre ajustando continuamente su estado para hacer frente a las necesidades del tejido (Thomas, Engler and Meyer, 2015).

Las células satélite, como células madre adultas, son las principales responsables del crecimiento postnatal del músculo y también de la regeneración del tejido muscular tras un daño. Se estima que de entre todos los núcleos presentes en las fibras musculares, entre un 3-11% de las células corresponden a células satélite (Schmalbruch, 1976, 1977, 1985, 2006). Se diferencian del resto de los núcleos de la fibra porque estas células, a diferencia del sincitio muscular, son mononucleadas, no expresan ninguna proteína de tipo miofilamento y se mantienen en un estado quiescente en condiciones fisiológicas activándose cuando reciben una señalización que indica daño muscular. Como cabe esperar, las células satélite quiescentes y activadas no expresan el mismo tipo de proteínas de membrana y factores de transcripción específicos, aunque algunos de ellos son comunes a ambos estados. En un momento dado es improbable que todos los marcadores descritos se expresen a la vez en una célula satélite, encontrándose patrones de expresión diversos en una población heterogénea de células madre (**Tabla 3.1**) (Boldrin, Muntoni and Morgan, 2010; Tedesco *et al.*, 2010; Yin, Price and Rudnicki, 2013; Dumont, Wang and Rudnicki, 2015). Por otro lado, no existe una completa correlación de estos marcadores entre las células satélite humanas y las de ratón (Boldrin, Muntoni and Morgan, 2010). Las células satélite humanas expresan Pax7 (Reimann *et al.*, 2004), M-Cadherin (Sajko *et al.*, 2004), CD82, CD318 (Uezumi *et al.*, 2016) y N-CAM (Schubert *et al.*, 1989), siendo este último el marcador más relevante y ampliamente utilizado a pesar de no ser un marcador exclusivo de esta población (Illa, León-Monzón and Dalakas, 1992), y no expresan el marcador CD34 descrito en las células satélite de ratón (Péault *et al.*, 2007).

Marcadores de células satélite quiescentes				Marcadores de células satélite activadas			
Nucleares	Superficiales			Nucleares	Superficiales		
Pax7	α 7-integrina	Syndecan 3/4	Desmina	Pax7	α 7-integrina	Syndecan 3/4	Desmina
Pax3	β 1-integrina	Fzd7	C-Met	Myf5	β 1-integrina	Fzd7	C-Met
Myf5	V-CAM	Caveolina 1	Nestina	MyoD1	V-CAM	Caveolina 1	Nestina
	N-CAM	CD34	Cxcr4		N-CAM	CD34	Jagged 1
	M-Cadherina	CalcR			M-Cadherina	CalcR	

Tabla 3.1. Marcadores moleculares de las células satélite quiescentes y activadas de ratón. Se enumeran los nombres más comúnmente utilizados.

Además de las células satélite, el músculo esquelético contiene otras poblaciones celulares residentes en el tejido intersticial, tales como los mesoangioblastos y los pericitos, que se describen como células asociadas a los vasos sanguíneos grandes y pequeños respectivamente, células intersticiales que expresan PW1 (PICs), los progenitores mesenquimales también denominados como progenitores fibro/adipogénicos (FAPs), células CD133 positivas, la *side population*, células mioendoteliales, células mieloides residentes, células endoteliales y fibroblastos. El papel fisiológico de estas poblaciones celulares en el músculo adulto está aún por dilucidar, pero hay evidencias de que contribuyen o modulan la regeneración muscular que sucede en respuesta a una lesión, proceso que se detallará más adelante (Tedesco, Moyle and Perdiguero, 2017).

3.1.1.1 Desarrollo embrionario del músculo esquelético

Durante la embriogénesis, el músculo esquelético se forma a partir del mesodermo presomítico paraxial. Concretamente, los músculos esqueléticos del tronco y de las extremidades así como la dermis dorsal, la grasa parda y otras estructuras se desarrollan a partir del dermomiótomo, estructura definida como la parte dorsal de los somitas, segmentos a su vez del mesodermo presomítico paraxial formados a cada lado del eje del cuerpo del embrión (**Figura 3.2**) (Christ and Ordahl, 1995; Buckingham and Rigby, 2014). El dermomiótomo contiene células progenitoras multipotentes que eventualmente dan lugar a diversos tipos celulares y tejidos adultos determinados por su localización adyacente a tejidos como la notocorda, el tubo neural, el ectodermo y el miótomo (Buckingham and Relaix, 2007). Asimismo, las células satélite adultas se originan de esta misma estructura, del dermomiótomo (Seale and Rudnicki, 2000; Gros *et al.*, 2005; Kassari-Duchossoy, 2005; Relaix *et al.*, 2005).

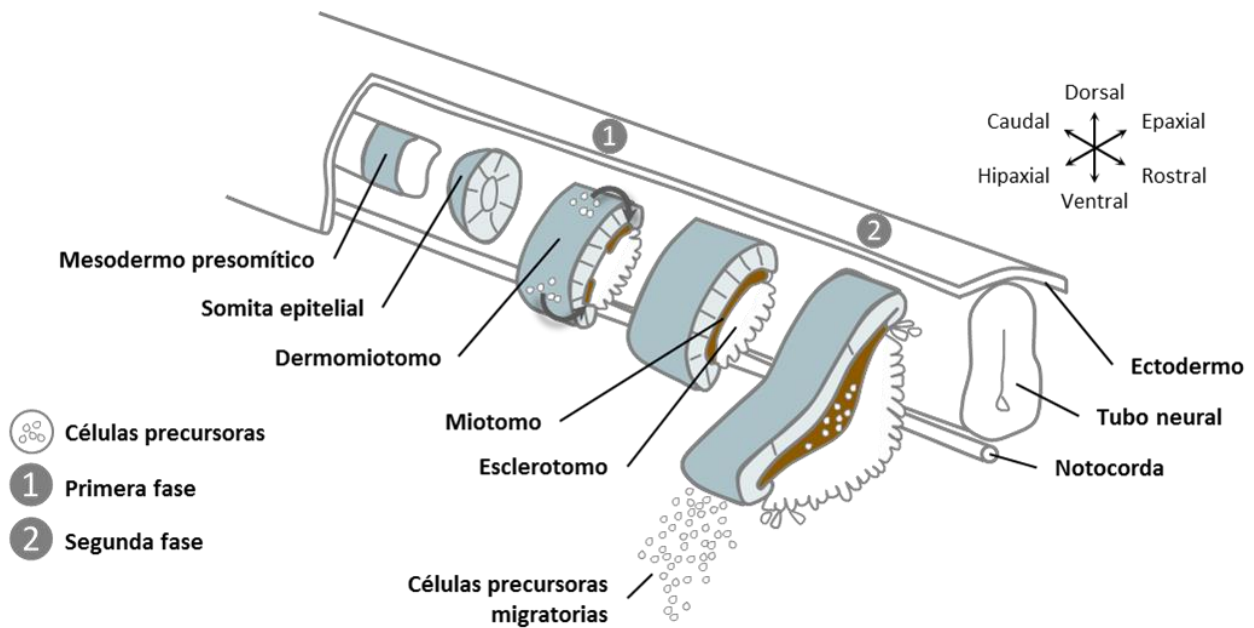


Figura 3.2. Desarrollo embrionario de los músculos esqueléticos del tronco y de las extremidades. Se destacan las dos fases consecutivas que se suceden donde las células precursoras forman primero el miótomo y después los músculos embrionarios.

En cuanto a la regulación molecular de la miogénesis, los factores de transcripción Pax3 y Pax7, a pesar de no ser específicos de tejido, son importantes reguladores de la miogénesis que actúan sobre los factores reguladores miogénicos (MRFs) Myf5, MyoD1, Miogenina y Mrf4, responsables de la inducción y del mantenimiento del programa miogénico (Buckingham and Relaix, 2007). Pax3 se expresa en el mesodermo presomítico y en los somitas epiteliales tempranos, y Pax7 se induce durante la maduración de los somitas (Jostes, Walther and Gruss, 1991; Goulding, Lumsden and Paquette, 1994; Williams and Ordahl, 1994). No obstante, se ha llegado a detectar también expresión de Myf5, aunque a bajo nivel, en el mesodermo presomítico, pero se desconoce la relevancia que pueda tener esta baja expresión en el desarrollo miogénico (Kopan, Nye and Weintraub, 1994; Cossu, Tajbakhsh and Buckingham, 1996; Kiefer and Hauschka, 2001).

Una vez que se ha completado la formación secuencial de los somitas y se ha definido la estructura del dermomiótomo, el desarrollo del músculo esquelético embrionario continúa con dos fases consecutivas (**Figura 3.2**). Inicialmente, una población de células precursoras que expresan los genes reguladores miogénicos Myf5 y Mrf4 migran desde la región lateral del dermomiótomo hacia su interior y van expresando progresivamente el resto de los factores miogénicos hasta formar el miótomo (primera masa muscular), de donde derivarán el resto de los músculos embrionarios, fetales y adultos del tronco. Seguidamente, la parte central del dermomiótomo experimenta una

transición epitelio-mesénquima y se libera una oleada de precursores migratorios que se diferenciarán a diferentes tipos celulares. Entre ellos se encuentran precursores miogénicos que expresan los factores de transcripción Pax3 y Pax7 que migran hacia la región central incorporándose en el miotomo. Estos precursores son los que más adelante activarán los genes Myf5 y MyoD1 y contribuirán a la formación de los músculos esqueléticos del tronco embrionarios y fetales a través de la subsiguiente expresión de Miogenina y Mrf4, pero algunos de ellos se mantendrán en un estado proliferativo convirtiéndose en una población reserva de precursores miogénicos a lo largo del desarrollo hasta la fase postnatal, cuando se les conocerá como células satélite. A la vez, otro grupo de progenitores que expresan el factor de transcripción Pax3 migra hacia las extremidades donde la expresión de Pax7 especificará a algunos de ellos hacia un linaje miogénico, y de forma similar a como sucede en el tronco, se irán formando los músculos de las extremidades dejando una población de precursores en estado proliferativo como futuras células madre adultas musculares (Yin, Price and Rudnicki, 2013; Buckingham and Rigby, 2014; Musarò, 2014).

Las contribuciones específicas de los MRFs durante el desarrollo muscular en su orden aproximado de aparición son las siguientes (**Figura 3.3**): Myf5 y MyoD1 son los factores clave para la determinación del linaje miogénico de las células multipotenciales de los somitas, Myf5 regula la especificación de los progenitores y MyoD1 cumple funciones en la diferenciación posterior; Miogenina tiene un papel crítico en la fusión y diferenciación terminal de los mioblastos; y Mrf4 tiene funciones tanto en la determinación como en la diferenciación terminal (Rudnicki *et al.*, 1993; Kassam-Duchossoy, 2005; Tapscott, 2005).

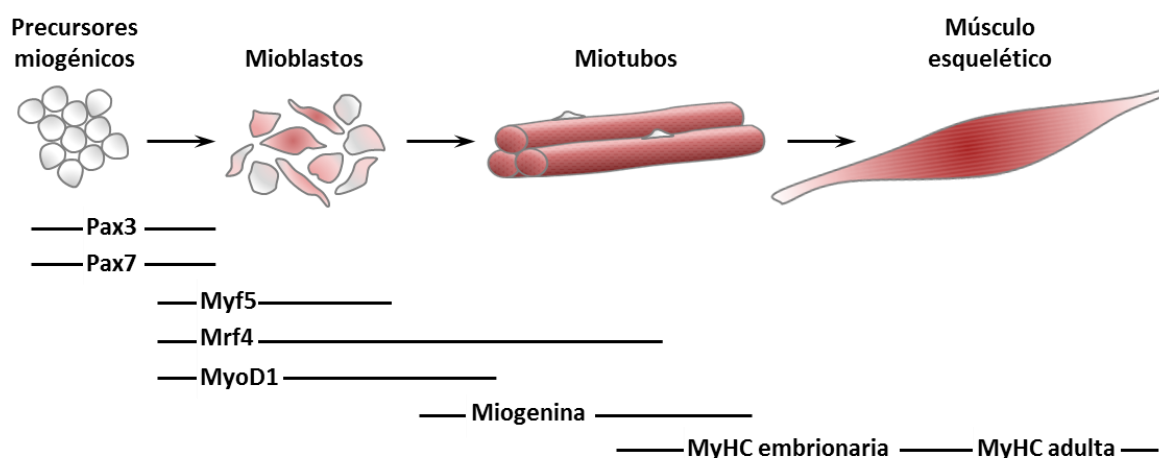
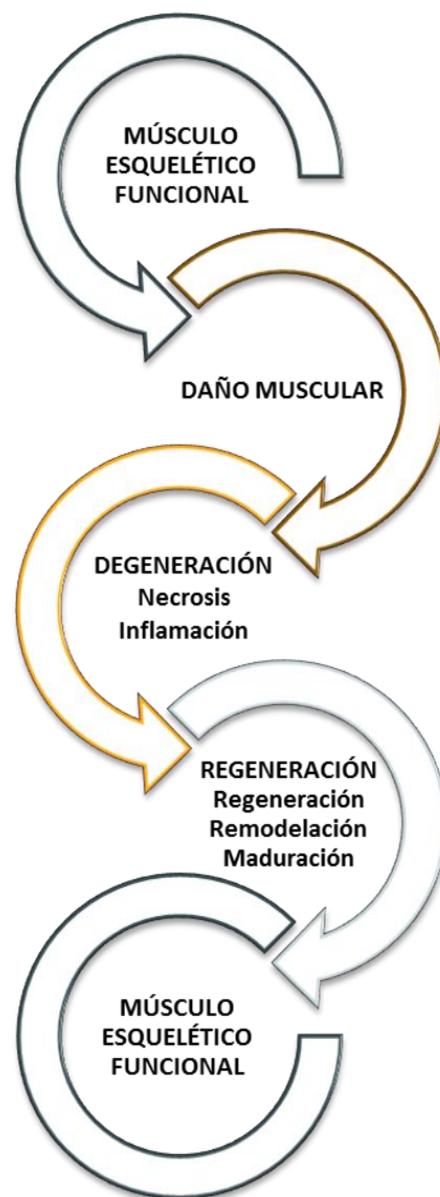


Figura 3.3. Programa miogénico que regula la determinación miogénica y la formación de músculo esquelético. La expresión de los diversos factores de transcripción y de las proteínas específicas sucede de manera secuencial, pero solapándose entre sí.

3.1.1.2 Proceso de regeneración del músculo esquelético

El músculo esquelético presenta una gran capacidad para mantener la homeostasis y para regenerar el propio tejido, ya sea debido a microtraumatismos derivados de la actividad física o a daños más graves debidos a diversas causas como traumatismos o defectos genéticos (Yin, Price and Rudnicki, 2013). La reparación del músculo esquelético adulto es un proceso complejo y altamente sincronizado que comienza con la necrosis de las fibras dañadas y termina con la formación de nuevas fibras musculares funcionales, además de un fragmento de tejido cicatricial en el caso de que el daño haya causado una pérdida volumétrica considerable (Turner and Badylak, 2012). Durante este proceso convergen varias respuestas celulares y moleculares que podrían dividirse en dos fases interdependientes: la degeneración y la regeneración (**Figura 3.4**). Es crucial que se mantenga un equilibrio apropiado entre estas fases para conseguir un resultado óptimo beneficioso, esto es, la sustitución de las fibras musculares dañadas por las sanas y la reconstrucción funcional del aparato contráctil, frente a la presencia de una inflamación persistente y la formación de tejido cicatricial (Douglas *et al.*, 2002; Prisk and Huard, 2003; Chargé and Rudnicki, 2004; Mourkioti and Rosenthal, 2005).

Figura 3.4. Esquema donde se resúmen los procesos biológicos que se desencadenan tras un daño en el músculo esquelético para recuperar la funcionalidad del tejido.



La primera fase de degeneración comienza con una rápida necrosis de las fibras dañadas en las que el sarcolema pierde su integridad aumentando la permeabilidad de la fibra y liberando compuestos citosólicos como la creatina quinasa y el miR133-a al plasma (Angelini, Di Mauro and Margreth, 1968; Zatz *et al.*, 1991; Sorichter *et al.*, 2001; Laterza *et al.*, 2009). A su vez, se da un incremento de la salida de calcio del RS relacionado con la proteólisis dependiente de calcio

(Alderton and Steinhardt, 2000), la rotura de las proteínas contráctiles y la degradación de los orgánulos celulares. Todo ello conducirá a la activación de la cascada del complemento y de una respuesta inflamatoria (Orimo *et al.*, 1991; Musarò, 2014). Los neutrófilos son las primeras células inflamatorias atraídas por quimiotaxis a la zona muscular dañada seguidas de los monocitos y de la infiltración secuencial predominante de dos subpoblaciones de macrófagos, aunque es probable que estos subtipos reflejen diferentes estados celulares de una misma población celular (Fielding *et al.*, 1993; Tidball, 1995, 2005, Chazaud *et al.*, 2003, 2009; Martinez and Gordon, 2014). El primer subtipo llamado M1 y caracterizado por la expresión del marcador CD68, es responsable de la fagocitosis de los restos celulares y secreta citoquinas pro-inflamatorias, mientras que el segundo y más tardío subtipo llamado M2 caracterizado por el marcador CD163 está relacionado con la supresión de la respuesta inmune, secreta citoquinas anti-inflamatorias y además, activa y promueve la proliferación de las células satélite, dando paso así a la segunda fase de regeneración (St Pierre and Tidball, 1994; Lescaudron *et al.*, 1999; Merly *et al.*, 1999; Cantini *et al.*, 2002; Mantonavi *et al.*, 2004; Sonnet *et al.*, 2006).

El peso de la regeneración muscular recae en las células satélite, activadas por la señalización precedente, que inician el programa miogénico para la reconstrucción del tejido muscular, recapitulando parcialmente el programa miogénico embrionario del desarrollo muscular (Tajbakhsh *et al.*, 1997; Hawke and Garry, 2001; Chargé and Rudnicki, 2004). Las células satélite quiescentes se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Pax7 y las de determinados músculos por el factor de transcripción Pax3, factores que cumplen con una importante función regulando la entrada de las células satélite a la miogénesis actuando por encima de los MRFs (Relaix *et al.*, 2006; Buckingham and Relaix, 2007). La expresión de los MRFs es secuencial, pero de manera que se solapan entre ellos (Smith, Janney and Allen, 1994), de modo que dictan la progresión de las células satélite hacia la proliferación, la diferenciación o la auto-renovación (**Figura 3.5**). Inicialmente, las células satélite activadas entran en el ciclo celular y proliferan expandiendo la población miogénica. Estas células proliferativas, conocidas como mioblastos, expresan los factores miogénicos Myf5 y MyoD1. La transición a la diferenciación implica la disminución de la expresión de genes proliferativos y de los factores Pax3 y Pax7 para dar paso a la expresión de factores miogénicos relacionados con la fusión de los mioblastos, ya sea entre sí o con las fibras preexistentes, tales como Mrf4 y Miogenina (Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994; Yablonka-Reuveni *et al.*, 1999; Cornelison *et al.*, 2000; Zammit, 2006; Fukada *et al.*, 2007; Relaix and Zammit, 2012).

Por último, las fibras nuevamente formadas sufren un proceso de crecimiento y maduración, primero expresando formas embrionarias o neonatales de MyHC y expresando más tarde las formas adultas lenta y/o rápida de esta proteína estructural y culminando con la migración de los núcleos hacia la periferia de las fibras (Sartore, Gorza and Schiaffino, 1982; Whalen *et al.*, 1990).

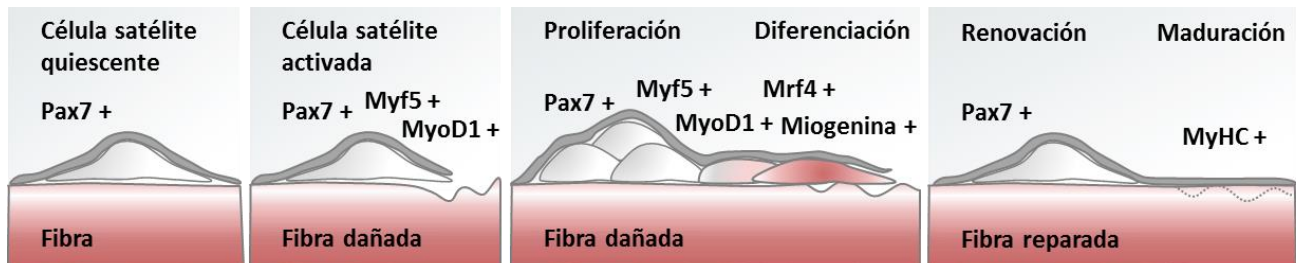


Figura 3.5. Papel de la célula satélite durante la regeneración del músculo esquelético centrándose en la regulación molecular que rige las transformaciones que sufre.

Mientras que la mayoría de las células satélite activadas se diferencian tras una fase proliferativa, una pequeña población de células renueva la población original de células madre musculares, manteniendo una población reserva de células madre para hacer frente a futuros desequilibrios del tejido. Este proceso de repoblación puede producirse a través diferentes mecanismos (Kuang, Gillespie and Rudnicki, 2008). Por un lado, se podrían generar directamente células madre o células destinadas a diferenciarse mediante divisiones simétricas de estas dos poblaciones (Le Grand *et al.*, 2009). También podrían darse divisiones asimétricas dando lugar a una célula de cada tipo. En este sentido, se han descrito dos subpoblaciones dentro de la población de las células satélite que expresan Pax7: aquellas que han expresado Myf5 y están destinadas a diferenciarse (Pax7+ Myf5+), y otras que se caracterizan por no haber expresado Myf5 en ningún momento (Pax7+ Myf5-), células que presentan un fenotipo de célula madre y dan lugar a células de las dos características (madre y especificada) tras dividirse de manera asimétrica (Kuang *et al.*, 2007). Por último, otro mecanismo establecería el restablecimiento de la población de células madre, bien inhibiendo la vía de la diferenciación en las células destinadas a ello mediante la disminución de la expresión de MyoD1, o bien impidiendo la proliferación de las células activando la expresión de factores importantes para inducir la quiescencia celular (Olguin and Olwin, 2004; Shea *et al.*, 2010; Gopinath *et al.*, 2014).

La regeneración muscular se considera bien definida en términos celulares y puede resumirse en esta secuencia: de célula satélite a → mioblasto → miotubo → miofibras. No obstante,

se han descrito varias poblaciones celulares residentes en el músculo esquelético distintas a las células satélite, que pueden experimentar una diferenciación miogénica *in vitro* y contribuir a la regeneración muscular *in vivo* (Tedesco, Moyle and Perdiguero, 2017). Entre ellas se incluyen: los mesangioblastos y pericitos, que expresan algunos marcadores en común como, Cspg4, PDGFR β y AP, y que han sido utilizadas para mejorar la fisiopatología de músculos afectados por distrofias musculares mediante su trasplante al músculo dañado (Sampaolesi *et al.*, 2006; Dellavalle *et al.*, 2007, 2011; Díaz-Manera *et al.*, 2010; Armulik, Genové and Betsholtz, 2011), aunque su plasticidad *in vivo* como células multipotentes y su postulada relación con las células madre mesenquimales han sido cuestionadas y reducidas recientemente (Guimarães-Camboa *et al.*, 2017). También entran en este grupo las PICs, caracterizadas por la expresión de marcadores Sca-1 y CD34, que requieren de la expresión de Pax7 para su especificación miogénica y que presentan características de célula madre pudiendo generar células satélite (Mitchell *et al.*, 2010; Pannerec *et al.*, 2013) o la llamada *side population*, población heterogénea de células madre intersticiales aisladas en base a su baja tinción con Hoechst 33342, positivas para el marcador Sca-1 y algunas para CD45, que presentan el potencial de generar miotubos y células satélite tras ser trasplantadas *in vivo* o en condiciones de co-cultivo con mioblastos *in vitro* (Gussoni *et al.*, 1999; Asakura *et al.*, 2002), y que están relacionadas a su vez con las células residentes CD45 positivas con capacidades miogénicas en condiciones regenerativas (Poleskaya, Seale and Rudnicki, 2003). Asimismo, también se han descrito la población CD133 positiva residente en el intersticio del músculo que es capaz de mejorar la morfología y función de los músculos esqueléticos de ratones *mdx* (modelo de la distrofia muscular de Duchenne (DMD)) (Benchouir *et al.*, 2007) y los recientemente descritos progenitores del linaje del gen *Twist2*, que parecen ser una subpoblación de precursores mesenquimales involucrados en el crecimiento postnatal y en la regeneración muscular, generando específicamente fibras de tipo IIb/x (Liu *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta que el potencial miogénico *in vivo* de todos estos tipos celulares se ha evaluado generalmente a través de experimentos de trasplante en un contexto de daño o de enfermedad o en condiciones *in vitro* de interacción inductiva, se desconoce cuál es su implicación durante el crecimiento muscular y la regeneración en condiciones fisiológicas, exceptuando a los progenitores del linaje del gen *Twist2*, que parecen tener una función más determinante incluso en condiciones fisiológicas (Liu *et al.*, 2017). En todo caso, la participación de todos estos tipos celulares en el proceso de regeneración muscular natural parece ser poco relevante en comparación con el papel preponderante e

indispensable de las células satélite (Lepper, Partridge and Fan, 2011; Murphy *et al.*, 2011; Sambasivan *et al.*, 2011).

Por otro lado, en el tejido muscular adulto se encuentran precursores y células no miogénicas que juegan un papel relevante promoviendo la regeneración, pero que son también responsables de la generación de grasa y de tejido fibrótico cuando hay un desequilibrio y la señalización predominante es la de degeneración fibroadiposa del tejido muscular, como sucede en numerosas distrofias musculares y en el envejecimiento muscular (sarcopenia). Entre ellas se encuentran: los precursores mesenquimales, o bien los FAPs, que expresan los marcadores Sca-1, CD34 y PDGFR α , que originan la grasa y el tejido fibroso, pero que también favorecen la regeneración y la homeostasis muscular (Joe *et al.*, 2010; Uezumi *et al.*, 2010; Mozzetta *et al.*, 2013; Uezumi, Ikemoto-Uezumi and Tsuchida, 2014); los fibroblastos, clásicamente considerados como responsables del remodelamiento de la ECM y de la formación de fibrosis, aunque también interactúan con las células satélite y pueden promover la miogénesis en determinadas condiciones (Murphy *et al.*, 2011); las PICs, donde se diferencia un subtipo con potencial adipogénico en base a la expresión del PDGFR α (Pannerec *et al.*, 2013); y los pericitos de tipo I, que no expresan Nestina y que participan en la generación de tejido fibroso en animales viejos (Birbrair *et al.*, 2013).

En conclusión, se han descrito numerosas poblaciones precursoras residentes en músculo, pero la interrelación entre las mismas no está clara.

Además de la regeneración de las fibras musculares, en esta última fase también sucede una remodelación del tejido conectivo y una restauración de los vasos sanguíneos y de los nervios para asegurar la funcionalidad del tejido. Generalmente las células satélite se encuentran posicionadas cerca de los capilares e interactúan con células endoteliales a fin de coordinar los procesos de angiogénesis y miogénesis de forma adecuada (Christov *et al.*, 2007). A su vez, aumenta la producción de proteínas de la ECM que ensamblan el tejido y funcionan como soporte para la formación de las fibras y las uniones neuromusculares (Mutsaers *et al.*, 1997; Grounds, 2008; Lluri *et al.*, 2010). En respuesta a una breve denervación, las neuronas motoras restantes pueden alargarse o agrandarse y re-inervar fibras próximas, y las células satélite regulan este fenómeno a través de los niveles de secreción de semaforina 3A (Tatsumi *et al.*, 2009). Sin embargo, si la inervación del músculo no se restaura rápidamente, el músculo deja de recibir las señales

neuronales necesarias para mantenerse y comenzará a atrofiarse hasta degenerarse por completo (Musarò, 2014; Hall, 2016).

3.1.1.3 Músculos cutáneos de los mamíferos

Los músculos cutáneos son estructuras anatómicas formadas por una fina capa de músculo estriado que se caracterizan por tener al menos una inserción en la piel y por carecer de envoltura fascial. Se encuentran íntimamente adheridas a la dermis de la piel y ancladas a las fascias formando una superficie contráctil que cubre la mayor parte del cuerpo. Permiten reforzar las reacciones mímicas de los labios y las aberturas nasales, posicionar las orejas y tensar, arrugar o contraer la piel. Estos músculos se pueden dividir en músculos cutáneos de la cabeza, del cuello y del tronco (Vargas, 2002; König and Bragulla, 2007; Evans and de Lahunta, 2013).

3.1.1.3.1 El panículo carnoso

El panículo carnoso o *panniculus carnosus* (PC), también llamado *musculus cutaneus*, *cutaneus trunci* o *cutaneus maximus*, es una fina capa de músculo estriado que se encuentra íntimamente unido a la piel y a la fascia en muchos mamíferos tanto terrestres como marinos (Langworthy, 1924, 1925, 1932; Perrin, Würsig and Thewissen, 2009; Thomas and Kastelein, 2013). Estructuralmente, el PC no contiene husos musculares (Therault and Diamond, 1988; Holstege and Blok, 1989) y tiene una anchura que equivale a unas 3-5 fibras (Machado *et al.*, 2011) que expresan predominantemente la isoforma de miosina de tipo II o rápida, por lo que se trata de un músculo estriado rápido con capacidad de producir una fuerza significativa durante un corto periodo de tiempo (Brazelton, Nystrom and Blau, 2003). Por otro lado, el PC se considera como un músculo altamente regenerativo, ya que presenta fibras con un diámetro significativamente más pequeño, una mayor heterogeneidad en el tamaño de las fibras y un alto porcentaje de fibras con núcleos centrales en ausencia de daño (Brazelton, Nystrom and Blau, 2003).

En los últimos años varios trabajos han demostrado que células derivadas de la médula ósea trasplantada pueden colonizar el músculo esquelético, aunque en una proporción tan baja que su relevancia fisiológica ha sido muy debatida (Ferrari *et al.*, 1998; Cossu and Mavilio, 2000; Ferrari, Stornaiuolo and Mavilio, 2001; Ferrari and Mavilio, 2002). Curiosamente, la incorporación de estas células al PC es del orden de 1000 veces mayor que a otros músculos esqueléticos estudiados

(Brazelton, Nystrom and Blau, 2003). Este sorprendente destino es una de las particularidades más llamativas e inexplicadas de este músculo. Se desconoce si estos datos experimentales representan una contribución miogénica fisiológica o son una respuesta no fisiológica relacionada con el condicionamiento previo al trasplante (Sherwood *et al.*, 2004).

En cuanto a su disposición anatómica, existen diferencias entre los distintos mamíferos respecto a la localización y a la extensión del PC dependiendo de su nivel de desarrollo evolutivo y de la importancia funcional que desempeña este músculo en un animal en particular. La descripción general que se realizará en esta introducción se basa en el ratón, dado que es el animal utilizado en este trabajo. En el ratón, esta capa subdermal de superficie variable comúnmente se extiende por la parte proximal de las extremidades posteriores, la espalda, el abdomen y el pecho (**Figura 3.6**) (Langworthy, 1925). El PC presenta muchas variaciones, pero por lo común, contiene fibras que se originan e insertan en la fascia superficial y fibras que convergen junto con los músculos pectorales en una inserción en la tuberosidad del húmero, llegando algunas pocas a unirse al tendón pectoral profundo (Langworthy, 1924, 1925). Se considera que es un músculo que deriva de la musculatura pectoral por esta inserción en la tuberosidad del húmero y porque se encuentra inervado por el nervio torácico anterior (nervio pectoral lateral) de las ramificaciones del plexo braquial, a diferencia de la musculatura superficial facial, que a pesar de encontrarse en contacto estrecho, recibe su inervación del nervio facial (Langworthy, 1924, 1925). Por otro lado, el PC es responsable de un reflejo cutáneo llamado reflejo del *cutaneous trunci* (*cutaneous trunci reflex*) que comienza por un estímulo local en la piel: los nervios sensoriales aferentes terminados en mecanoreceptores o termoreceptores que inervan ese segmento de la piel transmiten la señal hasta la médula espinal segmentaria haciendo sinapsis con las motoneuronas eferentes que transmiten una respuesta motora al panículo carnoso del mismo segmento estimulado causando su contracción (Slatter, 2003). El análisis de la contracción causada por un estímulo sensitivo o doloroso en un determinado dermatomo (área de la piel principalmente suministrada por un único nervio espinal) es útil en clínica para establecer la posible localización de una lesión de la médula espinal (Jones, 2012).

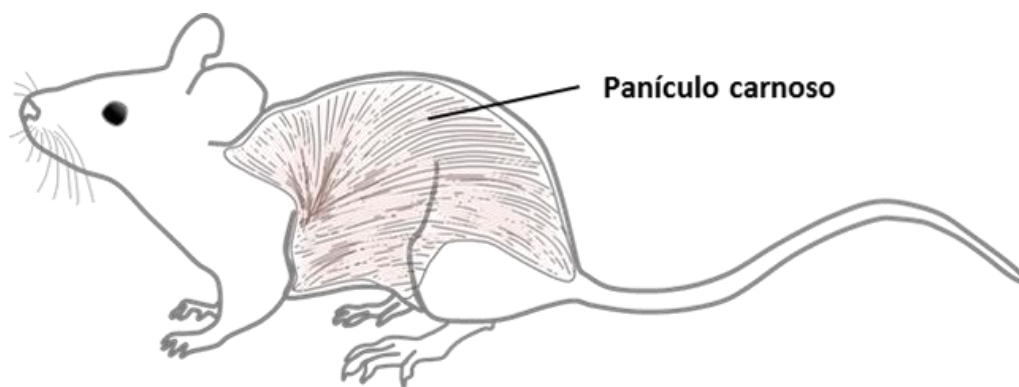


Figura 3.6. Localización anatómica y extensión del panículo carnoso en el ratón.

En cuanto al sistema vascular de la piel correspondiente a la zona por donde se distribuye el PC, las principales arterias y venas se encuentran en la superficie superior del PC formando un plexo vascular abundante en anastomosis, con ramas que se propagan por encima y por debajo de este nivel. Las ramas superiores forman una red poco desarrollada entre la dermis y la hipodermis para extender sus ramificaciones directamente hacia el plexo subepidérmico. Las ramas inferiores suministran sangre al PC con un curso paralelo a las fibras. Debajo del PC se localiza una red vascular más pequeña y más en profundidad se encuentra otra capa vascular que delimita con la fascia superficial y que está conectada tanto con los vasos cutáneos como con los vasos de la propia fascia. Estos vasos tienen una forma ondulada que permite su extensión y contracción, característica necesaria debido al constante movimiento que ocurre entre la piel y el tejido subyacente (Hughes and Dann, 1941; Montagna and Ellis, 2013).

En referencia a su origen embrionario, se ha descrito a través de estudios de trazado de linaje que durante el desarrollo el PC se origina a partir de precursores que han expresado el gen Pax7, al igual que otros músculos del tronco y de las extremidades (Amini-Nik *et al.*, 2011).

Tanto la morfología como la localización de este músculo están íntimamente relacionadas con su función más obvia, contraer la piel en respuesta a diversos estímulos. Este fenómeno cumple con distintos objetivos dependiendo del animal. Esta característica se muestra como un mecanismo de defensa frente a insectos, pájaros y otros estímulos irritantes (Langworthy, 1925) y como estrategia defensiva ligada al movimiento de púas o espinas cutáneas (Ashwell, 2013). Puede servir de ayuda en la locomoción y contribuir a modificar y adaptar la forma del cuerpo del animal (Perrin, Würsig and Thewissen, 2009; Ashwell, 2013) y también se encuentra asociado a la bolsa marsupial donde posibilita su cierre a través de su contracción y a las glándulas mamarias de algunos animales

(Langworthy, 1924, 1925; Tyndale-Biscoe, 2005; Perrin, Würsig and Thewissen, 2009). Además de su capacidad contráctil, la piel que contiene el PC se encuentra unida a las estructuras más profundas de manera bastante holgada. Esto posibilita otros movimientos útiles como los desplazamientos de la piel mojada por las sacudidas del animal para liberar el exceso de agua o también como un sistema de protección para algunos roedores que viven bajo tierra, ya que esta flexibilidad reduce los posibles daños causados por abrasión (Daly and Buffenstein, 1998).

Como músculo estriado, otra de las presuntas funciones que cumpliría el PC estaría relacionada con la termorregulación, probablemente generando calor a través de la termogénesis por temblor (Pavletic, 2011), aunque es un fenómeno muy poco estudiado en este músculo en concreto. Por el contrario, está más estudiada su participación en la reparación de lesiones de la piel. La presencia de esta capa muscular asociada a la disposición suelta de la piel es de gran importancia durante la cicatrización ya que contribuyen significativamente a la contracción de la herida. El PC da soporte a la migración celular, las tensiones generadas en la herida mueven la piel y llevan a juntar los márgenes rápidamente (Billingham and Medawar, 1955; Billingham and Russell, 1956; Snowden, Kennedy and Cliff, 1982; Zhou, Matsui and Ono, 2000; Aksoy *et al.*, 2009; Davidson, Yu and Opalenik, 2013; Rittié, 2016). Por lo tanto, en estos casos el principal mecanismo de cicatrización es por contracción, en lugar del lento proceso de la reepitelización, proceso que implica la generación de piel nueva y que sucede como principal mecanismo cuando la piel se encuentra estrechamente unida a las estructuras más profundas y carece de panículo carnoso (Wong *et al.*, 2011; Abdullahi, Amini-Nik and Jeschke, 2014). Además, se ha observado que las células derivadas de este músculo contribuyen al lecho de la herida, al parecer dando lugar a parte de los miofibroblastos responsables de generar las tensiones de la contracción, de modo que el PC también participaría en la contracción de la herida a nivel celular (Amini-Nik *et al.*, 2011). Por otro lado, el PC también contribuye a la secreción de colágeno y su rica red vascular irriga constantemente el lecho de la herida formando un nuevo lecho vascular que se expande gradualmente para cubrir el nuevo tejido en formación (Hughes and Dann, 1941; Billingham and Russell, 1956; Cohen, Moore and Diegelmann, 1979; Machado *et al.*, 2011).

3.1.1.4 Músculos humanos remanentes del panículo carnoso

La capa de panículo carnoso como tal, está ausente en el cuerpo humano, pero algunos músculos de localización anatómica diversa como el platisma, incluyendo sus contribuciones a los

músculos faciales, los músculos auriculares, el músculo occipitofrontal, el músculo dartos del escroto (músculo liso), el músculo subaerolar alrededor del pezón (músculo liso), el *musculus corrugator cutis ani* en el ano (músculo liso), el *musculus palmaris brevis* en la palma de la mano y el arco axial de Langer en la región axilar son considerados como vestigios de este músculo (**Figura 3.7**) (Turner, 1867, 1870; Sánchez-Yus and Simón, 2000; Besana-Ciani and Greenall, 2005; Greenwood, 2010; Singh, 2014). Asimismo, el *musculus sternalis*, un músculo sin ninguna relevancia clínica encontrado sólo ocasionalmente en el 3-5% de los individuos, es descrito como un fragmento derivado del esternón bajo, de las costillas inferiores, de la vaina del músculo recto del abdomen o del músculo oblicuo externo del abdomen, y es considerado como otro vestigio humano del PC. Los músculos pectorales, el músculo trapecio, el músculo serrato anterior, el músculo piramidal de la pelvis, el *musculus psoas minor* y el *musculus palmaris longus* también pueden contener fibras remanentes del PC (Turner, 1867, 1870; Stevenson, 2005; Bergman, 2017). El desarrollo de algunos de estos tejidos derivados a nivel evolutivo del PC puede variar entre individuos (Gates, 1946; Stevenson, 2005), ya que se ha visto que presentan una mayor probabilidad de estar ausentes o de manifestarse parcialmente defectivos que otros músculos. Así, el músculo piramidal de la pelvis se encuentra ausente en el 16-17% de los individuos estudiados, el *musculus palmaris longus* en el 11% y el *musculus psoas minor* sufre una agenesia bilateral en un 50% de los casos (Bergman, 1988; Stevenson *et al.*, 2015).

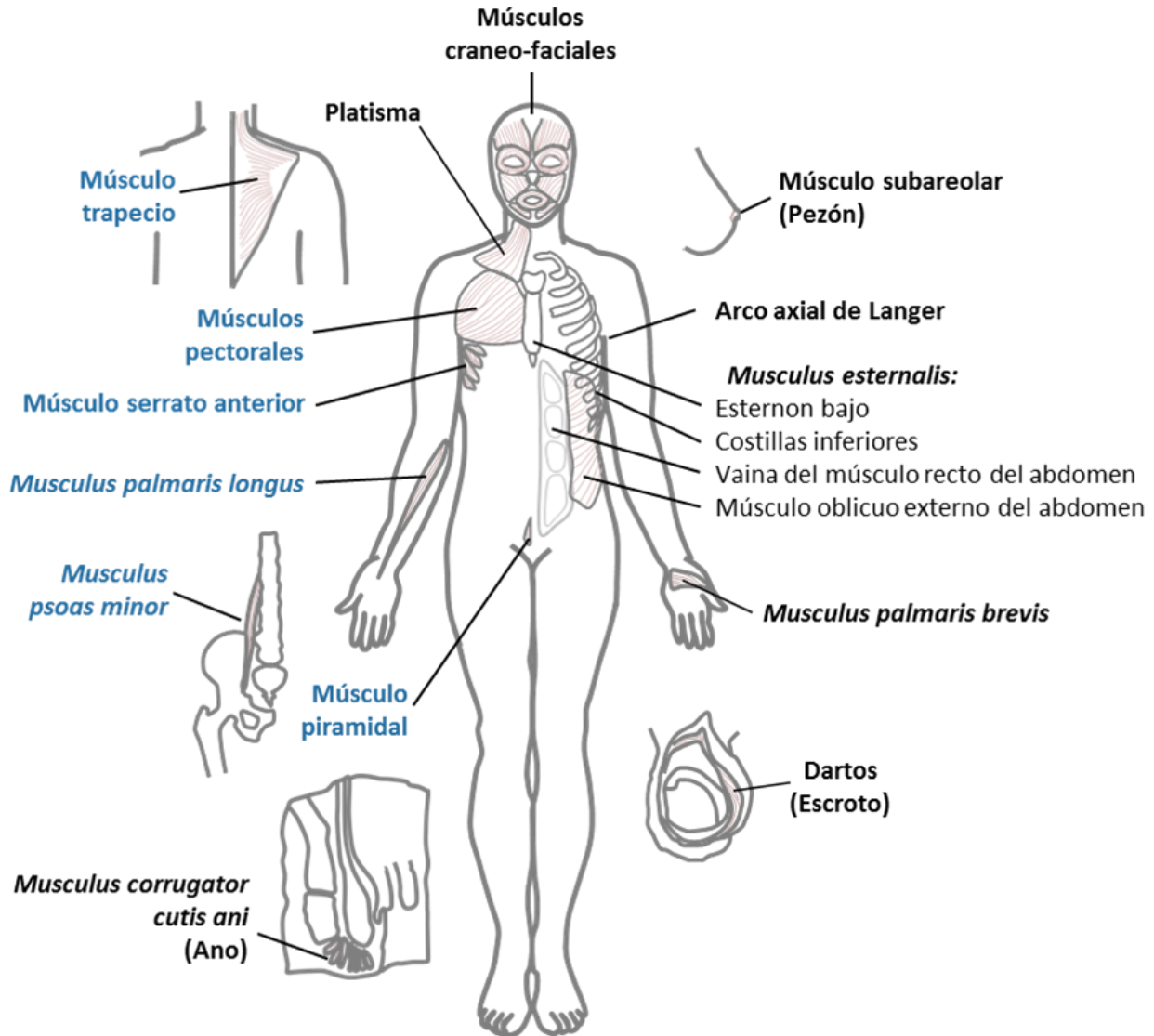


Figura 3.7. Localización de los músculos vestigiales del panículo carnoso en el cuerpo humano (en negro) así como de la de aquellos que pueden contener remanentes (en azul) según diversos autores.

Se han planteado diferentes hipótesis para dar explicación a la variación de la presencia del PC entre diferentes mamíferos, y particularmente, sobre el porqué de la regresión del PC en los seres humanos. Greenwood (Greenwood, 2010) expuso una hipótesis sobre la posible función de este tejido en los mamíferos remarcando la ventaja que ofrece su presencia a la hora de hacer frente a heridas causadas por depredadores (Li *et al.*, 2009), sobre todo en las partes más vulnerables a recibir estos ataques, en el cuello y en la zona dorsal del animal. Razona así la persistencia del PC en el ser humano localizado en el cuello como el platisma y sugiere que la disminución en el área que cubre el platisma está ligada a la disminución de las probabilidades de sufrir un ataque por otros depredadores. Otra hipótesis para justificar la ausencia filogenética de

este tejido en el ser humano es que el PC permite el movimiento o la contracción independiente de la piel con el fin de aliviar alguna molestia o ahuyentar a los insectos o pájaros posados en el animal, y esta habilidad va perdiendo su sentido en animales superiores que han adquirido mayor movilidad de las extremidades superiores liberadas de la tarea de la locomoción, lo que conlleva un alcance más amplio, como sucede en el caso de los seres humanos, capaces de acceder prácticamente a todo el contorno de su piel con sus extremidades (Greenwood, 2010; Jung *et al.*, 2016; Bergman, 2017).

3.1.1.5 El cremáster humano

Los músculos del abdomen extienden sus fibras hacia el aparato reproductor masculino donde se especifican en diversas estructuras anatómicas propias, entre ellas el músculo cremáster (**Figura 3.8**). De la parte más interna a la externa, la fascia transversal se convierte en la fascia espermática interna, el músculo oblicuo interno del abdomen se torna en el músculo cremáster y su fascia, del músculo oblicuo externo del abdomen surge la fascia espermática externa, la fascia superficial se vuelve en el músculo dartos y su fascia, y por último, la piel continúa para envolver a todas estas túnicas y conformar en su conjunto el escroto, saco dividido en dos mitades que cubre los testículos, los epidídimos y los cordones espermáticos (Hansen, 2002; Singh, 2014; Federle *et al.*, 2016).

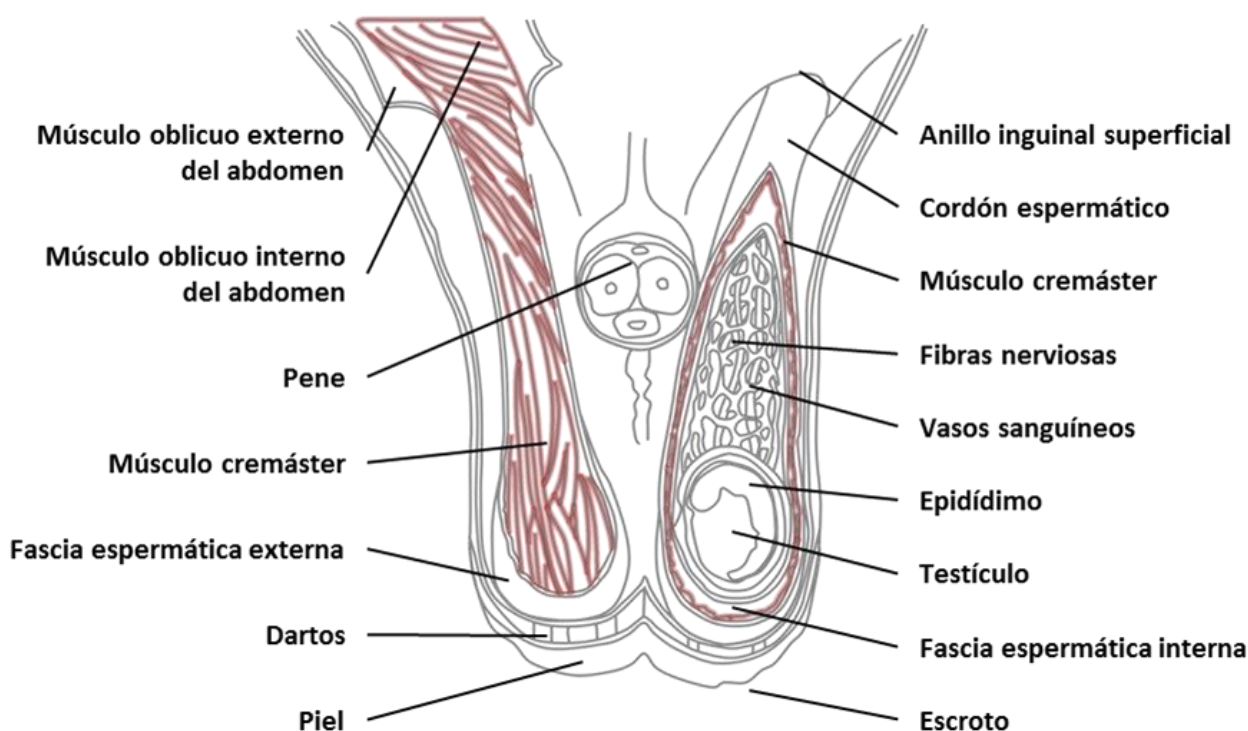


Figura 3.8. Anatomía del sistema reproductor masculino donde se identifica el músculo cremáster (en rojo).

El músculo cremáster consiste en una serie de bucles de fibras estriadas y algunas fibras lisas intercaladas (Kayalioglu *et al.*, 2008), donde sus terminaciones se hallan unidas al tubérculo púbico, a la cresta púbica y al tendón conjunto. La contracción del cremáster eleva los testículos hacia el anillo inguinal superficial protegiéndolos y ayudando en su termorregulación. A pesar de estar compuesto principalmente por fibras estriadas, estas generalmente no se encuentran bajo control voluntario. Este músculo está innervado por fibras nerviosas simpáticas provenientes de los segmentos lumbares L1 y L2 de la médula espinal a través de la rama genital del nervio genitofemoral. Una estimulación táctil de la zona media superior interna del muslo provoca un reflejo superficial, llamado reflejo cremastérico, en el que se contrae el músculo elevando el testículo de ese mismo lado. Este reflejo es más pronunciado en los niños. La vascularización del cremáster llega a través de una rama de los vasos epigástricos inferiores, la arteria y la vena cremastéricas suplen y drenan este músculo (Singh, 2014; Standring, 2016).

3.2 Enfermedades asociadas al músculo esquelético

Teniendo en cuenta que el músculo esquelético lleva a cabo importantes funciones para el óptimo desempeño funcional del cuerpo como el mantenimiento de la postura, el movimiento, el metabolismo y la regulación energética, este órgano requiere de unas capacidades regenerativas muy depuradas y operativas a lo largo de la vida. Por ello, cualquier disfunción del mismo causa un declive funcional notorio con consecuencias negativas severas para la calidad de vida y para la esperanza de vida de las personas (Rosenberg, 1997). Existen muchas formas distintas de enfermedades musculares con causas y síntomas diferentes que pueden dividirse en dos grandes categorías dependiendo de si se conoce una causa genética o no.

3.2.1 Enfermedades musculares genéticas

Las enfermedades neuromusculares monogénicas son un conjunto muy heterogéneo de entidades subclasificadas en función de la clínica, los tipos de estructuras moleculares implicadas o de aspectos morfológicos (Kaplan *et al.*, 2016). De este conjunto destacaremos en esta introducción el grupo de las distrofias musculares (DM) porque engloba a algunas de las enfermedades de interés para nuestro grupo de investigación.

3.2.1.1 Distrofias musculares

Las DM constituyen un extenso grupo de enfermedades genéticas caracterizadas por una degeneración progresiva de diversos músculos esqueléticos que conllevan a un grado variable de debilidad y discapacidad (McNally and Pytel, 2007). De manera general, las DM son trastornos progresivos que pueden aparecer a lo largo de toda la vida, afectar a diferentes grupos musculares y donde se aprecia a nivel morfológico un proceso fallido de degeneración/regeneración del músculo que evoluciona hacia la degeneración fibroadiposa con destrucción de miofibrillas y elevación de la tasa de creatina fosfoquinasa sérica al menos en fases iniciales. Algunos tipos de distrofias son enfermedades multisistémicas donde se ve afectado también el corazón, el sistema gastrointestinal, las glándulas endocrinas, la columna, los ojos, el cerebro y otros órganos.

La mayoría de los pacientes presentan mutaciones en los genes responsables de alguna de las proteínas que forman parte de la fibra muscular, ya sean estructurales o enzimáticas, causando defectos en estas proteínas y desarrollando así los síntomas característicos de estas enfermedades (Emery, 2002). Se pueden clasificar en distintos grupos conforme a su tipo de herencia, pudiendo ser enfermedades de herencia ligada al cromosoma X, autosómicas dominantes o autosómicas recesivas. A continuación se enumeran las nueve principales formas de distrofia muscular: distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia miotónica de Steinert, distrofias musculares de cinturas, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofias musculares congénitas, distrofia muscular oculofaríngea, miopatías distales y distrofia muscular de Emery-Dreifuss.

3.2.2 Enfermedades musculares adquiridas

Por otro lado se encuentran las enfermedades que no presentan base genética conocida y que se conocen como adquiridas. Al igual que en la categoría anterior, la diversidad de las patologías que se agrupan aquí también es muy alta. Entre ellas destacan las enfermedades musculares inflamatorias y la sarcopenia, que será descrita seguidamente por ser de interés para nuestro grupo de investigación.

3.2.2.1 Sarcopenia

El envejecimiento se puede definir como la acumulación progresiva de cambios perjudiciales más o menos aleatorios ligados al paso del tiempo y a los estilos de vida, causantes de un declive

funcional, anatómico y fisiológico que conducen a la incapacidad de mantener la homeostasis bajo condiciones de estrés fisiológico (Harman, 2003; Mangoni and Jackson, 2004). El detrimento más notable relacionado con la edad que sufre el músculo esquelético es la pérdida de masa muscular, conocida como sarcopenia primaria (Rosenberg, 1997; Cruz-Jentoft *et al.*, 2010; Burks and Cohn, 2011). Por el contrario, cuando el deterioro del músculo esquelético es fruto del desuso, de la malnutrición o por otras enfermedades se conoce como sarcopenia secundaria (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010). En el caso de la sarcopenia primaria, a pesar de que originalmente fue definida por Rosenberg en 1997 como la pérdida progresiva de masa corporal magra relacionada con la edad, es un término ampliamente utilizado, y no sin cierta controversia, para diagnosticar un síndrome geriátrico que presenta tanto una pérdida de masa muscular (sarcopenia) como una pérdida de la fuerza muscular (diapenia) que comprometen significativamente la función del músculo esquelético. En realidad se trata de dos procesos distintos y no equivalentes con mecanismos y fisiopatología diferentes, que muchos autores consideran que deberían de emplearse de manera independiente (Rosenberg, 1997; Cruz-Jentoft *et al.*, 2010; Narici and Maffulli, 2010; Visser and Schaap, 2011; Kwan, 2013; Landi *et al.*, 2015; Menant *et al.*, 2017). En cualquier caso, la sarcopenia primaria comprende todos los distintos cambios relacionados con la edad que ocurren en diversos procesos asociados al músculo esquelético y las consecuencias clínicas derivadas de estas situaciones (Lang *et al.*, 2010; Kwan, 2013).

Así, la fisiopatología de la sarcopenia se puede explicar por múltiples desencadenantes independientes, muchos relacionados con la edad: factores genéticos, disfunción mitocondrial, subida del estrés oxidativo, inflamación, desregulación hormonal, malnutrición, disminución de la actividad física, denervación, degeneración de las uniones neuromusculares, atrofia de la sinapsis, función celular reducida o deficiente, renovación proteica alterada, disminución de los factores de crecimiento y otras enfermedades como las neurodegenerativas o las enfermedades autoinmunes. Estos factores se trasladan a un conjunto de resultados clínicos tales como disminución de la fuerza muscular y de la movilidad, riesgo a padecer trastornos metabólicos y caídas, y aumento de la fatiga y fragilidad (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2010; Kwan, 2013).

3.3 Terapia celular con células satélite y mioblastos

Dentro de los diferentes enfoques terapéuticos que se han planteado en las enfermedades musculares, se encuentra el empleo de células con capacidad miogénica para regenerar el músculo dañado por problemas genéticos o por el envejecimiento. La población celular candidata para el tratamiento tiene que cumplir varios requisitos para asegurar la eficiencia de la intervención. En caso de una administración sistémica de las células, estas deberán ser capaces de llegar a su destino, al músculo degenerado. Es esencial que las células trasplantadas tengan un potencial miogénico estable para evitar diferenciaciones a tipos celulares inapropiados y deben ser capaces de fusionarse con las células existentes para formar miotubos o directamente generar nuevos miotubos. En el caso de ser una patología de base genética, tras la fusión, la contribución de los núcleos genéticamente normales debería de resultar en la producción de una proteína funcional. Para ello se pueden seguir dos estrategias: una en la que las células se obtienen de un donante sano, que expresarán una copia normal del gen mutado, pero donde normalmente se requiere un tratamiento inmunosupresor para evitar el rechazo; u otra en la que las células se obtienen del propio paciente, por lo que no causarán rechazo inmunológico, pero que deberán poder ser genéticamente modificadas previamente *in vitro* para restaurar la expresión de la proteína defectuosa o ausente (Negroni, Butler-Browne and Mouly, 2006). Además, hay que tener en cuenta que para una restauración funcional completa del tejido, el músculo enfermo tendría que ser capaz de regenerar y reparar el tejido tantas veces como sea necesario. De modo que para conseguir resultados permanentes, las células terapéuticas escogidas deberían tener también el potencial de contribuir a renovar la población de células satélite, lo que supone un desafío terapéutico mucho mayor. Por último, que idealmente se pudieran aislar de manera mínimamente invasiva y que se obtuviera una cantidad suficiente de células, o en su defecto, que se pudieran amplificar de manera eficiente y compatible con su uso en clínica (Negroni *et al.*, 2015).

Debido a que las células satélite y su progenie, los mioblastos, son fundamentales para la regeneración muscular y presentan la capacidad de autorrenovación, estas han sido utilizadas en varios experimentos y ensayos clínicos. Partridge y colaboradores mostraron las primeras evidencias de la utilidad de estas células para restaurar la expresión de la distrofina en ratones *mdx*, (Partridge *et al.*, 1989) y otros estudios corroboraron esta prueba de concepto con células de ratón (Kinoshita *et al.*, 1994) y con células humanas (Huard *et al.*, 1994). En vista de estos resultados se

realizaron varios ensayos clínicos basados en inyecciones intramusculares de mioblastos, pero se obtuvieron resultados de eficacia pobres, con un beneficio clínico mínimo (Partridge, 2000; Tedesco *et al.*, 2010). No obstante, parece ser que los mioblastos alogénicos trasplantados en pacientes con DMD son capaces de contribuir a la población de las células satélite ya que se han observado células donantes localizadas en el nicho de las células madre (Skuk *et al.*, 2006, 2010), y también se ha reportado recientemente el efecto positivo del trasplante de mioblastos a largo plazo, donde a una única paciente con DMD se le trasplantaron mioblastos procedentes de su gemela asintomática hace 20 años y tras ese periodo se ha observado un aumento de la fuerza muscular (Hogrel *et al.*, 2013). En aquellas DM donde se ven afectados unos pocos músculos, como en la distrofia muscular oculofaríngea, el trasplante autólogo de mioblastos no modificados ha dado buenos resultados clínicos, con una mejora en la calidad de vida de todos los pacientes y sin una degradación funcional de la deglución en algunos de ellos (Périeré *et al.*, 2014) (Ensayo clínico: NCT00773227). Asimismo, también se ha empleado esta misma estrategia para el tratamiento de la incontinencia urinaria, con resultados relativamente buenos y con varios ensayos clínicos en marcha (Smaldone and Chancellor, 2008; Wang, Chuang and Chancellor, 2011) (Ensayos clínicos: NCT00847535, NCT01008942 y NCT01355133), y para la incontinencia anal, donde se han obtenido resultados positivos significativos (Frudinger *et al.*, 2010, 2015) (Ensayo clínico: NCT01523522).

Sin embargo, en general estos estudios no han conseguido proporcionar a los pacientes una mejora clínica sustancial, al menos en los casos de DM que presentan afectación muy importante en la mayoría de los músculos esqueléticos. Se han señalado una serie de limitaciones como posible explicación de este hecho como la dificultad de aislar un número suficiente de células, de mantener y expandir las células madre o precursoras necesarias para el tratamiento en condiciones *in vitro* sin que eso suponga una pérdida de sus capacidades celulares, y la poca supervivencia y migración de estas células tras el trasplante (Negroni *et al.*, 2015). Además, la opinión general sobre este tema es que la inyección intramuscular de mioblastos puede ser una elección efectiva para el tratamiento de patologías musculares localizadas, donde sea necesario restaurar pocos músculos o músculos de tamaño pequeño, pero no para el tratamiento de enfermedades que afecten a la mayoría de los músculos esqueléticos, ya que la gran cantidad de inyecciones que se necesitarían para ello la haría impracticable (Tedesco and Cossu, 2012).

En consecuencia, muchos trabajos se han centrado en mejorar el potencial terapéutico de los mioblastos. Se ha demostrado que el porcentaje de muerte celular de las células inyectadas es

menor cuando se emplean células primarias de ratón en vez de células inmortalizadas (Skuk *et al.*, 2002). Algunos grupos han definido el aislamiento de la población de células satélite pura para su trasplante directo y han obtenido mejores resultados, señalando que el cultivo *in vitro* en adhesión previo al trasplante reduce la capacidad regenerativa de las mismas (Montarras *et al.*, 2005; Cerletti *et al.*, 2008; Sacco *et al.*, 2008). En cambio, también se ha observado que los sustratos de cultivo con una elasticidad similar a la del tejido muscular promueven la supervivencia de las células satélite y su autorrenovación, previniendo su prematura diferenciación y mejorando la capacidad de injerto de estas células (Gilbert *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha de tener en cuenta que los mioblastos no están fisiológicamente preparados para migrar y fusionarse de manera indiscriminada con las fibras residentes, si no que responden a un estado regenerativo del músculo y regeneran aquellas fibras que están parcialmente o completamente necróticas (Skuk, 2013). En este sentido, la co-inyección de mioblastos humanos con macrófagos pro-inflamatorios en músculos dañados extiende la fase de proliferación de los mioblastos e incrementa significativamente su migración y participación en la regeneración muscular (Bencze *et al.*, 2012). El ejercicio muscular intenso tras el trasplante de mioblastos también consiguió un efecto positivo en la regeneración en ratones *mdx* (Bouchentouf *et al.*, 2006). Por último, se ha mostrado como estrategia alternativa que la implantación de fibras aisladas con sus células satélite asociadas en ratones *mdx* produce una regeneración robusta del músculo, expresión de la proteína distrofina en una gran cantidad de fibras y una contribución a la población de células satélite residente (Collins *et al.*, 2005).

En resumen, las terapias celulares están en fase de ensayos clínicos con buenos resultados en seguridad. Todavía no se dispone de ninguna estrategia que haya demostrado eficacia en un ensayo clínico, y por tanto, no hay tratamiento celular disponible.

3.4 Estudio de la miogénesis *in vitro*

Los sistemas *in vitro* resultan esenciales a la hora de simular determinadas condiciones fisiológicas o patológicas de un organismo dado, y sobre todo, en el ser humano, ya que el estudio de/con estas células está limitado en gran parte al contexto *in vitro*. En este sentido, el cultivo celular como técnica fundamental para implementar el principio de las 3R en pos de la reducción, refinamiento y reemplazo del uso de los animales para la experimentación *in vivo* se desarrolló

como un método para estudiar el comportamiento celular libre de las variaciones que pudieran surgir dentro del organismo en respuesta a un estrés experimental normal o inducido (Harrison, 1907; Stacey, 2006). En esta línea se han propuesto varias aproximaciones experimentales basadas en sistemas celulares de distintas especies como herramientas para el estudio de la miogénesis y de algunos mecanismos patológicos, para el cribado farmacológico, para terapias celulares o para ingeniería tisular entre otras posibles aplicaciones.

A la hora de diseñar o analizar los sistemas *in vitro* disponibles para ello, cabe remarcar que los cultivos sencillos en dos dimensiones se han utilizado de forma rutinaria ya que permiten una fácil observación y control de las células (Haycock, 2011). Sin embargo, las células crecen en un ambiente tridimensional y esta organización espacial establece una compleja red de interacciones que afectan directamente a las funciones de las células (Breslin and O'Driscoll, 2013). Los cultivos en dos dimensiones no reproducen exactamente la fisiología de un tejido, por lo que muchos resultados no correlacionan con los observados *in vivo* (Breslin *et al.*, 2016). Esto es un inconveniente a la hora de analizar las interacciones entre célula-célula y entre célula-matriz extracelular. Con el fin de solventar estas limitaciones se han desarrollado diversos métodos de cultivo más elaborados que incorporan diferentes elementos para producir estructuras tridimensionales que se asemejan a las observadas *in vivo* (Bursac, Juhas and Rando, 2015). Los llamados cultivos tridimensionales tratan de mimetizar y establecer estas interacciones a través de estructuras multicelulares, técnicas de cultivo en esferas y soportes biocompatibles. Además de tratar de incorporar esta tridimensionalidad al cultivo, se deberán tener en cuenta tres factores importantes, el mantenimiento de los precursores miogénicos, la generación de fibras o miotubos funcionales y la naturaleza del material celular de partida. El cultivo celular deberá promover estas condiciones con el fin de simular efectivamente el proceso de la miogénesis *in vivo*.

3.4.1 Expansión de precursores miogénicos en cultivos esferogénicos en suspensión

Dada la importancia de preservar las características de las células madre y de expandirlas *in vitro*, determinar cuales son las condiciones ideales de cultivo supondrá un gran avance para la mejora de las terapias celulares. Apoyándose en la idea de que un método de cultivo tridimensional, como es el de la formación de esferas, proporcionaría un entorno parecido al de un nicho que ayudaría a mantener las células en un estado de célula madre (Wei, Kaufmann and

Albers, 2012; Westerman, 2015), hace unos años que se siguió el ejemplo del aislamiento y cultivo de las neuroesferas (Reynolds and Weiss, 1992) y de las cardioesferas (Messina *et al.*, 2004), postulando que las células musculares podrían cultivarse en condiciones similares formando mioesferas. Así se desarrollaron algunos protocolos que incorporaban una fase previa a la diferenciación miogénica en adhesión o al trasplante *in vivo*, en la que las células se propagaban en suspensión formando mioesferas capaces de volver a formar esferas tras una disociación, de mantenerse en esas condiciones durante meses y de no perder sus capacidades miogénicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Sarig *et al.*, 2006; Westerman *et al.*, 2008, 2010). Además, aplicando este procedimiento se consiguen aislar y mantener de manera conjunta poblaciones celulares diferentes propias del tejido de partida. Se ha descrito la presencia de precursores miogénicos, dentro de los cuales se encuentran células que expresan marcadores de células satélite (Pax7 y α 7-integrin), y de precursores no miogénicos con características similares a los FAPs (Westerman *et al.*, 2010; Westerman, 2015). Se conoce que la interacción entre estas poblaciones juega un papel importante en el mantenimiento de las células satélite y en la homeostasis y regeneración del músculo esquelético, indicando que probablemente los dos tipos celulares están involucrados en la formación de la mioesfera. Por otro lado, otros trabajos han comunicado la presencia de células precursoras capaces de diferenciarse en células de músculo liso y en progenie mesenquimal, de favorecer la vascularización de corazones con cardiomiopatía causada por la ausencia de δ -sarcoglicano y de secretar osteopontina, pudiendo promover la proliferación de progenitores angiogénicos presentes en la mioesfera (Ogata *et al.*, 2007; Nomura *et al.*, 2007).

En el caso del cultivo de mioesferas derivadas de músculo humano, también se han reportado diversos estudios que han empleado esta técnica de cultivo. En los primeros de ellos, aun con una metodología poco desarrollada, se detallaba la presencia de células de naturaleza diferente en los agregados formados, algunas con potencial miogénico y otras con características neurales (Alessandri *et al.*, 2004); y células con características mesenquimales no miogénicas, con capacidad para diferenciarse a células cardíacas, endoteliales y de músculo liso, y de promover la angiogénesis en corazones con isquemia (Nomura *et al.*, 2007). En esta línea enfocada a la aplicación de células precursoras de músculo esquelético para el tratamiento de patologías cardíacas, se observó que las mioesferas presentaban varias propiedades electrofisiológicas similares a las de los cardiomiocitos compatibles con la función cardíaca y que las condiciones de cultivo podían modular estas propiedades hacia un mayor fenotipo cardíaco, aunque sólo parcialmente, ya que las mioesferas

mantenían ciertas características electrofisiológicas de músculo esquelético (Poulet *et al.*, 2011). En este mismo año se demostró la presencia de progenitores miogénicos y de células madre “pluripotentes” dentro de las mioesferas, que estas podían mantenerse en cultivo durante meses y que al ser cultivadas en condiciones de diferenciación daban lugar a miotubos de manera espontánea y a otras células del linaje mesodérmico en presencia de medio inductivo (Wei *et al.*, 2011). Es importante señalar que los marcadores de pluripotencia observados en estas células probablemente sean debidos a la contaminación con células cancerosas provenientes de la biopsia de partida. Más tarde se corroboró la posibilidad de cultivar precursores miogénicos humanos derivados de músculo esquelético fetal formando mioesferas *in vitro* y de diferenciarlas a miotubos multinucleados (Hosoyama *et al.*, 2013).

3.4.2 Factores determinantes para la diferenciación miogénica funcional

La diferenciación de los precursores miogénicos para la obtención de miotubos funcionales *in vitro* es un proceso que se encuentra influenciado por varios estímulos como los factores de transcripción, la composición y arquitectura del material empleado como soporte y la estimulación mecánica y eléctrica, entre otros factores (Maley, Davies and Grounds, 1995; Bach *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2014).

La diferenciación *in vitro* se inhibe por mitógenos como el factor 2 de crecimiento fibroblástico (FGF2) (Clegg *et al.*, 1987; Brunetti and Goldfine, 1990), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Kelvin, Simard and Connolly, 1989), el factor de crecimiento hepático (HGF) (Anastasi *et al.*, 1997) o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Foster, Thompson and Kaufman, 1987; Ewton *et al.*, 1988) entre otros, factores que promueven la proliferación de los mioblastos e inhiben la fusión de los mismos. También se encuentra comprometida por el bloqueo de las proteínas de adhesión celulares como las integrinas (Menko and Boettiger, 1987) o por la falta de determinados componentes de la matriz extracelular como el colágeno (Nandan *et al.*, 1990; Saitoh *et al.*, 1992).

En referencia a los componentes de la matriz extracelular tales como la laminina, la fibronectina o el colágeno, se conoce que son esenciales para la supervivencia, función, migración y organización de las células *in vivo* y se ha visto que también influyen en la miogénesis *in vitro* (Hauschka and Konigsberg, 1966; Kühl *et al.*, 1986; Foster, Thompson and Kaufman, 1987). Las

células miogénicas se han solido cultivar en estos componentes aislados de la matriz celular o en derivados de estos como la gelatina, sustrato obtenido tras la hidrólisis del colágeno, que favorecen la miogénesis; sin embargo, materiales biológicos naturales más complejos y similares a la membrana basal muscular como Matrigel™ o gel de ECM (E1270, Sigma) resultaron ser de vital importancia para la formación y alineamiento de miotubos *in vitro*, para promover el cultivo contráctil a largo plazo y para fomentar una maduración adecuada de los miotubos formados por la expresión progresiva de las isoformas de la MyHC (Maley, Davies and Grounds, 1995; Osses and Brandan, 2002; Hartley and Yablonka-Reuveni, 2014). De la misma manera, se han utilizado materiales no biológicos (sintéticos) como el DETA (Das *et al.*, 2006) o semi-sintéticos como los hidrogeles basados en ácido hialurónico (Gilbert *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2011) o en polietilenglicol (PEG) (Fuoco *et al.*, 2012) como soportes de cultivo para promover la formación de miotubos, con la ventaja de que son sistemas más controlables ya que se evita la variabilidad ligada a la utilización de materiales biológicos como los nombrados anteriormente, punto importante a la hora de desarrollar sistemas definidos y para la ingeniería tisular. En detalle, el soporte DETA promueve cultivos miogénicos a largo plazo (Das *et al.*, 2007), posee la posibilidad de estampar patrones mediante fotolitografía (Ravenscroft *et al.*, 1998; Das *et al.*, 2006) y de aplicarlo virtualmente a todas las superficies hidroxiladas (Das *et al.*, 2010). Las células satélite embebidas en hidrogel derivado de ácido hialurónico promueven la recuperación funcional del músculo esquelético *in vivo* (Rossi *et al.*, 2011). Además, el ácido hialurónico es un compuesto biológicamente relevante que interacciona con muchos marcadores celulares de superficie y que es fácilmente modificable para que presente diversos grupos funcionales dando lugar a una amplia gama de hidrogeles con características químicas y mecánicas diferentes que se pueden procesar de la manera más adecuada para cada caso (Caliari and Burdick, 2016). El PEG es un polímero hidrofílico y relativamente inerte que igualmente se puede modificar para que presente diversos grupos funcionales de interés y de fácil uso como base para hidrogeles donde se ha visto que estos mejoran el injerto y la supervivencia de mesangioblastos administrados en el músculo esquelético en un ensayo *in vivo* (Fuoco *et al.*, 2012), o como base para unir otros materiales poliméricos como los nanotubos de carbono dando lugar a un compuesto que promueve específicamente la diferenciación miogénica de células mesenquimales humanas (Zhao *et al.*, 2015; Caliari and Burdick, 2016).

Es conocido que la rigidez de un soporte interfiere en la función celular. Así, se ha descrito que los sustratos muy rígidos pueden alterar la diferenciación miogénica y que esta diferenciación es óptima en sustratos algo más blandos, con una dureza similar a la de la propia matriz del músculo (Engler *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2011; Romanazzo *et al.*, 2012), descrita como $E = 12 \pm 4$ kPa (músculo EDL) (Engler *et al.*, 2004). Igualmente, las características topográficas de los soportes modifican el comportamiento celular por lo que se han ido aplicando diferentes técnicas como el electrohilado o la fotolitografía entre otras, para alterar la superficie de los materiales empleados en el cultivo, estableciendo patrones y surcos como guías para propiciar el alineamiento de las fibras musculares (Clark, Coles and Peckham, 1997; Evans, Britland and Wigmore, 1999; Aviss, Gough and Downes, 2010; Ostrovidov *et al.*, 2014).

Las células del músculo esquelético responden a estímulos mecánicos a través de vías de señalización de mecanotransducción afectando a la función y al desarrollo del tejido, pudiendo causar la elongación y/o el engrosamiento de las células, aunque también la apoptosis celular (Rangarajan, Madden and Bursac, 2014). Asimismo, se ha visto que determinados regímenes de estimulación mecánica tienen efectos beneficiosos en los cultivos favoreciendo la supervivencia, la diferenciación y el alineamiento de las fibras *in vitro* (Vandenburgh, 1982; Vandenburgh, Karlisch and Farr, 1988; Chromiak and Vandenburgh, 1994; Powell *et al.*, 2002; Candiani *et al.*, 2010; Machingal *et al.*, 2011).

La actividad contráctil es una de las funciones características del músculo esquelético *in vivo*, por lo que replicar esta actividad *in vitro* se convierte en un objetivo principal. En este sentido, se han descrito fenómenos de contracción espontánea en cultivos *in vitro* de miotubos obtenidos de muestras embrionarias o fetales de distintas especies (Lewis, 1915; Barrett, Barrett and Dribin, 1981; Brodie, Brody and Sampson, 1989; Grouelle *et al.*, 1991), pero también en cultivos generados a partir de muestras de animales adultos (Dennis and Kosnik, 2000; Smolina *et al.*, 2015), e incluso en cultivos aneurales de células humanas (Guo *et al.*, 2014). No obstante, también es posible incorporar una estimulación eléctrica, que además provoca un reordenamiento estructural, una mejora de la maduración de los miotubos y el aumento de la generación de fuerza y de la expresión de proteínas contráctiles y miogénicas (Brevet *et al.*, 1976; Dusterhoft and Pette, 1990; Connor, Irrcher and Hood, 2001; Khodabukus and Baar, 2012). Igualmente, se puede conseguir una respuesta contráctil mediante un aporte neuronal, co-cultivando las células miogénicas con explantes de médula espinal o con neuronas espinales, en condiciones que favorecen la formación

de uniones neuromusculares (Shimada, Fischman and Moscona, 1969; Frank and Fischbach, 1979; Kobayashi and Askanas, 1985; Mourkioti and Rosenthal, 2005; Das *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011; Son *et al.*, 2011; Umbach *et al.*, 2012; Demestre *et al.*, 2015; Vilmont *et al.*, 2016).

Con la idea de realizar estudios sobre la fisiología, la mecánica, la función y regulación muscular, la fisiopatología de diversas enfermedades y para el cribado de fármacos, se aspira a mimetizar y representar el músculo esquelético tridimensional. Para ello se integran varios de los conceptos mencionados previamente junto con la vascularización en un mismo sistema, ya que todos ellos se vuelven elementos clave para el ensamblaje de un tejido/órgano artificial funcional (Bursac, Juhas and Rando, 2015). Estos constructos, podrían utilizarse además para tratar pérdidas o enfermedades musculares a través de la implantación o el reemplazo del tejido dañado.

Basándose en estos conceptos se han generado diferentes sistemas de cultivo y construcciones musculares. La fabricación *in vitro* de músculo esquelético funcional se ha ido desarrollando a través de estrategias basadas en el uso de matrices proteicas, de tejidos descelularizados, electrohiladas o microestampadas, o de estrategias que prescindían de ellas, y cuenta hoy por hoy con innumerables planteamientos a la espera de dar el salto a su aplicación clínica (Klumpp *et al.*, 2010; Bach *et al.*, 2014; Mertens *et al.*, 2014; Ostrovidov *et al.*, 2014; Vigodarzere and Mantero, 2014; Smith *et al.*, 2016; Uquillas *et al.*, 2017). Además, los biomateriales pueden ser utilizados por sí solos o como instrumentos que liberan y suministran factores de crecimiento de manera controlada para activar y reclutar células del propio huésped y promover así la regeneración del músculo esquelético de forma endógena (Kwee and Mooney, 2017).

3.4.3 Células miogénicas primarias como material de partida

En cuanto a la fuente celular miogénica, existen multitud de opciones, entre las cuales destacan las células primarias. Los cultivos primarios proporcionan cultivos con características muy similares a las del tejido de origen y se consideran como el modelo más relevante a la hora de replicar y estudiar los procesos *in vivo* en un contexto *in vitro* (Stacey, 2006; Jedrzejczak-Silicka, 2017). Estos cultivos se caracterizan por ser cultivos de una mezcla de células disociadas directamente del tejido original humano o animal utilizando para ello la técnica del explante, o métodos enzimáticos o mecánicos. En este escenario, el estudio *in vitro* de las enfermedades musculares humanas se ha basado principalmente en cultivos celulares conseguidos a partir de biopsias humanas obtenidas por lo general para diagnóstico. Sin embargo, esta práctica clínica

conlleva molestias para el sujeto y en muchos casos es imposible obtener muestras viables para estudio por el estado degenerado del músculo, de modo que esta práctica se está intentando reemplazar en la medida de lo posible por otros métodos de diagnóstico menos invasivos como el estudio de patrones radiológicos obtenidos de imágenes por resonancia magnética (Mercuri *et al.*, 2007; Díaz-Manera *et al.*, 2016), el diagnóstico molecular a través de técnicas de secuenciación masiva realizadas previamente a la biopsia muscular (Greenberg and Walsh, 2005; Vasli and Laporte, 2013; Biancalana and Laporte, 2015; Schofield *et al.*, 2017) o el diagnóstico partiendo de biopsias más accesibles o menos traumáticas como pueden ser las biopsias de piel (Marbini *et al.*, 1995; Marbini, Bellanova, *et al.*, 1997; Marbini, Gemignani, *et al.*, 1997; Niiyama *et al.*, 2002; Tanveer *et al.*, 2009; Sharma, 2012). Por estas razones, en el caso concreto del estudio de enfermedades musculares y con vistas a desarrollar un sistema *in vitro* basado en células humanas, es importante encontrar vías alternativas al uso de biopsias musculares como material de partida para la obtención de células miogénicas primarias.

3.4.3.1 Diferenciación músculo-esquelética a partir de piel

La piel es un tejido complejo y con una alta capacidad regenerativa que representa una opción interesante como fuente de precursores por su accesibilidad y porque se puede biopsiar sin riesgo significativo asociado (**Figura 3.9**).

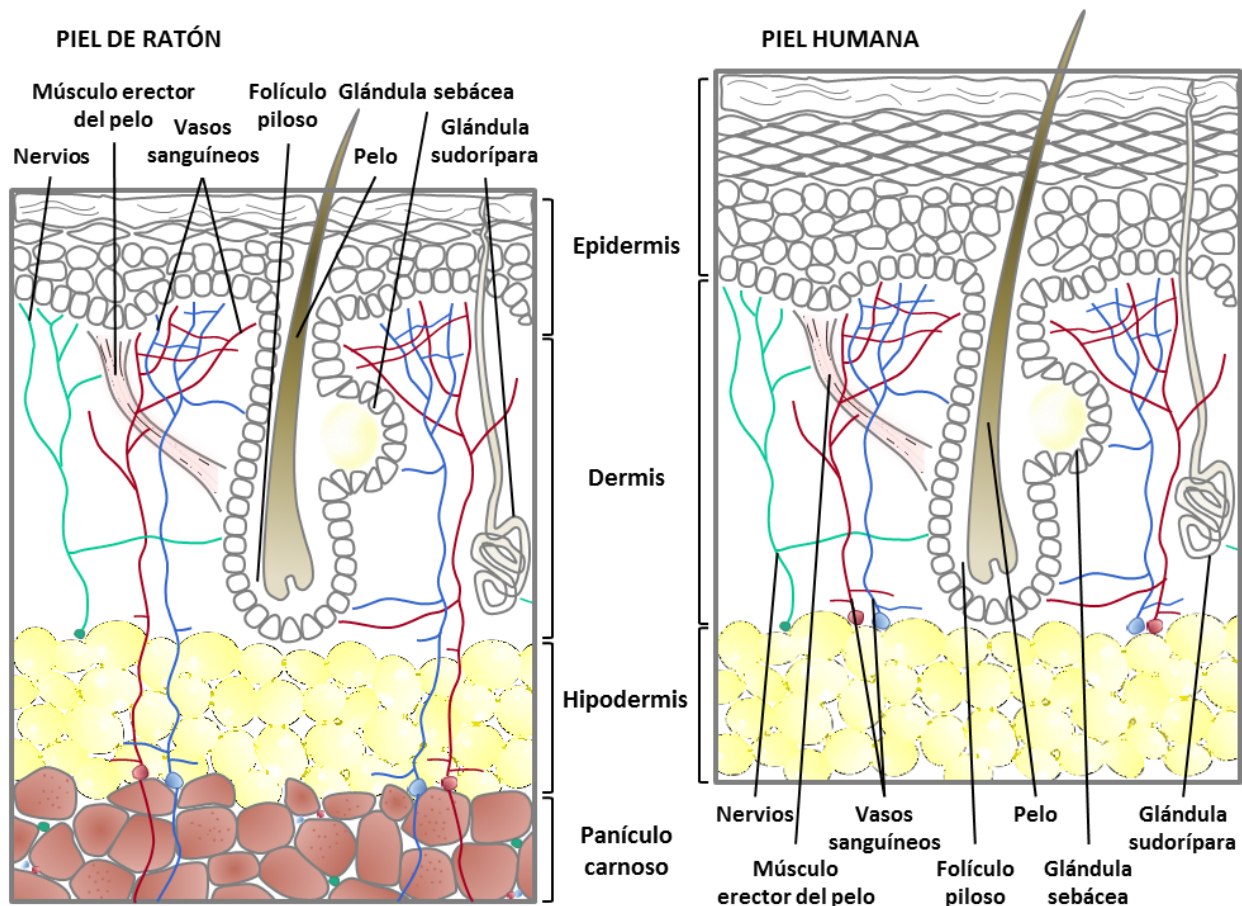


Figura 3.9. Representación de la piel de ratón y de la piel humana señalando su división en capas y las estructuras principales que contienen.

En la piel se pueden encontrar diferentes tipos de células madre con distintas potencialidades (Shi *et al.*, 2006; Sisakht *et al.*, 2015), además de diversas poblaciones celulares que en determinadas circunstancias presentan un potencial miogénico. Muchos trabajos se han centrado en el estudio de la conversión miogénica de fibroblastos de piel murina, describiendo su fusión en co-cultivo con células de la línea inmortalizada de mioblastos de ratón C2C12 (Salvatori *et al.*, 1995), con mioblastos control y con disgenesia muscular, mutación espontánea en el gen *mdg* que causa incapacidad de contraer los músculos en ratón (Pai, 1965; Adams and Beam, 1990). Esta fusión resultó en la recuperación de la capacidad de contracción y de la ultraestructura de los miotubos patológicos (Chaudhari, Delay and Beam, 1989; Courbin *et al.*, 1989). Esta conversión *in vitro* requiere cercanía entre los dos tipos celulares, pero no necesariamente fusión (Salvatori *et al.*, 1995), y se describió que es inducida por factores solubles secretados por los mioblastos (Wise, Watt and Jones, 1996), entre los cuales se estudió el papel positivo de galectina-1 en este proceso (Goldring, Jones and Watt, 2000; Goldring *et al.*, 2002). Asimismo, también se describió la

conversión miogénica de los fibroblastos de piel *in vivo*. En ratones *mdx* se observó la formación de fibras que expresaban la proteína distrofina, la proteína defectuosa en dicha enfermedad, tras el trasplante de estas células (Gibson *et al.*, 1995). También se pudo comprobar la expresión de genes exógenamente introducidos en los fibroblastos de piel dentro de las fibras musculares de ratones *mdx* tras su trasplante, por lo que se sugirió que podrían utilizarse para transportar genes de interés al tejido muscular patológico (Relvas *et al.*, 1997). Por último, se demostró que los fibroblastos de piel participaban en la formación de nuevas fibras musculares en ratones control en un ensayo *in vivo* donde se generaba un daño agudo para activar la regeneración (Pye and Watt, 2001). Hay que señalar que en todos estos trabajos se han empleado fibroblastos de piel obtenidos de embriones o de animales neonatales y que en ningún caso se ha estudiado este fenómeno en fibroblastos de piel adulta. Más tarde se describió el aislamiento de una subpoblación celular de la población de células madre hematopoyéticas llamada *side population* a partir de piel de ratón, población descrita inicialmente en la médula ósea y en el músculo esquelético (Goodell *et al.*, 1996; Gussoni *et al.*, 1999; Jackson, Mi and Goodell, 1999), que trasplantaron en ratones *mdx* y donde detectaron a esta población celular dentro de fibras musculares que expresaban la proteína distrofina (Montanaro *et al.*, 2003). Ruffault y colaboradores publicaron en el año 2006 un trabajo donde se centraban en el estudio del potencial miogénico y adipogénico de las células de la papila dérmica extraídas de piel bovina y mostraron que estas células eran capaces de fusionarse con células C2C12 y contribuir a la formación de miotubos *in vitro* en condiciones de co-cultivo (Ruffault *et al.*, 2006). Por otro lado, los precursores derivados de la piel (SKPs) fueron descritos como una población celular derivada de la cresta neural y residente en la dermis adulta de ratón y humana que contiene células multipotentes que presentan capacidad de diferenciación clonal a progenie neural y mesodérmica (Toma *et al.*, 2001, 2005). Dado que estas células podrían tener claras aplicaciones en medicina regenerativa por su fácil obtención y cultivo, muchos investigadores se han centrado en su uso en nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades degenerativas y otras patologías (Tunici *et al.*, 2006; Fernandes, Toma and Miller, 2008; Hunt, Jahoda and Chandran, 2009; Gutiérrez-Rivera *et al.*, 2012; Kwok, Tam and Ngan, 2013; Ke *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2015). En lo concerniente al potencial miogénico, se demostró la diferenciación miogénica de los SKPs de ratón *in vitro* y su incorporación al nicho de las células satélite *in vivo* (Qiu *et al.*, 2010). En ese mismo año Wakabayashi y colaboradores definieron tanto *in vitro* como *in vivo* que el potencial miogénico estaba delimitado a la población derivada de la dermis que no expresaba Sca-1 (Wakabayashi *et al.*, 2010). En cuanto a células de origen humano, se describieron unas células

madre derivadas de prepuccios de recién nacidos con características mesenquimales, que eran capaces de dar lugar a una diferenciación miogénica en unas nanofibras de policaprolactona (Somuncu *et al.*, 2015, 2016).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El estudio de diversas enfermedades neuromusculares requiere habitualmente del modelado *in vitro*, idealmente en cultivos tridimensionales. Algunos autores postulan la existencia de células precursoras miogénicas en la piel humana y de ratón que no están bien definidas. De confirmarse esta hipótesis, la definición del origen celular de los precursores miogénicos y el establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo tendrían una gran relevancia traslacional, ya que sería una alternativa relativamente sencilla y de baja morbilidad para el estudio de enfermedades neuromusculares.

La hipótesis que se plantea en este trabajo de tesis doctoral es que la miogénesis dérmica procede de la célula satélite del panículo carnoso, un músculo subcutáneo que podría estar contaminando los cultivos derivados de la piel de ratón. Dicho músculo, aunque es vestigial en el ser humano, tiene algunos remanentes que podrían tener un interés traslacional como fuente celular alternativa a la biopsia muscular con fines diagnósticos o terapéuticos.

Así, los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

- 1•** Desarrollar y caracterizar un modelo de diferenciación músculo-esquelética a partir de células precursoras aisladas de piel de ratón.
- 2•** Identificar la célula precursora miogénica de la piel de ratón.
- 3•** Determinar el origen embrionario del panículo carnoso de la piel del ratón.
- 4•** Establecer la aplicabilidad de los protocolos desarrollados a biopsias de piel y músculo humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Los materiales más relevantes utilizados en este trabajo se detallan en la siguiente tabla (Tabla 5.1) ordenados alfabéticamente, indicando la referencia y la casa comercial correspondientes.

Material	Referencia	Casa comercial
Aguja biselada intercambiable Hamilton	HA-7804-03	Teknokroma
Apósito estéril Tegaderm™	1622W	3M™
Bisturí (<i>Surgical scalpel blade No.23 sterile</i>)	0510	Swann-Morton
Capilares de vidrio de borosilicato Kimble™ 51	11873063	Fisher Scientific
Chamber Slide System Nunc™ Lab-Tek™ 8 well	177445	Thermo Fisher
Cubreobjetos rectangulares de vidrio Menzel-Gläser® 24x50 mm	11911998	Fisher Scientific
Cubreobjetos redondos de vidrio Menzel-Gläser® de 12 mm de diámetro	CB00120RA1	Fisher Scientific
Cuchillas para criostato MX35 ULTRA (<i>MX35 ULTRA Microtome blades</i>)	3053835	Thermo Fisher
Filtro para células de 70 µm (<i>70 µm Cell Strainer</i>)	431751	Corning®
Filtro para células de 40 µm (<i>40 µm Cell Strainer</i>)	431750	Corning®
Jeringa Hamilton serie 800	HA-7644-01	Teknokroma
Membranas de nitrocelulosa Amersham™ Protran™ 0,45 µm	10600002	GE Healthcare
Microarray Kit SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60K	G4852A	Agilent
Placa no tratada de 6 pocillos para cultivo celular (<i>6 well clear flat bottom not treated cell multiwell culture plate</i>)	351146	Corning®
Placa tratada Nunc™ de 4 pocillos para cultivo celular (<i>4 well round Nunc™ Cell-culture treated multidish</i>)	176740	Thermo Fisher
Portas para microscopio	631-1553	VWR
Portas para microscopio Superfrost™ Plus (<i>Superfrost™ Plus microscope slides</i>)	J1800AMNZ	Thermo Fisher
Portas para recuento celular para TC20™ (<i>Cell counting slides for TC20™</i>)	1450011	Bio-Rad
Sacabocados (<i>Biopsy punch</i>)	BC-BI-1500	Stiefel
Tubos Eppendorf® Safe-Lock Biopur® de 1,5 mL	0030121589	Eppendorf
Tubos Falcon® de poliestireno de 5 mL (<i>Falcon® 5 mL polystyrene round botton tubes, without cap, sterile</i>)	352052	Corning®
Tubos Falcon® de polipropileno de 5 mL (<i>Falcon® 5 mL polypropylene round botton tubes, with snap cap, sterile</i>)	352063	Corning®

Tabla 5.1. Materiales.

5.2 Reactivos

En la siguiente tabla (**Tabla 5.2**) se resumen los reactivos utilizados en los distintos experimentos de este trabajo ordenados alfabéticamente, indicando la referencia y la casa comercial correspondientes.

Reactivo	Referencia	Casa comercial
β -Mercaptoetanol	M3148	Sigma
5-Azacitidina	A2385	Sigma
Aminoactinomicina D 7 (<i>7-Aminoactinomycin D</i>) (7-AAD)	A9400	Sigma
Aceite de maíz	C8267	Sigma
Acetato de uranilo	22400	Electron Microscopy Sciences
Ácido acético glacial	141008	Panreac
Ácido cítrico anhídrido	141808	Panreac
Ácido clorhídrico 37% (HCl)	131020	Panreac
Ácido hialurónico de bajo peso molecular	GRL001	R&D
Agar (USP-NF) puro	141792	Panreac
Agua <i>RNase-Free</i>	129112	Qiagen
Albúmina sérica bovina (<i>Albumine from Bovine Serum</i>) (BSA)	A9418	Sigma
Analgésico <i>Vetergesic</i>	6822714	Sogeval
Azida de sodio (NaN ₃)	822335	Merck
Azul de Bromofenol	131165	Panreac
Azul de toluidina O	251176	Panreac
Cafeína	C0750	Sigma
Cardiotoxina (<i>Cardiotoxin from Naja mossambica mossambica</i>) (CTX)	C9759	Sigma
Cardiotoxina (<i>Cardiotoxin gamma from Naja pallida</i>) (CTX)	L8102	Latoxan
Cloroformo	102445	Merck
Cloruro de acetilcolina (ACh)	A6625	Sigma
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	C5080	Sigma
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	131396	Panreac
Cloruro de potasio (KCl)	131494	Panreac
Cloruro de sodio (NaCl)	131659	Panreac
Colagenasa tipo IA	C2674	Sigma
D-glucosa	G8270	Sigma
Dimetil sulfóxido (DMSO)	D2650	Sigma
Durcupan™ ACM	44610	Sigma

EGTA	E0396	Sigma
Etanol absoluto	251086	Panreac
Extracto de membrana basal Cultrex® (Cultrex)	3432-005-01	Trevigen
Factor de crecimiento epidérmico recombinante de rata (<i>recombinant rat Epidermal Growth Factor</i>) (rrEGF)	3214-EG	R&D
Factor de crecimiento fibroblástico básico recombinante de rata (<i>recombinant rat Fibroblast Growth Factor-2</i>) (rrFGF2)	3339-FB	R&D
Fluoro-Gel	17985-10	Electron Microscopy Sciences
Fungizone™ <i>antimycotic</i>	15290018	Gibco
Glicerol	G5516	Sigma
Glicina ≥ 99% (para electroforesis)	G8898	Sigma
HEPES	H4034	Sigma
Hidrocortisona	H0888	Sigma
Hidróxido de potasio (KOH)	P5958	Sigma
Hidróxido de sodio (NaOH)	141929	Panreac
Histamina dihidrocloruro (Histamina)	H7250	Sigma
Histofix®	256462	Panreac
Hoechst (<i>bisbenzimidide H 33258</i>)	B2883	Sigma
Inhibidor de proteasas cOmplete™, Mini, EDTA-free	11836170001	ROCHE
Isopentano (2-Metilbutano)	106056	Merck
Isopropanol	I9516	Sigma
Kit de adipogenesis	MAK040	Sigma
Kit de tinción del gen reportero β-galactosidasa	GALS	Sigma
Kit de transcripción reversa de ADN complementario de alta capacidad	4368814	Applied Biosystems
L-glutamina 200 mM	G7513	Sigma
Leche en polvo	70166	Sigma
Low Input Quick Amp Labeling Kit	5190-2305	Agilent
Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™	1610375	BioRad
Medio de montaje Shandon™ Consul-Mount™	9990441	Fisher Scientific
Metanol	221091	Panreac
miRNeasy Micro Kit	217084	Qiagen
miRNeasy Mini Kit	217004	Qiagen
Mowiol® 4-88	81381	Sigma
Netrina-4 recombinante de ratón (Netrina-4)	1132-N4	R&D
Netrina-G1a recombinante de ratón (Netrina-G1a)	1166-NG	R&D
Neurobasal™ A	10888022	Gibco
Nicotina	N3876	Sigma

Nifedipina	N7634	Sigma
O.C.T™ Compound Tissue-Tek®	4583	Sakura®
<i>Oil Red O</i>	O0625	Sigma
Paraformaldehído (DAC) puro	141451	Panreac
Persulfato de amonio (APS)	A3678	Sigma
QIAzol® <i>Lysis Reagent</i>	79306	Qiagen
Sacarosa	131621	Panreac
Sal de magnesio ATP (Mg-ATP)	A9187	Sigma
Sal de sodio hidratado GTP (Na-GTP)	G8877	Sigma
SDS	113760	Merck
Sodio fosfato di-básico	141679	Panreac
Sodio fosfato monobásico	141965	Panreac
Solución alcohólica 0,5% Bohmclorh® clorhexidina tópica naranja	731250	Bohm Lab
Solución de acrilamida/bis 30%	1610156	BioRad
Solución de anfotericin B	A2942	Sigma
Solución de EDTA sal disódica (EDTA)	E7889	Panreac
Solución de formaldehído 37%	818708	Merck
Solución de formalina 10%	HT5011	Sigma
Solución de glutaraldehído 25%	16210	Electron Microscopy Sciences
Solución de Hematoxilina de Harris	253949	Panreac
Solución de <i>Oil Red O</i> 0,5% en isopropanol	O1391	Sigma
Solución de paraformaldehído 4% (PFA)	157-4-100	Electron Microscopy Sciences
Solución de penicilina/estreptomina 100X (P/S)	P0781	Sigma
Solución de poli-L-ornitina 0,01% (PLO)	P4957	Sigma
Solución de rojo <i>Ponceau</i>	P7170	Sigma
Solución de sustrato de fosfatasa alcalina azul de membrana	AB0300	Sigma
Solución de Tripsina-EDTA 0,25%	T4049	Sigma
Solución dérmica de povidona iodada Betadine®	644625.6	Meda
Solución hidroalcohólica 1% de Eosina amarillenta	251301	Panreac
Solución salina tamponada de Hank (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>) (HBSS)	14175053	Gibco
Sonda de Ca ²⁺ Fura-2 AM	F1201	Thermo Fisher
Suero fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>) (FBS)	302020	ATCC
Suero de burro	017-000-121	Jackson Immuno Research
Suero de cabra	G9023	Sigma
Suplemento B27 50X	17504-044	Gibco

Suplemento de crecimiento bajo en suero (50X) (<i>Low Serum Growth Supplement (50X)</i>) (LSGS)	S00310	Gibco
Sustrato para <i>Western blot</i> SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	34076	Thermo Fisher
Tamoxifeno (TMX)	T5648	Sigma
Tampón fosfato salino (1X) pH 7,2 (<i>Phosphate-Buffered Saline (1X) pH7.2</i>) (PBS pH 7,2)	20012019	Gibco
Tampón fosfato salino (1X) pH 7,4 (<i>Phosphate-Buffered Saline(1X) pH7.4</i>) (PBS pH 7,4)	10010015	Gibco
Tampón fosfato salino (10X) (<i>Phosphate-Buffered Saline (10X)</i>) (PBS 1X)	44592	BioSystems
Tampón fosfato salino (10X) sin Ca ²⁺ ni Mg ⁺ (<i>Phosphate-Buffered Saline without Ca²⁺ and Mg⁺ (10X)</i>) (PBS 1X sin Ca ²⁺ ni Mg ⁺)	17-517Q	Lonza
TaqMan® <i>Gene Expression Master Mix</i>	4369016	Thermo Fisher
TEMED	1610800	BioRad
Tetrodotoxina (TTX)	1078	Tocris
Tetróxido de osmio	19190	Electron Microscopy Sciences
Tinción azul de Trypan 0,4%	T8154	Sigma
Tinción verde SYTOX®	S34860	Thermo Fisher
TO-PRO®-3 Iodide	T3605	Thermo Fisher
Tris	141940	Panreac
Triton® X-100	T8787	Sigma
Tubocurarina hidrocloreuro pentahidrato (d-tubocurarina, dTC)	T2379	Sigma
Tween® 20	142312	Panreac
QIAGEN <i>Plasmid Maxi Kit (25)</i>	12163	Qiagen

Tabla 5.2. Reactivos.

5.3 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para la detección de proteínas en las inmunofluorescencias se enumeran en las **Tablas 5.3 y 5.4**, los utilizados en los *Western blot* en las **Tablas 5.5 y 5.6**, y aquellos utilizados en las citometrías y para la separación celular por esta técnica en las **Tablas 5.7, 5.8, 5.9 y 5.10** y en el **Anexo I**. En todas ellas se especifica el antígeno contra el que reaccionan, la especie de producción, la reactividad de especies, el fluoróforo o la proteína conjugada, el clon, el isotipo, la referencia y la casa comercial correspondientes y la dilución empleada en los experimentos.

Antígeno	Especie de producción	Reactividad de especies*	Clon	Isotipo	Referencia	Casa Comercial	Dilución
β-III-TUBULINA	Conejo	H, Rn, R	Monoclonal	IgG	55685	Cell Signaling	1:250
DsRed	Conejo		Policlonal		632496	Clontech	1:1000
DISTROFINA	Ratón	H	Monoclonal	IgG2a	NCL-DYS3	Leica	1:20
GFP**	Pollo		Policlonal	IgY	ab13970	Abcam	1:200
GFP**	Cabra		Policlonal	IgG	ab6673	Abcam	1:500
LAMINA A/C	Conejo	H	Monoclonal	IgG	ab108595	Abcam	1:500
LAMININA	Conejo	H, Rn, R	Policlonal		L9393	Sigma	1:200
MYH3 (embrionaria)	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG1	F1.652	DSHB	1:50
MYHC (todas las isoformas)	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG2a	A4.1025	DSHB	1:200
MYHC I (fibras lentas)	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgM	A4.840	DSHB	1:200
MYHC II (fibras rápidas)	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG1	A4.74	DSHB	1:200
MYOD1	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG1k	M3512	Dako	1:50
MIOGENINA	Ratón	Rn, R	Monoclonal	IgG1k	F5D	DSHB	1:50
PAX7	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG1k	PAX7	DSHB	1:50
PERILIPINA	Conejo	H, Rn	Monoclonal	IgG	9349S	Cell Signaling	1:150
PPARγ	Conejo	H, Rn, R	Monoclonal	IgG	2435S	Cell Signaling	1:150
SERCA-1	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG1	MA3-912	Thermo Fisher	1:50
α-SMA	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG2a	A2547	Sigma	1:500

Tabla 5.3. Anticuerpos primarios empleados en las inmunofluorescencias.

*Se indican solamente estas especies: H: humano, Rn: ratón, R: rata.

**El anticuerpo contra GFP producido en pollo se utilizó para inmunofluorescencias en cortes histológicos y el producido en cabra en cambio para inmunofluorescencias en cultivos celulares.

Antígeno	Especie de producción	Fluoróforo/ Conjugado	Clon	Isotipo	Referencia	Casa Comercial	Dilución
IgY de pollo (H+L)	Cabra	DyLight® 488	Policlonal	IgG	ab96947	Abcam	1:500
IgG de cabra (H+L)	Burro	Alexa Fluor® 488	Policlonal	IgG	A11055	Thermo Fisher	1:500
IgG de ratón (H+L)	Burro	Alexa Fluor® 488	Policlonal	IgG	A21202	Thermo Fisher	1:500
IgG de ratón (H+L)	Burro	Alexa Fluor® 555	Policlonal	IgG	A31570	Thermo Fisher	1:500
IgM de ratón (H)	Cabra	Alexa Fluor® 488	Policlonal	IgG	A21042	Thermo Fisher	1:500
IgG de conejo (H+L)	Burro	Alexa Fluor® 488	Policlonal	IgG	A21206	Thermo Fisher	1:500
IgG de conejo (H+L)	Burro	Alexa Fluor® 555	Policlonal	IgG	A31572	Thermo Fisher	1:500
α -Bungarotoxina		Alexa Fluor® 555			B35451	Thermo Fisher	1:75

Tabla 5.4. Anticuerpos secundarios empleados en las inmunofluorescencias. En la última fila se añade un péptido conjugado fluorescente utilizado también en esta técnica.

Antígeno	Especie de producción	Reactividad de especies*	Clon	Isotipo	Referencia	Casa Comercial	Dilución
GAPDH	Cabra	H, Rn, R	Policlonal		sc-20357	Santa Cruz	1:1000
MYH3 (embrionaria)	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG1	F1.652	DSHB	1:1000
MYHC (todas las isoformas)	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG2a	A4.1025	DSHB	1:1000
MYOD1	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG1k	M3512	Dako	1:1000
MIOGENINA	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG1k	F5D	DSHB	1:500
PAX7	Ratón	H, Rn, R	Monoclonal	IgG1k	PAX7	DSHB	1:500
TROPONINA I, cardíaca	Ratón	Rn, R	Monoclonal	IgG2b	TI-1	DSHB	1:1000

Tabla 5.5. Anticuerpos primarios para *Western blot*.

*Se indican solamente estas especies: H: humano, Rn: ratón, R: rata.

Antígeno	Especie de producción	Fluoróforo/ Conjugado	Clon	Isotipo	Referencia	Casa Comercial	Dilución
IgG de cabra (H+L)	Burro	HRP	Policlonal		sc-2020	Santa Cruz	1:20000
IgG de ratón (H+L)	Conejo	HRP	Policlonal		P0260	DakoCytomation	1:20000

Tabla 5.6. Anticuerpos secundarios para *Western blot*.

Antígeno	Especie de producción	Reactividad de especies	Clon	Isotipo	Referencia	Casa Comercial	Dilución
BD Lyoplate™ Mouse Cell Surface Marker Screening Panel (véase Anexo I)	Rata, Ratón, Hamster Armenio, Hamster Sirio	Ratón	Monoclonal	Varios isotipos diferentes, véase Anexo I	562208	BD Biosciences	0,25 µg/test

Tabla 5.7. Anticuerpos primarios y control de isotipos utilizados por citometría de flujo en los experimentos con el BD Lyoplate™ Mouse Cell Surface Marker Screening Panel.

Antígeno	Especie de producción	Fluoróforo/ Conjugado	Clon	Isotipo	Referencia	Casa Comercial	Dilución
Ig de hamster Armenio (BD Lyoplate™)	Cabra	Biotina	Policlonal	Ig	562208	BD Biosciences	1:800
Ig de ratón (BD Lyoplate™)	Cabra	Biotina	Policlonal	Ig	562208	BD Biosciences	1:400
Ig de rata (BD Lyoplate™)	Cabra	Biotina	Policlonal	Ig	562208	BD Biosciences	1:400
Ig de hamster Sirio (BD Lyoplate™)	Cabra	Biotina	Policlonal	Ig	562208	BD Biosciences	1:400
Estreptavidina (BD Lyoplate™)	Algas verde- azuladas	Alexa Fluor® 647	-	-	562208	BD Biosciences	1:4000

Tabla 5.8. Anticuerpos secundarios conjugados utilizados por citometría de flujo en los experimentos con el BD Lyoplate™ Mouse Cell Surface Marker Screening Panel. En la última fila se añade una proteína conjugada fluorescente utilizada en esos mismos experimentos como agente terciario.

Antígeno	Especie de producción	Reactividad de especies	Fluoróforo/ Conjugado	Clon	Isotipo	Referencia	Casa Comercial	Dilución
SYNDECAN-4	Rata	Ratón	Biotina	Monoclonal	IgG2a	550351	BD Biosciences	1 µg/test
Control de isotipo	Rata	-	Biotina	Monoclonal	IgG2a,κ	553928	BD Biosciences	1 µg/test

Tabla 5.9. Anticuerpos primarios y control de isotipos conjugados utilizados en experimentos de separación celular por citometría de flujo.

Antígeno	Especie de producción	Fluoróforo/ Conjugado	Clon	Isotipo	Referencia	Casa Comercial	Dilución
Estreptavidina	Algas verde-azuladas	APC	-	-	554067	BD Biosciences	0,1 µg/test

Tabla 5.10. Proteína conjugada fluorescente utilizada en experimentos de separación celular por citometría de flujo como agente terciario.

5.4 Sondas para reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se estudió la expresión génica de determinados genes mediante el uso de las sondas referidas en la siguiente tabla (**Tabla 5.11**), todas ellas sondas TaqMan® de expresión génica de la casa comercial Applied Biosystems.

Gen	Referencia para ratón	Referencia para humano
<i>AdipoQ</i>	Mm00456425_m1	-
<i>Fabp4</i>	Mm00445878_m1	-
<i>Myf5</i>	-	Hs00929416_g1
<i>MyH2</i>	Mm01332564_m1	Hs00430042_m1
<i>MyH3</i>	Mm01332463_m1	Hs01074230_m1
<i>MyoD1</i>	Mm00440387_m1	Hs02330075_g1
<i>Miogenina</i>	Mm00446194_m1	Hs01072232_m1
<i>Pax7</i>	Mm01354484_m1	Hs00242962_m1
<i>Ppary</i>	Mm01184322_m1	-
<i>RyR1</i>	Mm01175211_m1	-
<i>RyR2</i>	Mm00465877_m1	-
<i>Tbp</i>	Mm00446973_m1	Hs00427620_m1

Tabla 5.11. Sondas TaqMan® de expresión génica.

5.5 Líneas de ratones

A continuación se enumeran en orden alfabético las diferentes cepas de ratones que se han empleado para la realización de los experimentos de este trabajo (**Tabla 5.12**), especificando los nombres completos y abreviados de las cepas y los códigos de las casas comerciales correspondientes junto con la referencia de la publicación donde se ha descrito la cepa.

La gestión y el mantenimiento de las colonias de los ratones que se albergaron en el Animalario del Instituto Biodonostia (señaladas con un punto negro) fue llevada a cabo por la Dra. Patricia García Parra, la Dra. Araika Gutiérrez Rivera y el personal de apoyo del animalario.

Nombre abreviado	Nombre completo	Número de stock de JAX ¹	Código de Charles River ²	Código de Harlan ³	Referencia bibliográfica
Act-RFP	B6.Cg-Tg(CAG-mRFP1)1F1Hadj/J	005884			(Long, Lackan and Hadjantonakis, 2005)
B195AP^{Cre} ●	BAC195AP-Cre				Esta tesis doctoral
B195APZ	BAC195APZ				(Carvajal, Cox, Summerbell and Rigby, 2001)
Bmi1^{CreER/+}	B6;129-Bmi1 ^{tm1(cre/ERT)Mrc} /J	010531			(Sangiorgi and Capecchi, 2008)
CD1	CrI:CD1(ICR)		022		
Cspg4^{Cre} ●	B6;FVB-Tg(Cspg4-cre)1Akik/J	008533			(Zhu, Bergles and Nishiyama, 2008)
Foxn1^{nu}	Hsd:Athymic Nude-Foxn1 ^{nu}			069(nu) 070(nu/+)	(Pantelouris, 1968)
Myf5^{CreSOR} ●	B6.129S4-Myf5 ^{tm3(cre)Sor} /J	007893			(Tallquist and Weismann, 2000)
NSG	NOD.Cg-PrKdc ^{sid} Il2rg ^{tm1 Wjl} /SzJ	005557			
Pax3^{Cre/+}	B6;129-Pax3 ^{tm1(cre)Joe} /J	005549			(Engleka <i>et al.</i> , 2005)
Pax3^{GFP/+}					(Relaix <i>et al.</i> , 2005)
Pax3^{IRESnLacZ/+}					(Relaix and Polimeni, 2003)
Pax7^{CreER2/+}	B6;129-Pax7 ^{tm2.1(cre/ERT2)Fan} /J	012476			(Lepper, Conway and Fan, 2009) (Lepper and Fan, 2011) (Lepper, Partridge and Fan, 2011)
R26R	FVB.129S4(B6)-Gt(ROSA)26Sor ^{tm1Sor} /J	009427			(Soriano, 1999)
R26R^{GFP-DTA/+}	Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(DTA)Pmb} /J	006331			(Ivanova <i>et al.</i> , 2005)
R26YFP ●	B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(EYFP)Cos} /J	006148			(Srinivas and Watanabe, 2001)
ROSA^{mTmG}	B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sor ^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo} /J	007676			(Muzumdar <i>et al.</i> , 2007)

Tabla 5.12. Cepas de ratones utilizadas.

¹<http://www.jaxmice.jax.org> ²<http://www.criver.com> ³<http://www.harlan.com>

5.6 Pacientes

Seguidamente se muestra información de los pacientes del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga que fueron donantes de material biológico utilizado en diversos experimentos de este trabajo (Tabla 5.13).

Paciente	Sexo	Edad	Consulta	Patología	Biopsia
1	Hombre	35	Urología	Quiste de cordón	Tejido no muscular
2	Hombre	26	Urología	Varicocele	Cremáster
3	Hombre	22	Urología	Varicocele	Cremáster
4	Hombre	64	Urología	Hidrocele	Tejido no muscular
5	Hombre	48	Urología	Hidrocele	Tejido no muscular
6	Hombre	50	Urología	Hidrocele	Cremáster
7	Hombre	31	Urología	Varicocele	Cremáster
8	Hombre	17	Urología	Varicocele	Cremáster
9	Hombre	20	Urología	Hidrocele	Cremáster
10	Hombre	35	Cirugía general	Hernia inguinal	Cremáster
11	Hombre	51	Cirugía general	Hernia inguinal	Cremáster
12	Hombre	71	Cirugía general	Hernia inguinal	Cremáster

Tabla 5.13. Pacientes.

5.7 Métodos

5.7.1 Generación del ratón transgénico *B195AP^{Cre}*

La línea transgénica de ratón *B195AP^{Cre}* fue generada por el grupo dirigido por el Dr. Jaime J. Carvajal (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Sevilla) en conformidad con las normas establecidas por el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero.

El constructo del cromosoma artificial bacteriano (BAC) *B195APZ* se modificó por técnicas de recombinación para obtener el constructo final de interés (Swaminathan *et al.*, 2001). Los clones de *B195APZ* se introdujeron en la línea bacteriana electrocompetente DY380 cedida por Neil Copeland (National Cancer Institute-Frederick, Maryland), que contiene un sistema recombinasa lambda inducible por temperatura. Por otro lado, se preparó el constructo del gen *Cre* uniendo dos brazos homólogos de 250 pares de bases generados por PCR y se electroporaron 10-100 ng de este

construido a las mismas células DY380 que contenían el constructo *B195APZ*. De este modo se reemplazó el gen *nlacZ* del *B195APZ* por el gen *Cre*. Tras el cultivo y amplificación de las células se identificaron los clones cointegrados a través de hibridaciones y mapas de restricción para luego volver a expandir las colonias seleccionadas y realizar más análisis para identificar fragmentos del locus modificado y de los brazos homólogos utilizados para la recombinación. Una vez seleccionado el clon de interés, el ADN del BAC se preparó utilizando el kit QIAGEN *Plasmid Maxi Kit* siguiendo las indicaciones del fabricante, pero utilizando 5 veces más volumen que el señalado de las soluciones del kit. El ADN fue eluido de las columnas con 15 mL de tampón de elución a 55°C y tras la diálisis fueron diluidas en el tampón de microinyección (Tris-HCl 10 mM a pH 7,5, EDTA 0,1 mM a pH 8, NaCl 100 mM) hasta una concentración final de 1,6 ng/mL. Esta solución se inyectó en los óvulos fertilizados de ratón a día 0 obtenidos de cruces entre ratones CBA/Ca y C57Bl/6 (Carvajal, Cox, Summerbell and Rigby, 2001; Carvajal, Keith and Rigby, 2008).

5.7.2 Material biológico

El material biológico utilizado en el presente trabajo se obtuvo de ratones de las cepas determinadas en la **Tabla 5.12** y de pacientes del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga detallados en la **Tabla 5.13**.

Los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal, Órgano Habilitado y la autoridad competente del Instituto Biodonostia, del CNB-CSIC y del INSERM según el caso, en conformidad con las normas establecidas por el Consejo Nacional de Protección Animal, con el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, con el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero, con la Ley 32/2007 de 7 de noviembre, con el Decreto francés 2013-118 de 1 de febrero y con la Directiva Europea 2010/63/EU de 22 de septiembre. Los animales utilizados fueron sacrificados mediante la inhalación de CO₂ de acuerdo a las recomendaciones contenidas en el Anexo III del RD 53/2013, y se realizó una dislocación cervical para confirmar su muerte.

Las biopsias humanas se obtuvieron tras el consentimiento informado previo y tras la aprobación del protocolo por parte del comité ético y científico del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y del Hospital Universitario Virgen de la Victoria, cumpliendo con las pautas legales y los principios éticos que regulan la experimentación con muestras biológicas humanas detalladas en la Ley 14/2007, en el Real Decreto 1716/2011, en el Convenio de Oviedo de 1997 y en la Declaración de Helsinki de 1964.

5.7.2.1 Biopsia de piel dorsal de ratón

Las muestras de piel se obtuvieron de ratones adultos de entre 8 y 10 semanas de edad, a menos que se especifique lo contrario. Tras el sacrificio del ratón se rasuró con cuidado toda la zona dorsal con una maquinilla eléctrica dejando la piel a la vista. Tras esta primera limpieza de la zona se procedió a desinfectarla con una solución alcohólica 0,5% (Bohmclorh® clorhexidina tópica naranja) y a afeitarla con una cuchilla de afeitar manual desechable, alternando los procedimientos repetidas veces hasta dejar la zona completamente libre de pelo. Por último, antes de proceder a la extracción de la biopsia, se aplicó una solución de povidona iodada Betadine® a la piel. Estos pasos ayudarán principalmente a minimizar el riesgo de contaminaciones en los cultivos celulares. Sirviéndose de unas pinzas y unas tijeras esterilizadas se separó desde la fascia un fragmento de piel de aproximadamente 2,5 cm x 4,5 cm de la zona dorsal más centrada y directamente se conservó o se procedió a su procesamiento, según el fin de cada experimento.

5.7.2.2 Biopsia de músculo tibial anterior (TA) de ratón

Las muestras de músculo se obtuvieron de ratones adultos de entre 8 y 10 semanas de edad, a menos que se especifique lo contrario. Tras el sacrificio del ratón se desinfectó la extremidad posterior a diseccionar con una solución alcohólica 0,5% (Bohmclorh® clorhexidina tópica naranja). Seguidamente se descubrieron los músculos cortando y retirando la piel por completo desde el pie hasta por encima de la rodilla. Con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras finas se liberó el músculo TA, removiendo la fascia y cortándolo desde sus tendones y conservándolo o procediendo a su procesamiento de manera inmediata según la finalidad de cada experimento.

5.7.2.3 Biopsia de músculo cremáster humano

Todas las biopsias de músculo cremáster y de tejido adyacente no muscular fueron facilitadas por el grupo dirigido por el Dr. Bernardo Herrera Imbroda y por la Dra. María Fernanda Lara Cabanas desde el Hospital Universitario Virgen de la Victoria y fueron directamente enviadas al Instituto Biodonostia tras el procedimiento quirúrgico. Las muestras se obtuvieron en el contexto de cirugía rutinaria urogenital sin añadir comorbilidad al proceso a partir de pacientes admitidos según los siguientes criterios de inclusión y de exclusión: los pacientes fueron pacientes masculinos

sometidos a una intervención de hidrocele o varicocele o de hernia inguinal de los servicios de Urología y Cirugía General respectivamente, excluyéndose pacientes con patología uro-oncológica o procesos que afectasen a la zona escrotal.

Tras la adecuada preparación de la zona a operar y en condiciones de asepsia se realizó una incisión inguinal por donde se extrajo del área inguinoescrotal una biopsia de aproximadamente 1 cm² de músculo cremáster o bien de tejido no muscular que directamente se conservó según la finalidad de cada experimento y se preparó para su transporte.

5.7.3 Histología

5.7.3.1 Análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET)

El análisis por MET fue realizado por el grupo dirigido por el Dr. José Manuel García Verdugo (Laboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia).

La biopsia se procesó para su posterior análisis por MET cortándola en secciones de 1 mm de grosor y fijándolas por inmersión en un volumen 20 veces superior a la muestra de una solución al 2% de paraformaldehído y 2,5% de glutaraldehído (10 gr de paraformaldehído en 200 mL de H₂O destilada + 50 mL de sodio fosfato monobásico 0,2 M + 200 mL de sodio fosfato di-básico 0,2 M + 50 mL de glutaraldehído 25%). Las muestras se mantuvieron en esta solución durante 6 días, renovándola por completo al tercer día. Las muestras fueron fijadas en el Instituto Biodonostia y enviadas al Instituto Cavanilles, y una vez allí se lavaron un mínimo de tres veces en PBS (pH 7,4) y se trataron con una solución al 2% de tetróxido de osmio en PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 2 horas a temperatura ambiente (RT). Posteriormente se lavaron con agua destilada, se deshidrataron mediante soluciones de concentración creciente de etanol (30%, 50%, 70%, 96% y 100%) y se contrastaron con una solución al 2% de acetato de uranilo en etanol al 70% durante 2 horas. Tras concluir la deshidratación, las muestras se incluyeron en Durcupan™ ACM y una vez polimerizado se procedió a obtener cortes semifinos de 1,5 µm de grosor con una cuchilla de diamante utilizando un ultramicrotomo EM UC6 (Leica). Los semifinos fueron teñidos con azul de toluidina O al 1% a 70°C y analizados bajo un microscopio óptico modelo ECLIPSE E800 (Nikon). Para analizar las muestras bajo un microscopio electrónico de transmisión modelo Spirit (FEI, Tecnai) se obtuvieron secciones ultrafinas de 60-70 nm, las cuales se contrastaron con citrato de plomo. Las imágenes se tomaron con la cámara digital modelo "Morada" (Soft Imaging System, Olympus).

5.7.3.2 Detección de β -galactosidasa

La expresión del gen *LacZ* se detectó con el kit de tinción del gen reportero β -galactosidasa antes de criopreservar y preparar la muestra para su análisis. Así, las muestras fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% durante 40 minutos a RT. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS (pH 7,2) al 0,02% de Tween® 20 antes de la incubación en solución X-gal del kit, sustrato de la enzima β -galactosidasa, durante 3 horas a 37°C y en oscuridad, y luego toda la noche (ON) a 4°C y en oscuridad. Tras este paso las muestras se lavaron en PBS 1X y fueron deshidratadas dejándolas durante 3 horas en agitación y en oscuridad en una solución al 10% de sacarosa, después ON a 4°C y en oscuridad en una solución al 20% de sacarosa para criopreservarlas seguidamente.

5.7.3.3 Detección de fosfatasa alcalina

La detección de la actividad de la fosfatasa alcalina se realizó con la solución de sustrato de fosfatasa alcalina azul de membrana antes de criopreservar y preparar la muestra para su análisis. Así, las muestras fueron fijadas con PFA 4% ON a 4°C. Tras este periodo de tiempo se enjuagaron dos veces dejándolas 10 minutos en una solución de PBS 1X suplementado con cloruro de magnesio 2 mM (PBSMg). Las fosfatasas endógenas fueron eliminadas incubando las muestras en PBSMg durante 1 hora a 65°C, se lavaron con tampón de fosfatasa alcalina frío a 4°C (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, 0,1% de Tween® 20 en H₂O destilada) y fueron transferidas a la solución de tinción de fosfatasa alcalina (mezcla 1:1 de los reactivos), dejándolas 40 minutos a 4°C, en oscuridad y en agitación. La reacción se detuvo lavando las muestras en PBS 1X suplementado con EDTA 2 mM frío a 4°C durante 16 horas en oscuridad y a 4°C. Por último, las muestras se lavaron en PBS 1X y fueron deshidratadas dejándolas durante 3 horas en agitación y en oscuridad en una solución al 10% de sacarosa, después ON a 4°C y en oscuridad en una solución al 20% de sacarosa para criopreservarlas seguidamente.

5.7.3.4 Procesamiento de la biopsia para criopreservación

La biopsia muscular o de piel se cortó a su vez en trozos más pequeños de unos 0,25 cm² y dependiendo del protocolo de análisis a utilizar *a posteriori* se aplicó un tratamiento previo a la criopreservación o fueron directamente criopreservadas.

En caso de tratarlas previamente, las muestras se pre-fijaron en solución fijadora de Histofix® o de PFA 4% ON a 4°C y en agitación. Transcurrido este tiempo y después de lavar las muestras en PBS 1X tres veces, estas fueron sumergidas en una solución al 5% de sacarosa donde se dejaron durante 5 horas a 4°C y en agitación, para después sumergirlas en una solución al 20% de sacarosa dejándolas otra vez ON a 4°C y en agitación, finalizando así el tratamiento previo de las muestras.

Para la criopreservación, cada muestra de manera individual se colocó en un soporte de corcho embebida en O.C.T. y seguidamente se congeló sumergiéndola de manera súbita en isopentano previamente enfriado en nitrógeno líquido, asegurándose así la congelación uniforme y simultánea de toda la muestra. Las muestras criopreservadas se guardaron a -80°C.

5.7.3.4.1 Preparación de muestras histológicas criopreservadas y su análisis

Para poder analizar las muestras criopreservadas, estas se cortaron en secciones de 7 o 10 micras de grosor en un criostato CM 1950 (Leica) y fueron depositadas sobre portas Superfrost™ Plus. Las muestras procesadas previamente para la detección de la β -galactosidasa o de la fosfatasa alcalina se cortaron en secciones de 60 micras y se montaron con glicerol para facilitar la detección de los compuestos. Dependiendo del objetivo del experimento se realizaron cortes transversales o longitudinales del tejido. En algunos casos en los que era necesario analizar la biopsia por completo o gran parte de ella se siguió un método esquematizado a la hora de realizar los cortes para facilitar el análisis de las muestras y para que el tejido o la biopsia estuvieran representados de forma sintetizada y accesible en un solo porta. A modo de ejemplo, en el caso de realizar secciones de una biopsia por completo, se comenzó por establecer el número de portas a utilizar y su distribución por filas y columnas para luego realizar cortes seriados. Se empezó por distribuirlos a lo largo de la primera fila y al término de esta primera serie de secciones se desgastaron unas 50 o 100 micras de la muestra y se volvió a repetir el proceso colocando la segunda serie de secciones. Se repitió este procedimiento sucesivamente colocando no más de 6 series de secciones por porta y completando todas las filas de portas hasta cortar toda la biopsia (**Figura 5.1**).

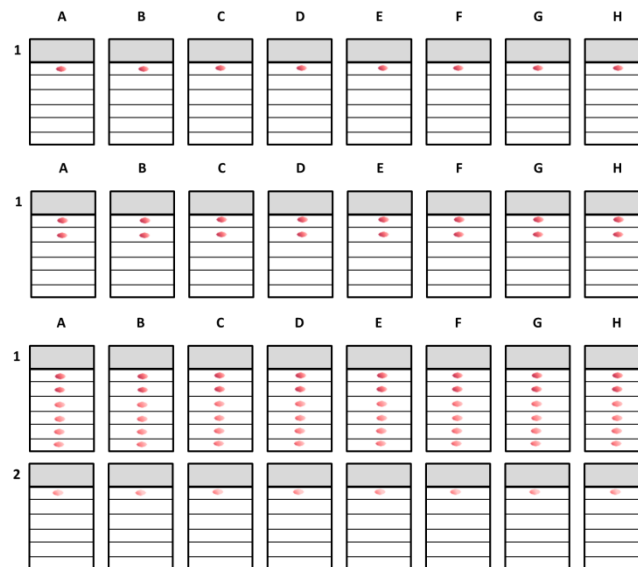


Figura 5.1. Ejemplo del esquema de portas y la distribución de los cortes seriados para el estudio de una biopsia completa.

Mediante este esquema de distribución de los cortes de una muestra, el resultado del análisis de un solo porta, o más bien de una columna entera, sería representativo de gran parte de la biopsia, obteniendo así más información de un único análisis. A su vez, este esquema facilitó la búsqueda de zonas de interés dentro de la biopsia, comenzando a analizar la muestra por columnas hasta encontrar la zona de interés, y una vez localizada se prosiguió analizando esa zona (o adyacentes a esa misma zona) a lo largo de la fila seleccionada, ya que esa área se mantendría en los siguientes cortes de los portas de la misma fila, pudiendo realizar diferentes ensayos a cada uno de los portas (**Figura 5.2**).

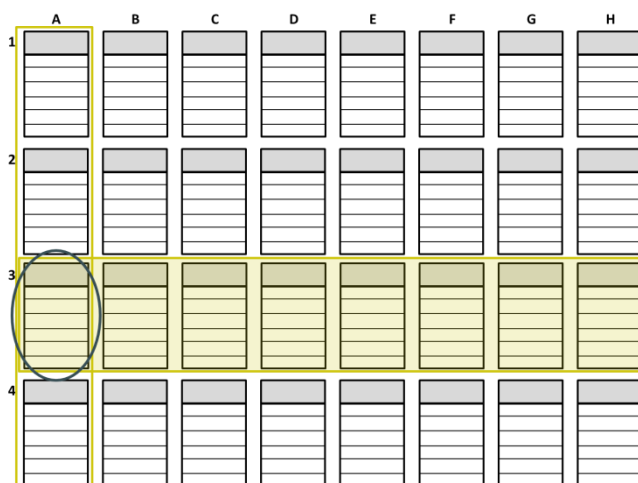


Figura 5.2. Ejemplo del procedimiento de análisis de las muestras. Del análisis de la columna A (recuadro amarillo) se selecciona el porta de interés (A3, círculo) y se prosigue con el estudio de los portas de esa misma fila para obtener los resultados finales (3, recuadro sombreado amarillo).

Específicamente, las muestras se analizaron de la siguiente forma:

(I) En el experimento de la contribución de las células derivadas de la médula ósea al PC se obtuvo una biopsia de piel de cada ratón que se procesó tal y como se ha descrito dejando una diferencia de aproximadamente 100 μm entre corte y corte de un mismo porta. Para el recuento de las fibras totales de la biopsia de piel se analizó 1 corte aleatorio de cada porta de una misma columna de 6 portas en total y se realizó un promedio de los valores obtenidos, y para el recuento de las fibras positivas para la incorporación de las células trasplantadas se examinaron todos los cortes de entre 3 y 5 columnas aleatorias calculando también un promedio de los recuentos realizados. Finalmente se realizó el promedio de estos valores finales obtenidos de los 3 ratones para obtener el porcentaje final de la incorporación celular.

(II) En el caso del estudio del papel fisiológico del PC en homeostásis y en respuesta a herida se escogió una muestra aleatoriamente de las 6 muestras disponibles de cada condición y de cada ratón, y se procesó de manera similar a la descrita, pero sin llegar a procesar toda la muestra por completo. Para las cuantificaciones de la intensidad de la fluorescencia se escogió un porta adyacente a los portas utilizados para otros análisis y se examinaron todos los cortes calculando el promedio de los valores obtenidos para obtener el valor final correspondiente a cada ratón para luego representar el promedio de esos valores finales obtenidos de los 3 ratones de cada grupo de estudio.

(III) En el ensayo *in vivo* para estudiar el potencial regenerativo de las células de ratón trasplantadas se procesó el TA entero de cada ratón tal y como se ha explicado, de manera que se analizó una columna entera con el fin de encontrar las fibras regeneradas por las células trasplantadas. A la hora de cuantificar esta contribución, para evitar contar una misma fibra repetidas veces debido a su extensión, se consideró como valor final de la contribución el número máximo de fibras positivas contadas en un solo corte. También se calculó el porcentaje que suponían estas fibras positivas respecto a las fibras totales de ese corte para tener una idea de la extensión de esta contribución.

(IV) En el ensayo *in vivo* para testar el potencial regenerativo de las células humanas trasplantadas se procesó igualmente el TA entero de cada ratón y se realizaron distintos análisis por columnas para estudiar su contribución. En este caso se cuantificó el número de células humanas

incorporadas y que habían sobrevivido calculando el promedio entre dos valores resultantes cada uno de ellos de la suma de los valores obtenidos al cuantificar todos los cortes de una columna entera. Se calculó a su vez cuántas de las células humanas presentaban características de células madre, calculando el porcentaje correspondiente entre la suma total de células humanas y la suma total de aquellas con características de células madre cuantificadas en una columna entera. Por último se cuantificó la contribución de estas células humanas a la regeneración de las fibras considerando como valor final el número máximo de fibras positivas contadas en un solo corte, evitando así contar una misma fibra repetidas veces.

5.7.3.5 Estudio de las muestras histológicas criopreservadas

5.7.3.5.1 Observación de proteínas fluorescentes

Las proteínas fluorescentes presentes en las muestras histológicas se observaron directamente a través de un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara Nikon Digital Sight y analizadas mediante el *software* de Nikon NIS-Elements Advance Research. A su vez, la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de las imágenes obtenidas de estas muestras se realizó con el programa *ImageJ*.

5.7.3.5.2 Tinción de Hematoxilina-Eosina

El estudio de las características morfológicas generales de las muestras incoloras obtenidas a partir de las criosecciones se realizó a través de la tinción doble de Hematoxilina-Eosina. Para este procedimiento se utilizaron los reactivos preparados como solución de Hematoxilina de Harris (filtrado antes de cada uso) y solución hidroalcohólica 1% de Eosina amarillenta. Como paso previo a la tinción, las muestras descongeladas se introdujeron en alcohol de 96° durante unos 6 segundos o 4 pases para fijar el tejido al porta. Tras el mismo tiempo de lavado con agua de grifo se dejaron en Hematoxilina durante 1 minuto, seguidamente se lavaron varias veces con agua caliente de grifo nueva cada vez hasta que no tuviera un color rojo, para luego ser introducidas en Eosina sólo 3 veces. A partir de este punto las muestras se fueron limpiando y deshidratando pasándolas a través de soluciones repetidas de alcohol de 96° (x2), de alcohol de 100° (x2) y de xilol (x2), sumergiéndolas 4 veces en cada cubeta de solución. Las muestras se montaron una vez bien

secadas con un trapo dejándolas caer encima de unos cubreobjetos con una línea de medio de montaje Shandon™ Consul-Mount™.

5.7.3.5.3 Inmunofluorescencia

La detección de proteínas de interés por inmunofluorescencia en las muestras histológicas se realizó utilizando cuatro protocolos dependiendo de la naturaleza de la proteína a detectar.

(I) El protocolo que se utilizó en las muestras en las que se quería detectar las proteínas fluorescentes YFP y GFP se puso a punto con la ayuda de la Dra. María Goicoechea. Las muestras fueron tratadas previamente a ser criopreservadas con solución fijadora de Histofix® y con soluciones de sacarosa tal y como se detalla en el apartado **5.6.2.4**. Una vez preparados los cortes histológicos y de que estuvieran descongelados se fijaron con metanol durante 3 minutos y tras los lavados con PBS 1X se permeabilizaron con PBS (pH 7,2) al 0,1% de Triton® X-100 durante 20 minutos a RT. Seguidamente se saturaron los posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos durante 30 minutos a RT con la solución de bloqueo de PBS (pH 7,2) al 10% de suero del mismo animal que el de producción de los anticuerpos secundarios que se utilizaran. Se descartó la solución de bloqueo para añadir el anticuerpo primario en la solución de bloqueo dejándolo ON a 4°C. En el caso de tener más de un anticuerpo primario, la incubación se hizo por separado en solución de bloqueo, primero se incubó uno ON a 4°C y al día siguiente se incubó el segundo durante 1 hora a RT. Después de lavar esta solución, las muestras se incubaron con la solución de bloqueo con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a RT y se procedió a eliminar todo exceso de anticuerpo secundario con PBS 1X.

(II) En el caso del reportero fluorescente RFP, el procesamiento previo a la criopreservación fue con PFA 4% y con soluciones de sacarosa tal y como se detalla en el apartado **5.6.2.4**. Los cortes histológicos descongelados fueron directamente permeabilizados con una solución de PBS (pH 7,2) al 0,5% de Triton® X-100 durante 15 minutos a RT para después bloquearlos con una solución de PBS (pH 7,2) al 10% de FBS durante 2 horas a RT. Tras el bloqueo se incubaron con la solución de permeabilización con los anticuerpos primarios, en este caso todos juntos, dejándolos ON a 4°C. Al término de esta incubación y de lavarlas nuevamente con PBS 1X, las muestras se incubaron con la solución de permeabilización con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a RT y después se procedió a eliminar todo exceso de anticuerpo secundario con PBS 1X.

(III) Para la detección de la proteína PAX7, las muestras fueron criopreservadas directamente sin necesidad de aplicar ningún procesamiento previo. Los cortes histológicos descongelados se fijaron con PFA 4% durante 20 minutos a RT y se lavaron con PBS 1X antes del tratamiento con ácido cítrico (2,1 gr/L pH 6) para el desenmascaramiento antigénico, que consistió en calentar las muestras sumergidas en la solución en el microondas a máxima potencia hasta que comenzara a hervir. Se dejaron enfriar antes de bloquearlas durante 1 hora a RT con una solución de PBS (pH 7,2) al 8% de BSA, al 0,5% de Tween® 20 y al 0,1% de Triton® X-100, tras el cual se incubaron ON a 4°C con la solución de PBS (pH 7,2) al 1% de BSA con los anticuerpos primarios. Las muestras se lavaron con PBS 1X antes de la incubación con la solución PBS (pH 7,2) al 1% de BSA con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a RT y se lavaron nuevamente con PBS 1X.

(IV) En otros casos, las muestras fueron criopreservadas directamente sin aplicar ningún procesamiento previo y los cortes histológicos descongelados se fijaron con PFA 4% durante 10 minutos a RT. Las muestras se lavaron bien con PBS 1X antes de añadir la solución de bloqueo de PBS (pH 7,2) al 5% de BSA incubándolos 45 minutos a RT. Tras un lavado con PBS 1X las muestras se dejaron con una solución de PBS (pH 7,2) al 1% de BSA con los anticuerpos primarios ON a 4°C. Tras este tiempo, las muestras se lavaron bien con PBS 1X antes de la incubación con la solución de PBS (pH 7,2) al 1% de BSA con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a RT y se lavaron nuevamente con PBS 1X.

En los cuatro protocolos, tras el último lavado, los núcleos fueron teñidos con solución Hoechst a 10 µg/mL durante 2 minutos a RT para después lavar las muestras con PBS 1X, seguidas de agua destilada y agua Milli-Q®, y secarlas ayudándose del vacío para montarlas con *Fluoro-Gel*.

Finalmente, las muestras fueron examinadas bajo un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara Nikon Digital Sight y analizadas mediante el *software* de Nikon NIS-Elements Advance Research. En las imágenes obtenidas se realizaron diversas cuantificaciones con el programa *ImageJ*. Tras este primer estudio de las muestras, algunas de ellas se analizaron posteriormente por microscopía confocal en un microscopio LSM510 Meta (Zeiss) acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) y las imágenes tomadas se analizaron con dos *software*, Zeiss LSM510 versión 4.2 y ZEN 2008 sp2.

La lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados y sus diluciones concretas se detallan en las **Tablas 5.3 y 5.4**.

5.7.4 Cultivos celulares

5.7.4.1 Preparación de la ECM como soporte para cultivo en adhesión

5.7.4.1.1 Reactivos

Los reactivos necesarios para la preparación de la matriz extracelular se detallan en la siguiente tabla (**Tabla 5.14**) donde se especifican las concentraciones utilizadas.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
PBS pH 7,4	-	-
Netrina-4	100 µg/mL	0,83 µg/mL
Netrina-G1a	100 µg/mL	0,83 µg/mL
Ácido hialurónico de bajo peso molecular	50 mg/mL	2,5 mg/mL
Extracto de membrana basal Cultrex®	* mg/mL variable según el lote	2,77 mg/mL

Tabla 5.14. Composición de la matriz extracelular.

5.7.4.1.2 Elaboración

La matriz extracelular se elaboró tal y como se explica a continuación basándose en resultados previos del grupo (García-Parra *et al.*, 2012).

La solución de matriz extracelular se preparó teniendo en cuenta la concentración del extracto de membrana basal Cultrex® (Cultrex) dependiente del lote del producto. Siempre se trató de utilizar el máximo volumen posible del bote de Cultrex, ya que los procesos de descongelación-congelación afectan al estado del producto. Por tanto, con cada nuevo lote de una concentración de proteínas concreta se ajustó el volumen final de la solución para mantener la concentración final necesaria de Cultrex. En base a este dato del volumen final se ajustaron los volúmenes del resto de los compuestos. En todos los casos se preparó una solución de matriz extracelular a una dilución 1:3, preparando primero una mezcla para disolver los reactivos (equivalente al 1 de la dilución 1:3) y después añadiendo el volumen necesario de PBS (pH 7,4) como diluyente a la mezcla para obtener la solución final (equivalente al 2 resultante del cálculo de la dilución 1:3). En función del experimento a realizar se preparó una matriz extracelular con todos los reactivos mencionados o

una matriz extracelular sin la presencia de Netrina-4 y Netrina-G1a, ajustando en este último caso el volumen de PBS (pH 7,4) que se utilizaría primero para disolver y mezclar los compuestos.

Dado que los compuestos utilizados son termosensibles, con el fin de mantener su integridad y evitar una polimerización prematura, todos los reactivos se descongelaron gradualmente y se mantuvieron en hielo durante todo el proceso junto a la solución de matriz extracelular en preparación. De modo que tras reconstituir y descongelar todos los compuestos se preparó la solución de mezcla en un Falcon® de 50 mL que se mantuvo en hielo, siguiendo siempre el orden indicado en la **Tabla 5.14**, y seguidamente se añadió el PBS (pH 7,4) como diluyente. Esta solución final fue agitada suavemente con cuidado de no formar burbujas para obtener una mezcla homogénea. A continuación, la matriz extracelular recién preparada se depositó en forma de gota (300 µl/pocillo) en placas estériles de 4 o 24 pocillos en los que previamente se habían colocado cubreobjetos autoclavados y se esparció inclinando la placa para formar una película uniforme. Una vez depositada la matriz, las placas se mantuvieron durante 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se retiró el exceso de líquido acumulado en los pocillos y se dejaron secar en la campana de flujo laminar durante 15 minutos para así obtener el sustrato deseado. Por último, las placas se guardaron a 37°C para su uso inmediato y se desecharon pasados los 2 meses. De no ser así, las placas se guardaron en condiciones de esterilidad a 4°C por un tiempo máximo de 6 meses.

5.7.4.2 Preparación de la poli-L-ornitina (PLO) como soporte para cultivo en adhesión

La solución de poli-L-ornitina 0,01% (PLO), al tratarse de un compuesto termosensible, se mantuvo en frío durante la preparación del sustrato para conservarla en buen estado. En este caso se utilizó directamente la solución *stock* de PLO, sin diluirla o mezclarla con otros reactivos. De modo que se fue depositando una gota de PLO (300 µl/pocillo) en placas estériles de 4 o 24 pocillos en los que previamente se habían colocado cubreobjetos autoclavados y se esparció inclinando la placa para formar una película uniforme. La solución depositada se incubó durante 5 minutos a RT antes de retirar el exceso de PLO y lavar con PBS (pH 7,2) dos veces como mínimo. Este soporte estuvo listo para su uso tras 1 día de secado a 37°C.

5.7.4.3 Aislamiento de células a partir de biopsias de piel dorsal y músculo TA de ratón y de biopsias de músculo cremáster humanas

5.7.4.3.1 Reactivos

Los reactivos empleados durante el aislamiento de las células se detallan en la siguiente tabla (**Tabla 5.15**) especificando las concentraciones utilizadas.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
HBSS	-	-
Fungizone™	250 µg/mL de anfotericina B y 205 µg/mL de desoxicolato de sodio	2% (5 µg/mL de anfotericina B y 4,1 µg/mL de desoxicolato de sodio)
Penicilina / estreptomicina (P/S)	10.000 unidades/mL de penicilina y 10 mg/mL de estreptomicina	2% (200 unidades/mL de penicilina y 0,2 mg/mL de estreptomicina)
Colagenasa tipo IA	*Actividad unidades/mg <i>Solid (Collagen)</i> variable según el lote	Actividad de 2100 unidades/mL

Tabla 5.15. Reactivos utilizados en el aislamiento celular.

5.7.4.3.2 Protocolo

De manera previa a la extracción de las biopsias se prepararon la solución de almacenamiento de la muestra, que consistía en 50 mL por muestra de HBSS suplementado con 2% de Fungizone™ y 2% de P/S para evitar contaminación por bacterias, hongos y levaduras; y la solución de colagenasa tipo IA en HBSS según las pautas descritas en la **Tabla 5.15**, que se guardó filtrada y en alícuotas a -20°C hasta que fuera a ser utilizada. Así, inmediatamente después de extraer la biopsia tal y como se describe en los apartados **5.6.1.1**, **5.6.1.2** y **5.6.1.3**, esta se introdujo en la solución de almacenamiento de la muestra, se agitó el tubo para la adecuada oxigenación del tejido y se dejó reposar unos 15 minutos en hielo o bien se envió en frío al laboratorio, por lo que el procesamiento de estas muestras se prosiguió al día siguiente del envío. Tras este tiempo, la biopsia se limpió de tejido graso y se troceó manualmente con la ayuda de unas pinzas esterilizadas y un bisturí quirúrgico hasta reducirlo a fragmentos de 4 mm² aproximadamente. Seguidamente, estos trozos de tejido se introdujeron en una solución de colagenasa tipo IA, en 12 mL las procedentes de piel y en 8 mL las procedentes de los músculos, y fueron sometidas a una digestión enzimática a 37°C y en agitación a 180 rpm durante 2 horas en caso de partir de piel, durante 1 hora y 45 minutos al tratarse de músculo TA y durante 1 hora y 15 minutos las biopsias de músculo

humanas. Tras esta incubación, para reducir la actividad de la colagenasa se diluyó la solución con PBS (pH 7,2), HBSS o bien con el medio de cultivo para cultivo de células en suspensión descrito en el apartado 5.6.3.4. La suspensión resultante fue filtrada a través de un filtro para células de 40 µm eliminando de esta forma pelos, restos de tejido no digerido y demás residuos tisulares para después centrifugar el filtrado durante 5 minutos a 1500 rpm para concentrar las células obtenidas. Este pellet de células fue procesado de una manera u otra dependiendo del objetivo de cada experimento.

5.7.4.4 Cultivo de células en suspensión: formación de esferas

5.7.4.4.1 Medio de cultivo

El medio utilizado para el cultivo de células en suspensión fue el siguiente: medio Neurobasal™ A suplementado con 2% de suplemento B27 50X, 1% de L-glutamina 200 mM y 1% de solución de penicilina/estreptomicina 100X. Además, para este tipo de cultivo se añadieron diversos factores de crecimiento directamente a cada pocillo de la placa a las concentraciones establecidas en la siguiente tabla (**Tabla 5.16**).

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Factor de crecimiento epidérmico recombinante de rata (rrEGF)	Resuspendido en Ácido acético 10 mM 0,1% albúmina sérica bovina (BSA) filtrada a 10 µg/mL	40 ng/mL
Factor de crecimiento fibroblástico básico recombinante de rata (rrFGF2)	Resuspendido en HBSS 0,1% albúmina sérica bovina (BSA) filtrada a 10 µg/mL	80 ng/mL
Suplemento de crecimiento bajo en suero (50X) (LSGS)	Solución concentrada a 50X de varios compuestos	2% (1X)

Tabla 5.16. Factores de crecimiento para el cultivo celular en suspensión.

5.7.4.4.2 Protocolo

El precipitado celular resultante del aislamiento celular (apartado 5.6.3.3) se resuspendió en 1 mL de medio para cultivo en suspensión y se realizó un recuento y control de la viabilidad celular en el Automated Cell Counter TC20™ (BioRad) antes de traspasarlo a un pocillo de las placas no tratadas de 6 pocillos, donde se añadió más medio para cultivo en suspensión hasta 5 mL. Si el recuento de células viables resultaba ser menor que 500.000 células/mL, estas se traspasaban a un pocillo de menor tamaño, de placas no tratadas de 12 pocillos, y se ajustaban los volúmenes de

medio y de factores en proporción a lo establecido. Estas placas evitan la adhesión de las células y favorecen la formación de esferas celulares. En este punto se añadieron directamente al pocillo en las concentraciones indicadas los factores de crecimiento detallados en la **Tabla 5.16**. Las células se mantuvieron en la incubadora a 37°C y con 5% de CO₂. Los primeros 3 días se cambió el medio por completo mediante centrifugación (5 minutos a 1500 rpm) para ir limpiando el cultivo de restos celulares e ir seleccionando las células viables, y se añadieron los factores de crecimiento de nuevo cada vez. Después, estos lavados se hicieron cada 2 días y el cultivo se mantuvo generalmente hasta los 7 o 9 días, cuando la formación de esferas celulares ya es muy notoria y se destinaron a diferentes procesamientos según el experimento a realizar. La observación de la evolución del cultivo y las imágenes/videos se obtuvieron a través de la cámara digital D90 (Nikon) acoplada al microscopio óptico Eclipse TS100 (Nikon).

5.7.4.5 Cultivo de células en adhesión: diferenciación celular

5.7.4.5.1 Medio de cultivo

El medio empleado para el cultivo de células en adhesión fue el mismo medio destinado al cultivo en suspensión (Neurobasal™ A suplementado con 2% de suplemento B27 50X, 1% de L-glutamina 200 mM y 1% de solución de penicilina/estreptomicina 100X), en este caso suplementado además con 10% de suero fetal bovino (FBS).

5.7.4.5.2 Protocolo

El cultivo en adhesión daba comienzo al término del cultivo en suspensión, como norma general a los 7 días de formación de esferas. De modo que, como continuación del apartado **5.6.3.4**, una vez eliminado el medio utilizado para el cultivo en suspensión mediante una centrifugación de 5 minutos a 1500 rpm, las esferas agregadas en pellet fueron resuspendidas en 1 mL de solución de Tripsina-EDTA 0,25% y disgregadas manteniéndolas unos 5-7 minutos a 37°C para obtener una suspensión de células únicas con el objetivo de poder contarlas, depositarlas separadamente y conseguir una diferenciación más homogénea. La acción enzimática se detuvo diluyendo la solución con PBS (pH 7,2) y eliminándolo tras una centrifugación de 5 minutos a 1500 rpm para luego resuspender el pellet de células en 1 mL de medio para cultivo en adhesión y contar el número de células viables que se han conseguido en el Automated Cell Counter TC20™ (BioRad).

Con esto se distribuyó la misma cantidad de células en cada pocillo, por lo general en placas de cultivo de 4 pocillos, poniendo 79.000 células por cm^2 (150.000 células por pocillo); donde previamente se había depositado un sustrato que facilita la adhesión y promueve la diferenciación celular (ECM o PLO) y se había añadido medio para este cultivo hasta 500 μl . Estas células se mantuvieron así en la incubadora a 37°C y con 5% de CO_2 , dejándolas reposar los primeros 2 días para después ir renovando la mitad del medio con medio fresco cada 2 días hasta el punto final determinado por cada tipo de experimento. La observación de la evolución del cultivo y las imágenes/videos se obtuvieron con la cámara digital D90 (Nikon) acoplada al microscopio óptico Eclipse TS100 (Nikon).

5.7.5 Caracterización celular

5.7.5.1 Procesamiento celular y análisis por MET

El análisis por MET fue realizado por el grupo dirigido por el Dr. José Manuel García Verdugo (Laboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia).

Tanto las células en cultivo de suspensión como las adheridas fueron analizadas por MET a distintos días de cultivo. En el primer caso, las esferas lavadas con PBS (pH 7,4) fueron fijadas resuspendiéndolas en 1mL de una solución al 3,5% de glutaraldehído (50% de PBS (pH 7,4), 14% de glutaraldehído 25% y 36% de H_2O destilada) calentada a 37°C y dejándolas 1 hora a esa temperatura. Después de este tiempo y de 3 lavados con PBS (pH 7,4) centrifugando cada vez durante 10 minutos a 1500 rpm para eliminar las soluciones, las esferas fueron embebidas en 1% de agar en H_2O destilada y conservadas a 4°C hasta su envío al Instituto Cavanilles. Por otro lado, los cultivos en adhesión destinados al análisis por MET fueron cultivados en *Chamber Slides* de 8 pocillos, ajustando las cantidades de sustrato, de medio de cultivo y de número de células a este tipo de placas teniendo en cuenta los datos establecidos en los respectivos apartados (5.6.3.1 y 5.6.3.5). En este caso, las células en cultivo de adhesión se fijaron con una solución al 2% de paraformaldehído y al 2,5% de glutaraldehído (10 gr de paraformaldehído en 200 mL de H_2O destilada + 50 mL de sodio fosfato monobásico 0,2 M + 200 mL de sodio fosfato di-básico 0,2M + 50 mL de glutaraldehído 25%) calentada a 37°C y dejándolas 1 hora a RT para después dejarlas 24 horas a 4°C . Transcurrido este tiempo se lavaron con PBS (pH 7,4) durante 30 minutos 4 veces antes de ser enviadas al Instituto Cavanilles. Una vez allí, tanto las esferas como las células se trataron

con una solución al 2% de tetróxido de osmio en PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 2 horas a RT y a partir de aquí se prosigió de la misma manera que en el apartado **5.6.2.1**.

5.7.5.2 Detección de β -galactosidasa

La expresión del gen *LacZ* se detectó con el kit de tinción del gen reportero β -galactosidasa. Utilizando los reactivos del kit y siguiendo las instrucciones del mismo, las esferas o las células puestas a diferenciar se lavaron con PBS (pH 7,2) y fueron fijadas con el fijador durante 10 minutos a RT. Se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS (pH 7,2) antes de la incubación con la solución de tinción a 37°C y en oscuridad durante 1 hora y 15 minutos las esferas y durante 1 hora las células adheridas, hasta que las células se tiñeron de color azul. Las células se observaron y se tomaron fotografías a través de la cámara digital Nikon D90 acoplada al microscopio óptico Nikon Eclipse TS100. Las células teñidas se conservaron embebidas o cubiertas por glicerol al 70% en etanol a 4°C.

5.7.5.3 Detección de fosfatasa alcalina

La detección de la actividad de la fosfatasa alcalina se realizó con la solución de sustrato de fosfatasa alcalina azul de membrana. Así, las esferas o las células cultivadas en adhesión se lavaron con PBS (pH 7,2) antes de fijarlas con formaldehído 3,7% durante 2 minutos a RT. Una vez eliminado el fijador se añadió directamente la solución de tinción de fosfatasa alcalina (mezcla 1:1 de los reactivos) dejándola durante 20 minutos las esferas y durante 50 minutos las células adheridas a RT y en oscuridad, hasta que las células se tiñeron de color azul. Las células se observaron y se tomaron fotografías a través de la cámara digital Nikon D90 acoplada al microscopio óptico Nikon Eclipse TS100. Las células teñidas se conservaron embebidas o cubiertas por glicerol al 70% en etanol a 4°C.

5.7.5.4 Tinción *Oil Red O*

La tinción cualitativa de adipocitos con *Oil Red O* se realizó en células cultivadas en adhesión. Tras 3 lavados con PBS (pH 7,2), las muestras se fijaron con solución de formalina 10% durante 15 minutos a RT. Seguidamente se lavaron 3 veces con PBS (pH 7,2) para añadir la solución de tinción *Oil Red O* 0,5% en isopropanol y dejarlas durante 30 minutos a 37°C. Después de 3

lavados con H₂O destilada se tomaron fotografías de las muestras teñidas con la cámara digital Nikon D90 acoplada al microscopio óptico Nikon Eclipse TS100

5.7.5.5 Tinción cuantitativa de *Oil Red O*

5.7.5.5.1 Reactivos

La solución *stock* se preparó disolviendo 0,35 gr de *Oil Red O* en 100 mL de isopropanol 100% y filtrándola para conservarla a RT. Para disponer de la solución de trabajo se mezclaron 6 mL de la solución *stock* con 4 mL de H₂O destilada, se dejó reposar durante 20 minutos a RT y se filtró de nuevo.

5.7.5.5.2 Protocolo

La cuantificación de adipocitos mediante la tinción de *Oil Red O* se aplicó en cultivos de células en adhesión. Tras un lavado con PBS (pH 7,2), las células se fijaron con formalina 10% durante 10 minutos a RT tras lo cual se renovó la solución fijadora para dejarla 2 horas a RT. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con H₂O destilada y después con isopropanol al 60% durante 5 minutos a RT, para luego dejar secar las muestras completamente a RT. Tras esta preparación las muestras se tiñeron con la solución de trabajo de *Oil Red O* durante 10 minutos a RT, se lavaron con H₂O destilada tres veces para que estuvieran listas para sacar fotografías con la cámara digital Nikon D90 acoplada al microscopio óptico Nikon Eclipse TS100, y se dejaron secar antes de eluir la tinción con isopropanol 100% durante 10 minutos a RT y en agitación. A continuación se leyó la absorbancia del eluido a 500 nm utilizando el isopropanol 100% como blanco en el equipo Multiskan Ascent Plate Reader (Thermo Fisher).

5.7.5.6 Cuantificación de triglicéridos

A través de un ensayo enzimático, siguiendo las instrucciones del kit de adipogénesis, se determinó la cantidad de triglicéridos presentes en los cultivos de células en adhesión. Después de lavar las muestras con PBS (pH 7,2) se utilizó 132 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ (250 μL por pocillo de placas de 4 pocillos) del *Lipid Extraction Buffer* dejándolo durante 30 minutos a 90-100°C. Se dejó enfriar la placa agitándola durante 1 minuto a RT. Todas las muestras y controles se analizaron por duplicado en una placa de 96 pocillos y se prepararon a su vez 3 diluciones de cada muestra (1:1, 1:10, 1:100) en

un volumen final de 50 μ L con el *Adipogenesis Assay Buffer* para asegurar que los datos estuvieran dentro de la curva estándar. Se prepararon los estándares, también por duplicado, a partir de la *Standard Solution* 0,2 mM (20% de *Triglyceride Standard* 1 mM y 80% de *Adipogenesis Assay Buffer*) poniendo 0, 2, 4, 6, 8 y 10 nmol/pocillo de estándares y ajustándolos a un volumen final de 50 μ L con el *Adipogenesis Assay Buffer*. Para la reacción se añadieron 2 μ L/pocillo de *Lipase Solution* y se dejó incubar durante 10 minutos a RT. Se preparó la solución de reacción (*Master Reaction Mix*: 92% de *Adipogenesis Assay Buffer*, 2% de *Adipogenesis Probe* y 2% de *Adipogenesis EnzymeM Mix*) para añadir 50 μ L/pocillo y dejar durante 30 minutos a RT, en agitación y en oscuridad. Al final se midió la absorbancia del producto colorimétrico obtenido a 570 nm en el equipo Multiskan Ascent Plate Reader (Thermo Fisher).

5.7.5.7 Inmunofluorescencia

La detección de proteínas de interés por inmunofluorescencia en células cultivadas en suspensión se realizó con un primer paso de adhesión, depositando las células o las esferas celulares en un volumen pequeño encima de un soporte adecuado (ECM o PLO) y dejándolas durante unas horas (como máximo un día) dentro de la incubadora a 37°C y con 5% de CO₂. Una vez adheridas al sustrato, los siguientes pasos fueron en común con el protocolo de inmunofluorescencia aplicado para las células cultivadas en adhesión. Las muestras se fijaron con PFA 4% durante 10 minutos a RT y tras varios lavados con PBS (pH 7,2) se añadió una solución para una permeabilización y un bloqueo de posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos conjunta, que consistía en PBS (pH 7,2) al 0,3% de Triton® X-100 con un 5% de suero del mismo animal que el de producción de los anticuerpos secundarios que se utilizaran, dejándola durante 1 hora a RT. Transcurrido este tiempo se incubaron los anticuerpos primarios en PBS (pH 7,2) al 0,3% de Triton® X-100 ON a 4°C, después con los anticuerpos secundarios en PBS (pH 7,2) al 0,3% de Triton® X-100 durante 1 hora a RT y para finalizar se tiñeron los núcleos con la solución Hoechst a 10 μ g/mL durante 2 minutos a RT, lavando siempre las muestras 3 veces con PBS (pH 7,2) después de cada una de estas incubaciones. Estas muestras se montaron con Mowiol®4-88 para analizarlas bajo un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara Nikon Digital Sight y mediante el *software* de Nikon NIS-Elements Advance Research. En las imágenes obtenidas se realizaron diversas cuantificaciones con el programa *ImageJ*. Tras este primer estudio de las muestras, algunas de ellas se analizaron posteriormente por microscopía confocal en un

microscopio LSM510 Meta (Zeiss) acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) y las imágenes tomadas se analizaron con dos versiones de *software*, Zeiss LSM510 versión 4.2 y ZEN 2008 sp2.

La lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados y sus diluciones concretas se detallan en las **Tablas 5.3** y **5.4**.

5.7.5.8 Extracción de proteínas

Tanto la extracción de proteínas como su posterior análisis por *Western blot* se realizó con la ayuda de la Dra. María Goicoechea. Se extrajeron proteínas a partir de células cultivadas tanto en suspensión como en adhesión, y de biopsias de músculo esquelético y cardíaco congeladas como se describe en el apartado **5.6.2.4**, que sirvieron como muestras control. Para lisar y extraer las proteínas a partir de las muestras celulares cultivadas en suspensión, estas se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos a RT y se guardaron a -80°C sin el sobrenadante. Al día siguiente se trataron con el tampón de lisis (Tris-HCl 4,5 mM, 15% de SDS, 5% de β -mercaptoetanol, 20% de glicerol, 0,005% de azul de bromofenol, 1 pastilla de cOmplete™, *Mini*, EDTA-free *Protease Inhibitor Cocktail*) añadiendo 100 μL /2.000.000 de células y desnaturalizándolas a 100°C durante 5 minutos. Después el lisado se pasó a través de una jeringa de 1 mL para aligerar la solución antes de centrifugarla a 1500 rpm durante 10 minutos a RT y guardar el sobrenadante a -80°C . Partiendo de muestras de células cultivadas en adhesión, después de un lavado con PBS (pH 7,2) se añadieron 53 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ (100 μL por pocillo de placas de 4 pocillos) de tampón de lisis directamente a los pocillos de la placa y las células de 2 pocillos se recogieron con la pipeta en un solo tubo para desnaturalizarlas y procesarlas igual que antes. En el caso de partir de biopsias de tejido criopreservadas, las muestras se pesaron rápidamente en una balanza de precisión manteniéndolas en frío con hielo seco para luego añadir tampón de lisis en un volumen 19 veces mayor que el peso de la muestra. Seguidamente se homogeneizaron en el equipo TissueLyser (Qiagen) en presencia de una esfera de acero a 30 Hz durante 30 segundos varias veces, dejándolas 1 minuto en hielo entre ciclo y ciclo, hasta la total disgregación de la muestra. Tras el último ciclo, las muestras se dejaron reposar en hielo durante 5 minutos, hasta que desapareciera la espuma. Después se transfirieron a tubos nuevos para separarlos de la esfera de acero y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 100°C y en agitación. Por último se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos para luego guardar el sobrenadante a -80°C .

5.7.5.9 Análisis de proteínas por *Western blot*

5.7.5.9.1 Reactivos

Estas son las soluciones y distintos tampones empleados en el análisis de proteínas por *Western blot* (Tabla 5.17).

Solución	Composición
Gel de apilamiento de acrilamida al 3%	3% de acrilamida/bis-acrilamida, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, 5% de glicerol, 0,2% de SDS, 0,07% de APS, 0,15% de TEMED
Gel de resolución de acrilamida al 8%	8% de acrilamida/bis-acrilamida, Tris-HCl 420 mM pH 8,8, 11% de glicerol, 0,2% de SDS, 0,02% de APS, 0,04% de TEMED
Gel de resolución de acrilamida al 4% (Para proteínas de alto peso molecular)	4% de acrilamida/bis-acrilamida, Tris-HCl 420 mM pH 8,8, 11% de glicerol, 0,2% de SDS, 0,02% de APS, 0,04% de TEMED
Solución de bloqueo	TBST 1X, 5% de leche en polvo
Solución desteñidora	40% de metanol, 10% de ácido acético
Solución para anticuerpos primarios	TBST 1X, 5% de BSA, 0,02% de NaN ₃
Tampón de electroforesis 10X	0,3% de Tris, 14,4% de glicina, 1,5% de SDS
Tampón de transferencia 5X	0,3% de Tris, 14,4% de glicina, 0,05% de SDS
TBS 10X	Tris 0,5 M, NaCl 2 M
TBST 1X	TBS 1X, 0,1% de Tween® 20

Tabla 5.17. Soluciones empleadas en el *Western blot*.

5.7.5.9.2 Protocolo

Como primer paso para el análisis de las proteínas extraídas, estas se separaron en base a su tamaño mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida de 1,5 mm de grosor, cargando 15 µL de cada homogeneizado procedente de células, 5 µL de cada homogeneizado procedente de tejido y 7,5 µL del marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis 1X a 50 mA durante 30 minutos y a 100 mA durante 1 hora en equipos Mini-PROTEAN 3 Cell (BioRad). Como segundo paso, las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Amersham™ Protran™ de 0,45 µm de grosor, previamente mojadas en tampón de transferencia 1X durante 10 minutos. La transferencia se realizó en tampón de transferencia 1X a 90 V durante 45 minutos y colocando un bloque de hielo en el equipo Mini Trans-blot (BioRad). Una vez pasado este tiempo se realizó una tinción específica como control del proceso con solución rojo *Ponceau* y se aclararon con agua para comprobar que la

transferencia se había realizado correctamente. Por último, la detección de las proteínas se realizó por inmunodetección, incubando la membrana de nitrocelulosa en solución de bloqueo durante 1 hora para evitar hibridaciones inespecíficas de los anticuerpos. Tras realizar 3 lavados rápidos y 1 de 5 minutos en agitación con TBST 1X, la membrana se incubó con el anticuerpo primario en solución para anticuerpos primarios durante 2 horas a RT u ON a 4°C. Transcurrido este tiempo y después de realizar 3 lavados de 30 segundos y otros 3 de 10 minutos en agitación con TBST 1X, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 1 hora a RT y en agitación. Después, la membrana se lavó de nuevo 3 veces durante 30 segundos con TBST 1X y 2 veces más durante 10 minutos con PBS 1X y se procedió al revelado utilizando el sustrato para *Western blot* SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate.

La lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados y sus diluciones concretas se detallan en las **Tablas 5.5** y **5.6**.

5.7.5.10 Extracción de ARN

Parte de las extracciones de ARN y su posterior análisis por PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en colaboración con la Dra. Ana Aiastui. La extracción de ARN se realizó a partir de células cultivadas tanto en suspensión como en adhesión y también de biopsias de músculo esquelético y cardíaco congeladas como se describe en el apartado **5.6.2.4**, que sirvieron como muestras control en algunos experimentos. Para el análisis posterior por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), la extracción de ARN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit *miRNeasy Mini Kit* (purificación de microARN y ARN total de tejidos y células). Para el análisis del transcriptoma completo se partió de muestras celulares separadas por citometría de flujo y la extracción de ARN se realizó siguiendo las instrucciones del kit *miRNeasy Micro Kit* (purificación de microARN y ARN total de muestras pequeñas de tejido y células). En ambos casos se utilizó el equipo QIAcube (Qiagen) y se procedió de manera similar.

Partiendo de muestras celulares, estas se transfirieron a tubos Eppendorf® Safe-Lock Biopur® *RNase free*, se añadió Qiazol® en un volumen final de 700 µL a cada muestra y se guardaron a -80°C durante un mínimo de 2 horas. Después, una vez descongeladas, se añadieron 140 µL de cloroformo a cada muestra, se voltearon manualmente y se agitaron durante 15 segundos en un agitador tipo vórtex para luego dejarlas reposar 2 o 3 minutos. En el caso de las

biopsias de tejido, también se transfirieron a tubos Eppendorf® Safe-Lock Biopur® *RNase free*, se añadió Qiazol® en un volumen final de 700 µL a cada muestra, pero sin ser congeladas, se homogeneizaron mecánicamente con una esfera de acero en el equipo TissueLyser (Qiagen), en dos ciclos de 30 segundos a 30 Hz, dejándolas durante 1 minuto en hielo entre ciclo y ciclo, hasta la total disgregación del tejido. Después del último ciclo se mantuvieron unos 5 minutos en hielo y se pasaron a tubos Eppendorf® Safe-Lock Biopur® *RNase free* nuevos para separarlos de la esfera de acero. Seguidamente se añadió 140 µL de cloroformo a cada muestra y se agitaron manualmente de forma vigorosa durante 15 segundos para luego dejarlas reposar 2 o 3 minutos. A partir de este punto se procedió de igual manera con las muestras celulares y las de tejido, centrifugándolas a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, tras lo cual, se observaron tres fases bien diferenciadas. Se recogió la fase acuosa en tubos autoclavados y se colocaron en la maquina QIAcube junto al resto de materiales y reactivos necesarios y se procedió a la extracción automatizada de ARN para finalmente obtener 30 µL de las muestras definitivas. Se midió la cantidad y pureza del ARN obtenido en el NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer (Thermo), en el que un ratio de absorbancia A260/A280 de entre 1,8 y 2,0 se consideró como puro, y las muestras se almacenaron a -80°C.

5.7.5.11 Análisis de ARN

5.7.5.11.1 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

El ARN extraído se convirtió en ADN complementario (ADNc) mediante una PCR de transcripción reversa (RT-PCR) con el kit de transcripción reversa de ADN complementario de alta capacidad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se retrotranscribieron 1,25 µg de ARN total de cada muestra, mezclándolo con los diferentes componentes del kit en un volumen final de 50 µL y con este programa (**Tabla 5.18**).

25°C	10 minutos (primera extensión)
37°C	120 minutos (retrotranscripción)
85°C	5 minutos (inactivación y desnaturalización)
4°C	Indefinido

Tabla 5.18. Programa utilizado para la RT-PCR.

Una vez obtenido el ADNc de las muestras a analizar, estas se conservaron a -20°C hasta su uso. La RT-qPCR de estas muestras se realizó en la máquina 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y se utilizaron sondas TaqMan® de expresión génica (**Tabla 5.11**) en solución TaqMan® *Gene Expression Master Mix*, mezclando $0,5\ \mu\text{L}$ y $5\ \mu\text{L}$ por pocillo respectivamente. Se añadieron $20,2\ \text{ng}$ de ADNc en agua *RNase-Free* en un volumen final de $4,5\ \mu\text{L}$ por pocillo, siendo así $10\ \mu\text{L}$ el volumen final de reacción por pocillo. Cada muestra se amplificó por triplicado en la placa de ensayo. Las condiciones de PCR fueron las siguientes (**Tabla 5.19**).

95°C	10 minutos	
95°C	15 segundos	x 40 ciclos
60°C	1 minuto	

Tabla 5.19. Programa utilizado para la RT-qPCR.

En algunos casos, la cantidad relativa de la expresión de un gen concreto se determinó por el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak and Schmittgen, 2001). En otros experimentos se representó la expresión relativa a la expresión del gen endógeno escogido o bien los datos se representaron en un gráfico de amplificación, teniendo en cuenta la magnitud de la señal generada y los ciclos transcurridos.

5.7.5.11.2 Análisis del transcriptoma

Los resultados del transcriptoma se obtuvieron en el Institut National des Sciences Appliquées, Université de Toulouse, en colaboración con el grupo dirigido por Véronique Anton-Leberre.

En este caso, el ARN fue controlado también por el Bioanalyzer 2100 Expert (Agilent) para después utilizar $25\ \text{ng}$ como muestra de partida para la síntesis de ARN etiquetado mediante el kit *Low Input Quick Amp Labeling Kit* y para el análisis de expresión génica basado en el *microarray* de un color, siguiendo el protocolo y las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN etiquetadas se hibridaron a los *Microarray Kit SurePrint G3 Mouse GE 8x60K*, las plataformas se escanearon en el escáner Tecan MS200 (Tecan) y fueron analizadas por el *software* Feature Extraction versión 11.5.1.1.

Con los datos obtenidos se realizaron distintos análisis en colaboración con el Dr. Marcos J. Araúzo Bravo responsable del grupo de Biología Computacional del Instituto Bionostia.

Los diversos datos se compararon entre sí, pero además, se realizó una comparación masiva entre estos datos y los resultados de diversos *arrays* publicados en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO). La información relativa a estos *arrays* se detalla en el **Anexo II, Tabla 10.4**. En cuanto a la forma de representar los datos resultantes se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Duda, Hart and Stork, 2000); también se representaron como *heat map*, donde cada valor individual se representa en colores; como diagramas de Venn para representar las relaciones de intersección, inclusión y disyunción de las muestras sin cambiar la posición relativa de los conjuntos; mediante gráficas de dispersión mostrando un conjunto de puntos que representan el grado de correlación entre dos muestras o variables analizadas; y a través de un agrupamiento jerárquico utilizando el método de la correlación métrica y del enlace promedio.

5.7.5.12 Análisis electrofisiológico

Todos los estudios electrofisiológicos se realizaron por el grupo dirigido por el Dr. Antonio G. García (Instituto Teófilo Hernando de I +D del Medicamento, Hospital Universitario de La Princesa, Universidad Autónoma de Madrid).

Las propiedades electrofisiológicas de los cultivos celulares en adhesión se analizaron generalmente tras 10 días de cultivo mediante técnicas de registro por fijación de membranas o *patch-clamp*. Esta técnica se basa en la distribución asimétrica de iones a ambos lados de cualquier membrana de una célula viva, lo que establece una diferencia de potencial entre ambos compartimentos intracelular y extracelular. En este sistema la resistencia en un pequeño parche de membrana se mantuvo constante, de modo que en respuesta a un determinado estímulo, en la modalidad de fijación de la diferencia de voltaje se midió la corriente necesaria para mantenerla fija y al contrario, en la modalidad de fijación de la corriente se midieron los cambios sucedidos en el voltaje.

Para ello, las placas de cultivo se colocaron en una cámara experimental acoplada al microscopio invertido Nikon Eclipse T2000. Se procedió a formar un parche de alta resistencia entre el electrodo de registro y la membrana celular, en este caso se utilizó la variación del parche perforado. Se hizo uso de unos capilares de vidrio de borosilicato Kimble™ 51 estiradas al fuego montadas en el cabezal de un amplificador de *patch-clamp* EPC-10 (HEKA Elektronik), se pusieron

en contacto con la membrana, se introdujo en su interior el electrodo de registro y se rellenaron de una solución (preparada de nuevo cada 2 horas) de KCl 135 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM, EGTA 5 mM, Mg-ATP 5 mM y Na-GTP 0,3 mM pH 7,3 con KOH a la que se le añadió anfotericina B (preparada en DMSO) a una concentración final de 50-100 µg/mL como agente de permeabilización para generar los poros en la membrana celular. Los registros se iniciaron cuando la resistencia de acceso fue menor de 15 MΩ, pasados unos 10-15 minutos tras la fijación de la membrana. Por otro lado, una vez sellada la membrana de una célula, a una distancia de aproximadamente 100 µm sobre la célula se situó el sistema de perfusión constituido por una pipeta en la que confluyen 5 vías reguladas por gravedad e intercambiadas por un sistema de electroválvulas solenoides excluyentes (The Lee Company). Con este sistema se bañaba la célula de manera continua a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto con solución de Tyrode (CaCl₂ 2 mM, NaCl 137 mM, MgCl₂ 1 mM, D-glucosa 10 mM, KCl 5,3 mM y HEPES 10 mM pH 7,4 con NaOH), donde también se dispusieron los distintos fármacos según el experimento a realizar (ACh, tetrodotoxina (TTX) y d-tubocurarina (dTC)). La adquisición de datos se realizó mediante el *software* HEKA Elektronik PULSE (HEKA Elektronik), que permite cancelar las corrientes capacitivas transitorias y compensar electrónicamente la resistencia en serie. Los datos fueron adquiridos con una frecuencia de muestra de 5 kHz y los registros con corrientes de fuga mayores a 100 pA o una resistencia de acceso superior a 20 MΩ fueron descartados. Todos los experimentos se realizaron a RT y se efectuaron al menos tres experimentos independientes para determinar la significación estadística de los resultados. Para el análisis de los datos se utilizó el *software* de GraphPad Prism versión 5.01.

Asimismo, utilizando el mismo sistema experimental se midieron los cambios de concentración de Ca²⁺ citosólico con el uso de la sonda fluorescente sensible al Ca²⁺ Fura-2 AM. Los registros de fluorescencia se realizaron en un microscopio de luz invertida modelo DMI 4000 B (Leica). Antes de la evaluación, las células se incubaron durante 1 hora a 37°C con el medio para cultivo en adhesión suplementado con la sonda de calcio Fura-2 AM a una concentración de 10 µM. Después de la carga de la sonda de calcio Fura-2 AM, las células fueron continuamente perfundidas a través del mismo sistema descrito anteriormente con solución Tyrode con o sin drogas (ACh, nicotina, histamina, cafeína, nifedipina y dTC) a 0,5 mL/minuto. Las imágenes de fluorescencia se generaron a intervalos de 1 segundo, fueron guardadas digitalmente y analizadas mediante el

software LAS AF (Leica). A su vez, el análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el *software* de GraphPad Prism versión 5.01.

5.7.5.13 Análisis por citometría de flujo

Los análisis por citometría de flujo se realizaron en colaboración con la Plataforma de Citometría y Microscopia Óptica Avanzada de Inbiomed (Donostia - San Sebastián), dirigida por María Paz López Mato.

Se realizaron diversos análisis de células cultivadas en condiciones no adherentes mediante la técnica de citometría de flujo. Dado que en este procedimiento las células suspendidas en un fluido son analizadas de una en una mientras atraviesan un finísimo tubo sobre el que incide un rayo de luz láser es necesario eliminar los agregados y demás restos celulares que puedan interferir en el estudio. Por ello, las células o las esferas celulares fueron disociadas con 1 mL de solución de Tripsina-EDTA 0,25% durante 5-7 minutos a 37°C, que se inactivó diluyendo y lavando a su vez con PBS (pH 7,2) para luego filtrar la solución a través de un filtro para células de 70 µm. Seguidamente se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm para resuspender el pellet en 1 mL de tampón de separación (PBS 1X sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ con 0,5% de BSA, HEPES 25 mM y EDTA 5 mM pH 7,2), pasarlos a Tubos Falcon® de poliestireno de 5 mL y contar el número de células en el Automated Cell Counter TC20™ (BioRad). En el presente trabajo esta técnica se utilizó para analizar la expresión de genes reportero de proteínas fluorescentes. Los ensayos en los que se analizó la proteína EYFP se realizaron en un citómetro BD FACSCantoA (BD Biosciences) utilizando el láser de excitación azul y recogiendo las señales fluorescentes emitidas con el filtro de paso de banda 530/30. En cambio, los datos sobre las proteínas GFP, EGFP y Tomato o RFP fueron adquiridas en un separador celular BD FACSAria III (BD Biosciences) utilizando los láseres de excitación azul y amarillo-verde y recogiendo las señales fluorescentes emitidas con los filtros de paso de banda 530/30 y 610/20 respectivamente. La adquisición de los datos se gestionó a través del *software* BD FACSDiva™ adquiriendo un mínimo de 10.000 eventos en la región de análisis, excluyendo los agregados y las células no viables (señal positiva de TO-PRO®-3 *Iodide* o de 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), teniendo en cuenta la auto-fluorescencia (naranja) emitida por las células y utilizando células que no expresaban el gen reportero como control para ajustar los parámetros en cada caso. Los parámetros de dispersión se adquirieron en modo lineal, mientras que los parámetros de fluorescencia se establecieron en modo logarítmico. Los datos se analizaron con los *software* BD

FACSDiva™ y FlowJo, y se representaron en gráficas de puntos mostrando la fluorescencia a estudiar *versus* la auto-fluorescencia de las células.

5.7.5.13.1 BD Lyoplate™ Mouse Cell Surface Marker Screening Panel

La citometría de flujo también se aplicó al estudio masivo de marcadores celulares de superficie gracias al BD Lyoplate™ Mouse Cell Surface Marker Screening Panel, que contiene 176 anticuerpos específicos para diferentes marcadores celulares de superficie y diversos controles ubicados de manera individual en los pocillos de 3 placas de 96 pocillos, permitiendo la clasificación de poblaciones celulares diferentes. La información detallada sobre los marcadores estudiados se encuentra en las **Tablas 5.7 y 5.8** y en el **Anexo I**.

Como se ha descrito anteriormente, las células a analizar se disgregaron con 1 mL de solución de Tripsina-EDTA 0,25% durante 5-7 minutos a 37°C, que se inactivó diluyendo y lavando a su vez con PBS (pH 7,2) para luego filtrar la solución a través de un filtro para células de 70 µm. Seguidamente se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm para resuspender el pellet en 1 mL de PBS (pH 7,2) y contar el número de células en el Automated Cell Counter TC20™ (BioRad). Se dispusieron entre 500.000-1.000.000 de células en un volumen final de 50 µL por pocillo, por lo que el pellet correspondiente al número total de las células a repartir se resuspendió en el volumen total correspondiente de la solución de bloqueo de PBS (pH 7,2) al 10% de FBS, dejándolas durante 15 minutos a RT, para luego poner 50 µL por pocillo de la suspensión celular en 3 placas nuevas de 96 pocillos. Se añadieron 10 µL por pocillo de los anticuerpos primarios y controles de isotipos previamente reconstituidos a una concentración de 0,025 µg/µL en cada pocillo correspondiente y se incubaron durante 20-30 minutos a 4°C. Se añadieron 120 µL de tampón de tinción (PBS 1X sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ con 3% de BSA, 0,09% de azida de sodio y EDTA 5 mM) por pocillo, se centrifugaron las placas durante 5 minutos a 300 g y se volvieron a lavar con 200 µL de tampón de tinción centrifugando de la misma manera. Se añadieron 50 µL de los anticuerpos secundarios conjugados con biotina a la dilución adecuada y a los pocillos correspondientes y se incubaron durante 20-30 minutos a 4°C y en oscuridad. Después de dos lavados con 100 µL y 200 µL por pocillo de BSA centrifugando durante 5 minutos a 300 g, se añadieron 100 µL del reactivo terciario, la Estreptavidina Alexa Fluor® 647 diluido a 1:4000, y se incubaron durante 20-30 minutos a 4°C y en oscuridad. Se realizaron varios lavados con BSA igual que antes y para finalizar, el pellet celular de cada pocillo se resuspendió en 150 µL de tampón de tinción y se pasó a Tubos Falcon® de

polipropileno de 5 mL para analizarlos en la máquina de separación celular BD FACSAria III (BD Biosciences), para así también poder detectar a la vez la expresión de genes reportero de proteínas fluorescentes. Se adquirieron como mínimo 20.000 eventos por pocillo. Los datos fueron confirmados por la repetición en serie de todos los pocillos con resultado positivo y fueron controlados por una serie de pocillos con resultado negativo conocido. Unas pocas células sobrantes se utilizaron para ajustar la auto-fluorescencia y determinar la viabilidad celular (señal negativa de 7-AAD) a la hora de analizar los datos con la ayuda del *software* BD FACSDiva™ y FlowJo.

5.7.5.13.2 Separación celular por fluorescencia

Por otro lado, esta técnica de análisis se aplicó a la clasificación y selección de células con características particulares de dispersión y fluorescencia provenientes de una mezcla de varias poblaciones celulares, realizándose en este trabajo dos tipos de separación celular por fluorescencia; en base a la proteína fluorescente que las mismas células expresaban y en base a la expresión de proteínas de superficie marcadas con anticuerpos fluorescentes.

En el primer caso, la separación celular se realizó a través de la detección de la fluorescencia de proteínas como EYFP, GFP, EGFP, Tomato y RFP. Las células se prepararon y se analizaron tal y como se ha descrito previamente en el apartado **5.6.4.13**, pero pasándolas a tubos Falcon® de polipropileno de 5 mL, y se separaron en poblaciones consideradas positiva o negativa en base a si las células expresaban o no la proteína fluorescente.

En el segundo caso, se realizó un marcaje directo de proteínas de superficie con anticuerpos primarios conjugados. El procedimiento inicial fue el mismo que antes, las células a analizar se disgregaron con 1 mL de solución de Tripsina-EDTA 0,25% durante 5-7 minutos a 37°C, que se inactivó diluyendo y lavando a su vez con PBS (pH 7,2) para luego filtrar la solución a través de un filtro para células de 70 µm. Seguidamente se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS (pH 7,2) para contar el número de células en el Automated Cell Counter TC20™ (BioRad) y estimar el volumen necesario para la distribución de un número concreto de células en los diferentes tubos de ensayo. Se necesitaban 100.000 células sin marcar como control de la auto-fluorescencia, 100.000 células con el isotipo control para medir la señal inespecífica, 100.000 células con la tinción para ajustar los parámetros y por último el tubo

experimental con el resto de células teñidas para realizar la separación de las poblaciones celulares. Por lo tanto, las células se volvieron a centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm para resuspenderlas en el volumen calculado de solución de bloqueo de PBS (pH 7,2) al 1% de BSA y al 10% de FBS, distribuir la cantidad necesaria en los diferentes tubos de ensayo y dejarlas durante 10 minutos a RT. Seguidamente se añadieron el isotipo y el anticuerpo primario conjugados a los tubos correspondientes y se incubaron durante 30 minutos a 4°C agitando los tubos cada 10 minutos. Tras esta incubación se añadieron 2 mL por tubo de PBS (pH 7,2) al 1% de BSA para lavar, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y a 4°C y se volvió a lavar con otros 2 mL. El pellet de los tubos con 100.000 células se resuspendió en 100 µL de PBS (pH 7,2) al 1% de BSA y el pellet del tubo con las células a separar se resuspendió en 100 µL por cada 2.000.000 de células. Inmediatamente, se añadió el reactivo Estreptavidina APC a cada tubo y se incubó durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad, agitando los tubos cada 10 minutos. Pasado este tiempo se realizaron los mismos lavados que antes y el pellet final se resuspendió en tampón de separación y se pasó a tubos Falcon® de polipropileno de 5 mL para analizarlos en la máquina de separación celular BD FACSAria III (BD Biosciences). En algunos casos se realizó una separación doble teniendo en cuenta, además del marcaje descrito, la expresión de proteínas fluorescentes por las propias células. El procedimiento se realizó excluyendo agregados y células no viables (señal positiva de 7-AAD o de tinción verde SYTOX®) y los datos se analizaron con el *software* BD FACSDiva™ y FlowJo.

Los anticuerpos y reactivos utilizados con sus diluciones concretas se detallan en las **Tablas 5.9 y 5.10**.

5.7.6 Ensayos *in vivo*.....

Para los experimentos *in vivo* de este trabajo se utilizaron en general ratones de 8 semanas de edad de las distintas cepas detalladas en la **Tabla 5.12** y todos los experimentos se realizaron conforme a la legislación detallada en el apartado **5.6.1**.

5.7.6.1 Trazados de linaje celulares mediante ratones transgénicos

En este presente trabajo se realizaron trazados de linaje celulares mediante ratones transgénicos generados empleando el sistema Cre-loxP. La proteína Cre es una recombinasa que reconoce secuencias específicas de unos 34 pares de bases conocidas como secuencias *loxP* que se disponen flanqueando el segmento de ADN a eliminar, los corta por la mitad y después une las dos

mitades restantes. Por lo tanto, las secuencias *loxP* determinan la secuencia genómica a escindir, mientras que la disponibilidad en el tiempo y/o espacio de la recombinasa Cre dictan cuándo y dónde se produce la recombinación.

En los trazados de linaje realizados, la enzima Cre se expresó bajo el promotor de un gen de interés diferente en cada línea de ratón y eliminó en todos los casos un codón *stop*, que posibilitó a partir de ese momento, la expresión de un gen reportero de una proteína fluorescente o de una proteína enzimática regulado bajo el promotor de un gen de expresión constitutiva, permitiendo así la detección y trazado de las células que una vez expresaron el gen de interés, dando información tanto sobre su origen como sobre su destino.

5.7.6.2 Trazados de linaje celulares mediante ratones transgénicos inducibles

La gestión de la colonia, la inducción de estos ratones transgénicos y el cuidado de los animales hasta su sacrificio se realizó en el laboratorio de origen de la cepa, en colaboración con la Dra. Sonia Alonso Martín del grupo dirigido por el Dr. Frédérix Relaix (INSERM U955-E10, Université Paris Est, Francia).

En algunos experimentos donde interesaba estudiar la expresión de estos genes también en el tiempo se sacó provecho del uso de ratones transgénicos inducibles, en este caso, por la droga tamoxifeno (TMX). Estos transgénicos se basan en el mismo sistema Cre-*loxP* descrito en el apartado 5.6.5.1, pero la diferencia radica en que con este método se genera una proteína de fusión inactiva entre la enzima Cre y un receptor incompleto de estrógenos (presenta sólo la porción de unión, *estrogen binding domain*), que sólo al interaccionar con el TMX se liberan activando el sistema Cre. De esta manera se ejerce un control sobre el momento en el que el sistema Cre-*loxP* se activa y en el caso de expresarse, del momento en el que la recombinasa Cre actúa sobre las secuencias *loxP*.

En este trabajo, la activación del sistema Cre-*loxP* se realizó a través de la administración de 2,5 µL/gr de peso de ratón de TMX diluido en aceite de maíz a una concentración de 20 mg/mL por una inyección intraperitoneal diaria durante 3 días, los días postnatales 14 (P14), P16 y P35, para después sacrificar a los animales a las 7-8 semanas. Para la inyección se utilizó una jeringa de 1 mL con una aguja de calibre 26.

5.7.6.2.1 Trasplante de médula ósea de ratón

Este experimento fue realizado en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Antonio Bernad (Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid).

El trasplante de médula ósea se realizó entre ratones transgénicos inducibles como receptores y ratones transgénicos como donantes de entre 8 y 10 semanas de edad (Valiente-Alandi *et al.*, 2015). Los ratones receptores fueron inducidos entre los días postnatales 30 (P30) y P60 mediante una inyección diaria durante 3 días consecutivos de 9 mg por 40 gr de peso de ratón de TMX diluido en aceite de maíz a una concentración de 20 mg/mL. Después fueron irradiados con una dosis de 4,75 Gy y a las 24 horas con otra dosis de 4,5 Gy. Posteriormente a la última dosis de radiación recibieron una transfusión a través de una vena lateral de la cola de 10^7 células de la médula ósea del ratón donante, obtenidas purgando con una aguja de calibre 25 rellena de PBS (pH 7,2) el hueso femoral y el hueso tibial. Los animales fueron sacrificados a los 15 meses post-trasplante. Los ratones estuvieron con libre acceso a agua y comida *ad libitum* monitorizados durante todo el experimento.

5.7.6.2.2 Ensayo de depleción celular *in vivo*

La gestión de la colonia, la inducción de estos ratones transgénicos y el cuidado de los animales hasta su sacrificio se realizó en el laboratorio del Dr. Frédéric Relaix (INSERM U955-E10, Université Paris Est, Francia).

El experimento de la depleción de una población celular concreta también se llevó a cabo gracias a la estrategia del sistema Cre-loxP con ratones transgénicos inducibles descrita en el apartado 5.6.5.2. En esta situación, la población a eliminar se define por la expresión diferencial y específica de un gen bajo el cual se expresa la proteína fusión Cre más el receptor incompleto de estrógenos sensible a TMX, que en presencia de la droga se disocia dejando libre la proteína Cre que actuará sobre las secuencias *loxP* eliminando un codón *stop*, pero esta vez, se expresará la toxina diftérica A (*Diphtheria toxin A* (DTA)) que matará a la célula, eliminando así la población celular que exprese el gen de interés.

En los experimentos realizados en este trabajo, la activación del sistema Cre-loxP se realizó a través de una única dosis de 10 mg de TMX diluido en aceite de maíz a una concentración de 20 mg/mL por inyección intraperitoneal y 48 horas más tarde los animales fueron sacrificados después

de otra inyección de TMX. Para la inyección se utilizó una jeringa de 1 mL con una aguja de calibre 26.

5.7.6.2.3 Ensayo de generación de herida en piel dorsal mediante punción

La gestión de la colonia, la inducción, la generación de las heridas y el cuidado de los animales hasta su sacrificio se realizó en el laboratorio del Dr. Frédérix Relaix (INSERM U955-E10, Université Paris Est, Francia).

Para realizar un daño en la piel dorsal de los ratones transgénicos inducibles se siguieron dos estrategias experimentales; una en la que los ratones se indujeron con una inyección intraperitoneal diaria de 2 mg de TMX diluido a 20 mg/mL en aceite de maíz durante 5 días seguidos 4 semanas antes de realizar la herida, y otra en la que el mismo tipo de inducción por TMX se inició a la vez que se generaba la herida. En cualquier caso, al momento de realizar la herida, los ratones fueron debidamente anestesiados para preparar la piel de forma adecuada, para afeitarla y desinfectarla tal y como se explica en el apartado **5.6.1.1**. Seguidamente, sujetando la piel desde la nuca con unas pinzas, esta se arrastró hacia un lado contra la mesa de trabajo para evitar dañar los músculos y órganos interiores, y con la ayuda de un sacabocados de 4mm se realizaron dos heridas de profundidad completa (eliminando todas las capas de la piel incluido el panículo carnoso) simultáneamente a cada lado de la línea central marcada por la columna vertebral. Se realizaron un total de 6 heridas a cada animal, protegiéndolos con un apósito estéril Tegaderm™ que se mantuvo hasta el término del experimento. Directamente después de la operación se les inyectó el analgésico Vetergesic a 0,3 mg/mL (que contiene buprenorfina), procedimiento que se repitió 4-6 horas más tarde y una vez más al día siguiente. Los animales fueron colocados individualmente en cajas con libre acceso a agua y comida *ad libitum* y fueron monitorizados para evitar infecciones o sufrimiento del animal debido a alguna complicación, hasta que fueron sacrificados a los 5 y 10 días post-daño.

5.7.6.3 Ensayo de regeneración muscular

5.7.6.3.1 Trasplante de células de ratón

Este ensayo *in vivo* se realizó en colaboración con la Dra. María Goicoechea siguiendo un protocolo establecido por el Dr. Carlos San José, responsable del Animalario del Instituto

Biodonostia, y los doctores David Ortiz de Urbina, Juan Carlos Mazabuel y Arrate Guisasola de los servicios de Radioterapia y de Física Médica de Onkologikoa (Donostia – San Sebastián). El diseño experimental de este ensayo se estableció de acuerdo con lo descrito por Boldrin y colaboradores (Boldrin *et al.*, 2009, 2012). El experimento comenzó con la irradiación con una dosis única de 18 Gy a una tasa de dosis de 300 cGy/min de las dos patas posteriores de los ratones receptores. Se empleó la Unidad de Megavoltaje de electrones modelo Varian CL-2100C/D seleccionando un haz de electrones de 6 MV de energía. Al día siguiente, bajo inducción anestésica se les inyectaron 250.000 células en 15 μ L de PBS (pH 7,2) en el músculo tibial anterior (TA) de las dos patas posteriores utilizando una jeringa Hamilton con aguja biselada de calibre 26. Las células inyectadas se obtuvieron de otros ratones transgénicos, fueron cultivadas en suspensión durante 7 días, disociadas con Tripsina-EDTA 0,25% y filtradas antes de la administración. 3 semanas después de la inyección de la solución celular, los ratones fueron anestesiados para inducirles un daño muscular con 7,5 μ L de cardiotoxina (CTX) a 100 μ M (Sigma) en el TA de una de las patas posteriores, mientras que se inyectó PBS (pH 7,2) en el TA de la pata contralateral. Los ratones que sirvieron como controles siguieron los mismos plazos de tiempo, pero no fueron irradiados y se les administró únicamente PBS (pH 7,2) en lugar de la solución celular. Los animales fueron sacrificados una semana más tarde, a las 4 semanas desde la administración de las células. Los ratones se mantuvieron agrupados en distintas jaulas con libre acceso a agua y comida *ad libitum* y fueron monitorizados durante todo el experimento.

5.7.6.3.2 Trasplante de células humanas

Este ensayo *in vivo* se realizó con la ayuda de la Dra. María Goicoechea. El diseño de este experimento se estableció de acuerdo a las publicaciones de Darabi y colaboradores (Darabi *et al.*, 2008, 2012). El experimento comenzó directamente con la inducción del daño muscular, los ratones se anestesiaron debidamente para luego inyectarles 7,5 μ L de CTX a 100 μ M (Latoxan) en el TA de las dos patas posteriores utilizando una jeringa Hamilton con aguja biselada de calibre 26. Al día siguiente, bajo inducción anestésica se les inyectaron 235.000 células en 15 μ L de PBS (pH 7,2) en el músculo TA de una de las patas posteriores, inyectando sólo PBS (pH 7,2) en la pata contralateral. Las células inyectadas se obtuvieron de varias biopsias de cremáster humano (**Tabla 5.13**), fueron cultivadas en suspensión durante 7 días, disociadas con Tripsina-EDTA 0,25% y filtradas antes de la administración. Los animales se mantuvieron agrupados en distintas jaulas con libre acceso a agua y

comida *ad libitum* y estuvieron monitorizados hasta ser sacrificados 4 semanas después de la inyección de la solución celular.

5.7.7 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media o mediana \pm la desviación estándar indicando el número de réplicas experimentales realizadas en cada caso (n). El número de animales utilizados (N) fueron de un mínimo de 3 en todos los experimentos.

La significación estadística de los resultados obtenidos de las cuantificaciones celulares (recuento de células que expresan una proteína fluorescente) fue calculada mediante la prueba de t de Student pareada en el caso de los datos obtenidos vía análisis citométrico, y mediante la prueba de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis junto con el de Mann-Whitney en los casos en los que los valores se obtuvieron a través de inmunofluorescencias, según si se comparaban dos grupos o más de dos grupos respectivamente.

Los resultados de *patch-clamp* se representaron como media y SEM y los análisis se llevaron a cabo mediante el test de ANOVA de un factor seguido de los análisis *post hoc* de Tukey. Los valores de los cambios únicos o múltiples en la concentración de Ca^{2+} citosólico se mostraron como media y SEM y se analizaron con el t de Student pareado con un intervalo de confianza de 95% o con el ANOVA de un factor seguido de análisis *post hoc* de Dunnett respectivamente.

Los datos obtenidos del análisis transcriptómico se normalizaron aplicando el algoritmo robusto promedio de *multi-array* (RMA) (Irizarry *et al.*, 2003). El procesamiento posterior de los datos y la representación de los gráficos se realizaron con funciones internas desarrolladas en Matlab. En el análisis de genes diferencialmente expresados se seleccionaron aquellos con un *fold-change* superior a 2. Con estos datos a su vez se realizó un análisis de enriquecimiento en grupos de genes (GSEA), un método que identifica grupos de genes o proteínas diferencialmente expresados en un gran conjunto de genes o proteínas que tal vez puedan ser asociados a una función o fenotipo concreto. Para ello se compararon las firmas moleculares del conjunto de genes de entrada con las firmas moleculares tomadas del conjunto de genes C5 de la versión 3.0 de la base de datos de firmas moleculares (MSigDB) (Subramanian *et al.*, 2005). La significación del conjunto de genes diferencialmente expresados se analizó mediante un enfoque de enriquecimiento basado en la distribución hipergeométrica. El efecto del test múltiple se corrigió controlando la tasa de

falsos positivos utilizando la corrección de Benjamini-Hochberg con un nivel de significación de $\alpha=0,05$.

En todos los datos obtenidos, los valores de $p < 0,05$ fueron considerados como significativos y los signos *, ** o *** representan una significación estadística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ respectivamente.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Obtención de miotubos contráctiles *in vitro* a partir de precursores derivados de la piel

En vista de que el uso de células derivadas de la piel para la generación de miotubos tanto *in vitro* como *in vivo* había sido previamente descrito y que la eficiencia de este proceso era relativamente baja en comparación con otras células precursoras miogénicas nos propusimos mejorar la capacidad de diferenciación miogénica *in vitro* a partir de precursores de piel. A la hora de definir este nuevo sistema se tuvo en cuenta una posible futura aplicación traslacional, procurando utilizar en la medida de lo posible, un medio de cultivo y factores utilizados en sistemas definidos con células humanas (Guo *et al.*, 2011, 2014) y un método de cultivo tridimensional. De modo que, considerando lo anterior y basándose en el protocolo descrito en nuestro laboratorio (García-Parra *et al.*, 2012) se estableció un nuevo sistema para el crecimiento y diferenciación de células miogénicas derivadas de piel dorsal de ratón (**Figura 6.1**).

Este protocolo se divide en una primera fase de “selección” a través de un cultivo en suspensión en presencia de determinados factores de crecimiento a lo largo de 7 días, y en una segunda fase de diferenciación celular en condiciones adherentes gracias al uso de un soporte biocompatible de matriz extracelular, sin la adición de factores de crecimiento, pero añadiendo suero, que de manera estándar también se mantuvo durante 7 días (**Figura 6.1 A**). Al comienzo de este protocolo, tras la disgregación de la biopsia de piel dorsal de ratón, se visualizaban células vivas entre cierta cantidad de células muertas, pelos y restos tisulares (**Figura 6.1 B**), que al cabo de 7 días formaban unas esferas celulares de tamaño variable (**Figura 6.1 C**). A partir de la disociación de estas esferas y con el cambio a condiciones adherentes se observó desde el inicio del cultivo que la presencia del sustrato favorecía la diferenciación celular (**Figura 6.1 D**), hasta obtener en 7 días un cultivo diferenciado (**Figura 6.1 E**). A través de un análisis morfológico destacaban entre las distintas poblaciones celulares células de aspecto fusiforme (**Figura 6.1 F**), células redondeadas que albergaban vesículas (**Figura 6.1 G**), células con largas prolongaciones (**Figura 6.1 H**) y sincitios multinucleados (**Figura 6.1 I**).

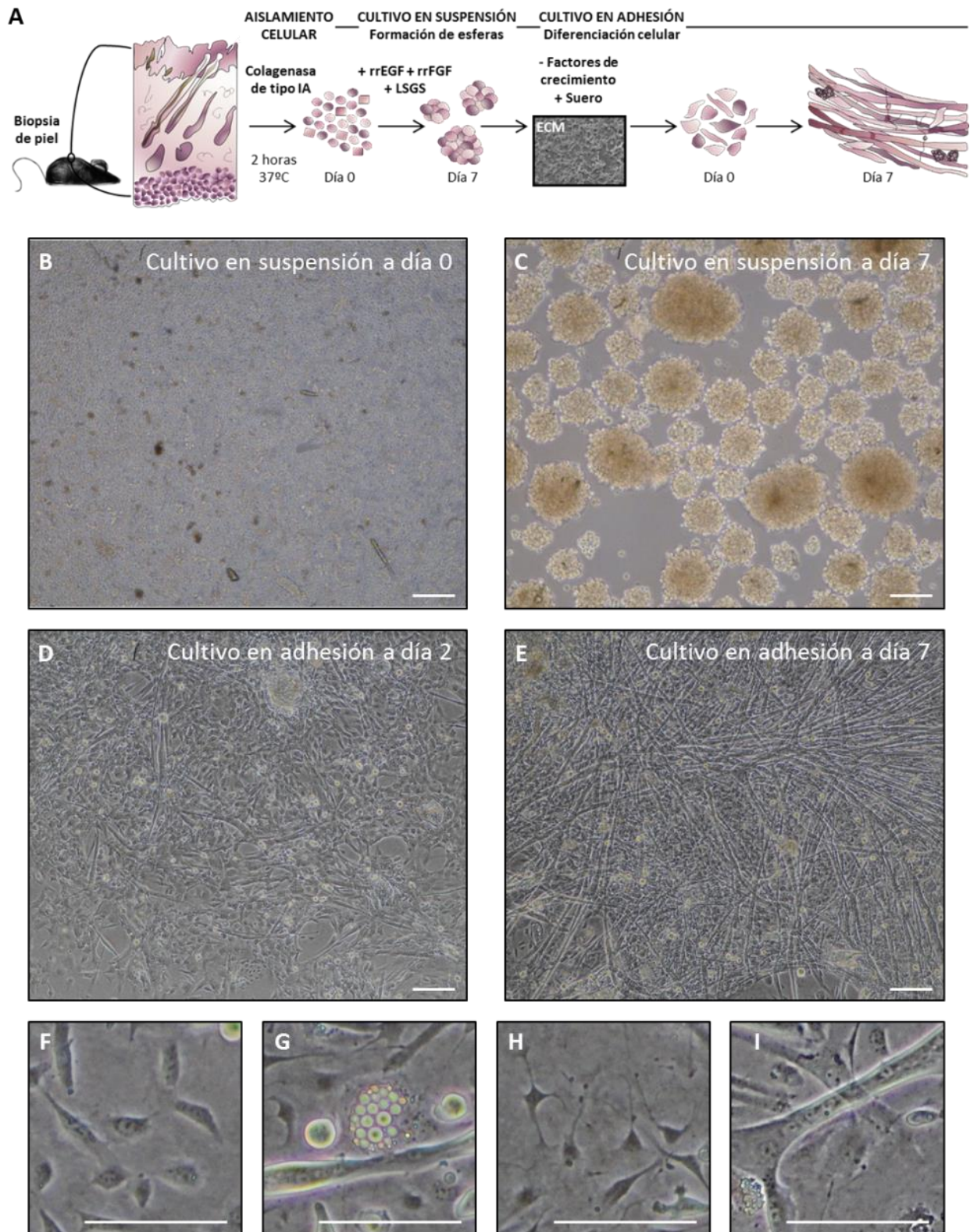


Figura 6.1. Esquema del protocolo de cultivo *in vitro* utilizado y descripción del cultivo celular obtenido en las distintas fases del procedimiento. **(A)** Representación del protocolo de cultivo *in vitro*. **(B-I)** Fotografías de microscopio óptico que muestran el aspecto morfológico del cultivo celular a día 0 del cultivo en suspensión **(B)**, a día 7 del cultivo en suspensión **(C)**, a día 2 del cultivo en adhesión **(D)** y a día 7 del cultivo en adhesión **(E-I)**. En los paneles B, C, D, E, F, G, H e I las barras de tamaño representan 100 μm .

Una de las características más llamativas del cultivo celular adherente fue que en la mayoría de las veces las estructuras alargadas multinucleadas se contraían de manera espontánea en ausencia de un estímulo (**Figura 6.2**). Estas células de aspecto tubular claramente multinucleadas (**Figura 6.2 A, flechas blancas**) presentaban contracciones no sincronizadas con otras células de las mismas características (**Figura 6.2 B-F**). Este dato resultó de gran interés ya que sugería cierto grado de diferenciación y madurez de las células cultivadas, así como una especificación funcional.

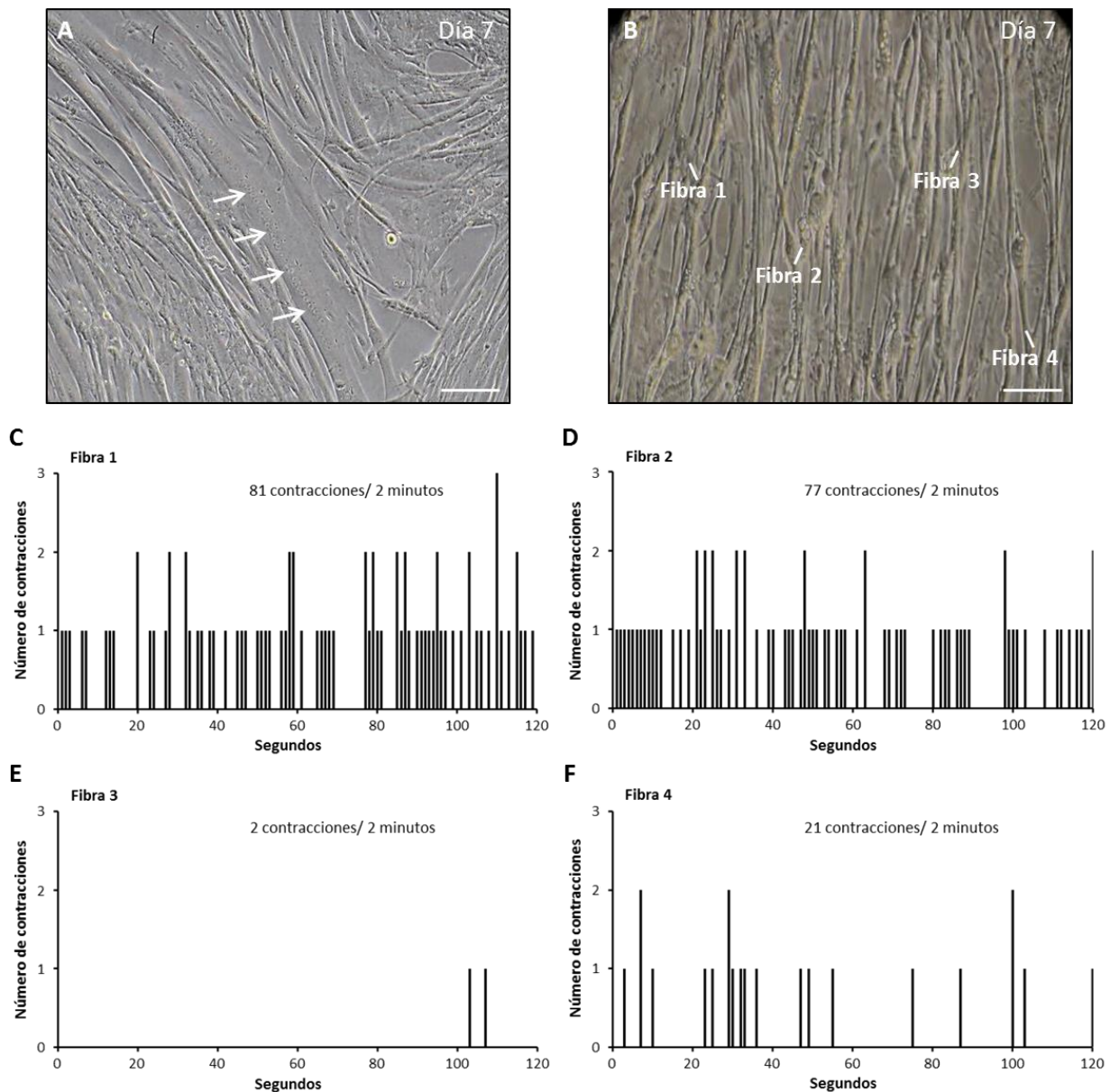


Figura 6.2. Análisis de las contracciones observadas a 7 días de cultivo en adhesión. **(A)** Sincitio formado por núcleos alineados (flechas blancas) dentro de un mismo citoplasma de una célula alargada contráctil. **(B-F)** Estudio de las contracciones de diferentes células tubulares multinucleadas denominadas como fibras **(B)** a través del recuento del número de contracciones sucedidas durante 2 minutos, representando el número de contracciones por segundo como una línea de diferente longitud **(C-F)** en gráficas separadas correspondientes a cada fibra del panel **(B)**. Las barras de tamaño representan 100 μm en los paneles A y B.

La singularidad del cultivo generado en cuanto a la coexistencia de varias poblaciones celulares diferentes donde sin embargo, resaltaba la aparición y maduración de las células tubulares multinucleadas con capacidad contráctil, recordaban al tejido muscular; esto es, un órgano complejo que engloba la presencia de las fibras cilíndricas, alargadas y multinucleadas que forman el tejido muscular en sí mismo y la de los vasos sanguíneos, los nervios y el tejido conectivo para cumplir con una de sus principales funciones, el movimiento a través de la contracción de sus fibras musculares. Por lo tanto, este sistema de cultivo promovía la diferenciación miogénica en un contexto tridimensional y multicelular.

6.1.1 Caracterización músculo esquelética del cultivo celular en suspensión y en adhesión

Tomando las distintas fases del protocolo como puntos de análisis se comenzó a estudiar la primera fase del cultivo en suspensión. Mediante el análisis de las muestras bajo un microscopio electrónico de transmisión (MET) se definieron las características morfológicas de las células (**Figura 6.3**). A las pocas horas de cultivo tras el aislamiento de las células se observaron por un lado, células con cuerpos blancos y más retículo endoplásmico rugoso (RER) que una célula muscular (**Figura 6.3 A**), y por otro lado, células con una ultraestructura similar a la de las células madre del músculo, coincidiendo en el aspecto del citoplasma, en la forma de las mitocondrias y en las características del núcleo (**Figura 6.3 B**). Además, en algunas de estas células se detectó una estructura alargada identificada como cilio primario (**Figura 6.3 B, recuadro**), indicativo tal vez de un estado no proliferativo de las células, y se observó cómo este tipo de células establecían uniones entre sí (**Figura 6.3 C**). Al analizar las muestras cultivadas durante 7 días en suspensión se encontraron esferas con heterogeneidad de tipos celulares (**Figura 6.3 D**). A mayores aumentos se distinguían células tipo fibroblasto (**Figura 6.3 E, asterisco blanco y F**) con numerosas vacuolas, abundante RER, citoplasma muy electrodenso con pocas mitocondrias distribuidas de manera uniforme, contorno celular irregular y núcleos irregulares con abundante heterocromatina. Esta morfología contrastaba con la de otras células que presentaban menos vacuolas y menos RER (**Figura 6.3 E, asterisco negro**). Estas podrían ser células miogénicas y correspondían aproximadamente al 10-15% de la población total de la esfera. Contenían abundantes mitocondrias preferentemente concentradas en las proximidades del núcleo (**Figura 6.3 G**), un núcleo con menos heterocromatina y con un contorno más redondeado que el de las células anteriormente descritas (**Figura 6.3 E, asterisco negro**). Asimismo, en estas células se encontraron filamentos de actina y miosina que habían

comenzado a organizarse cortados transversalmente (**Figura 6.3 H, línea de puntos**) y también en cortes longitudinales (**Figura 6.3 I, flechas**), evidenciando un estado temprano de diferenciación de las células ya en estas condiciones de cultivo no adherentes.

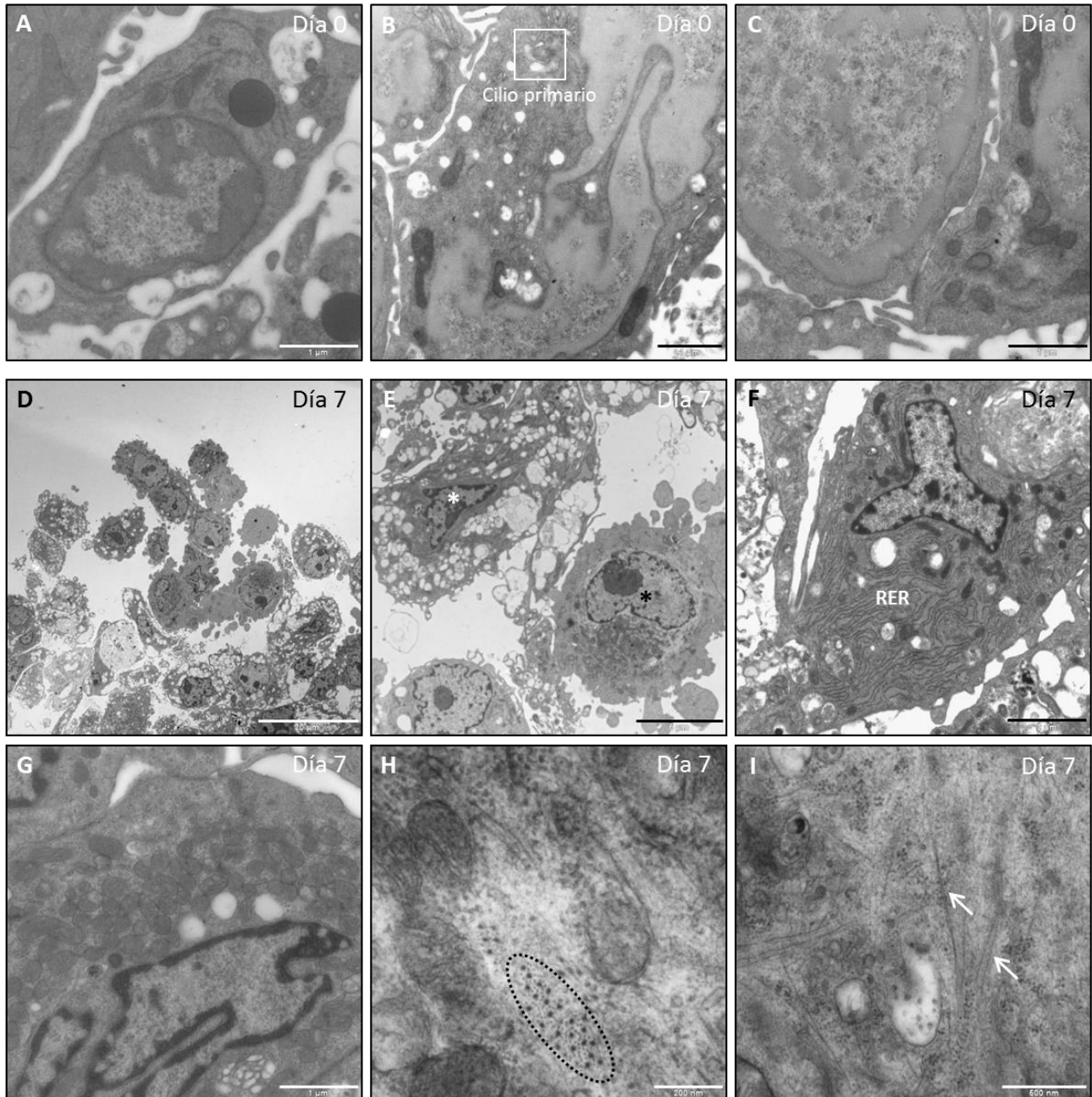


Figura 6.3. Secciones ultrafinas analizadas a través del MET del cultivo en suspensión a día 0 (**A-C**) y a los 7 días (**D-I**). **(A)** Célula con características morfológicas de fibroblasto. **(B)** Célula con características morfológicas similares a las de la célula madre del músculo, el recuadro señala el cilio primario. **(C)** Uniones entre células de aspecto miogénico. **(D)** Heterogeneidad celular de una esfera. **(E)** Dos tipos celulares distintos presentes en las esferas, el asterisco blanco identifica a una tipo fibroblasto y el asterisco negro a una parecida a una célula miogénica. **(F)** Célula fibroblástica con abundante RER. **(G)** Detalle de las mitocondrias de una célula tipo miogénica. **(H-I)** Presencia de filamentos de actina (delgados) y miosina (gruesos) en las células miogénicas, cortados de forma transversal señalados con la línea de puntos **(H)** y cortados de forma longitudinal señalados con las flechas **(I)**. Las barras de tamaño representan 1 μm en los paneles A-C y G, 2 μm en el panel F, 6 μm en el panel E, 20 μm en el panel D, 200 nm en el panel H y 500 nm en el panel I.

Aunque el estudio morfológico y ultraestructural de las muestras durante el cultivo en suspensión indicaba la presencia de una subpoblación discreta de células similares a las células miogénicas o musculares, se analizó si la expresión y regulación génica durante esta fase también concordaba con la expresión de genes identificativos de poblaciones miogénicas y relevantes para la determinación y el desarrollo miogénico (**Figura 6.4**). Tomando como puntos clave de análisis el comienzo (día 0) y el final (día 7) de esta fase, comparativa que reflejaría la evolución de estas células, a través de una RT-qPCR se vio que los genes miogénicos de expresión temprana *Pax7* y *MyoD1* se expresaban más al inicio que al final del cultivo, si bien los valores de su expresión resultaban ser bajos en general (**Figura 6.4 A-B**). Se observó que la expresión del gen *MyH2* también era más alta a día 0 que a día 7 (**Figura 6.4 E**), tal vez por la presencia de restos tisulares al comienzo del cultivo, ya que se considera una miosina de expresión tardía. A diferencia de estos genes, la expresión del factor de transcripción Miogenina conocido por su papel en la inducción y desarrollo de la miogénesis, y del gen *MyH3*, una miosina presente en la embriogénesis y en el desarrollo temprano de los músculos, fue mayor a día 7 que al comienzo del cultivo, aunque con cierta variabilidad en el grado de su expresión entre las muestras provenientes de distintos ratones (**Figura 6.4 C-D**).

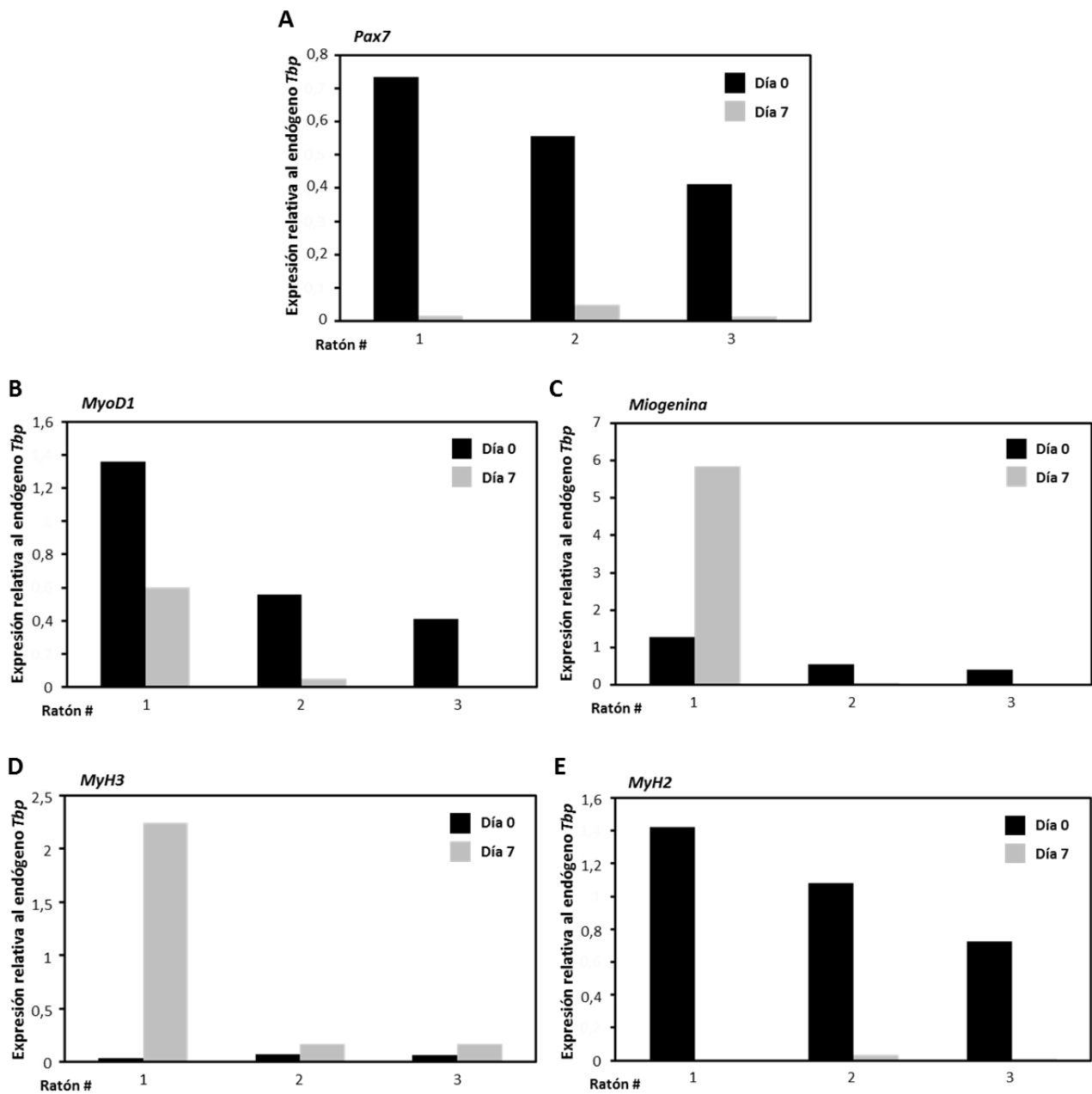


Figura 6.4. Cuantificación de la expresión de determinados genes miogénicos a día 0 y a día 7 del cultivo en suspensión por RT-qPCR. Se analizó la expresión de los genes *Pax7* (A), *MyoD1* (B), *Miogenina* (C), *MyH3* (D) y *MyH2* (E). En todos los casos se muestran los valores obtenidos de muestras provenientes de tres ratones distintos y se representan relativizados a la expresión del gen endógeno *Tbp*.

Conjuntamente, a día 7 de cultivo se analizó la expresión de genes implicados en la miogénesis a través de la expresión de genes reportero regulados bajo el promotor del gen de interés (**Figura 6.5 A-B**). Con esta técnica, la detección de las proteínas codificadas por los genes reporteros muestra indirectamente la expresión de un gen concreto. Partiendo de la biopsia de piel dorsal de un ratón transgénico con estos constructos se apreciaron células positivas para fosfatasa alcalina (**Figura 6.5 A**) y β -gal (**Figura 6.5 B**), equivalentes a la expresión de los factores reguladores miogénicos *Mrf4* y *Myf5* respectivamente.

Asimismo, como parte determinante para el estudio de la naturaleza de las células presentes en el cultivo en suspensión se analizó la expresión de diversas proteínas miogénicas por *Western blot* (**Figura 6.5 C-D**). A día 0 del cultivo se detectaron proteínas miogénicas tales como PAX7, MYOD1, MIOGENINA y MYHC (todas las isoformas), indicando la presencia de células musculares al comienzo del cultivo. Al cabo de 7 días sólo se detectaron MYHC y la MYH3. Para corroborar la ausencia de expresión de algunas proteínas miogénicas a día 7, estas se detectaron a través de técnicas de inmunofluorescencia (**Figura 6.5 E-H**). Al contrario que en el *Western blot*, las proteínas miogénicas MYOD1 y MIOGENINA se detectaron claramente dentro de las esferas (**Figura 6.5 E-F**), así como las proteínas MYHC y SERCA-1 (**Figura 6.5 G-H**), marcando en todos los casos solo a unas pocas células dentro de las esferas. Esta discrepancia en los resultados puede deberse a la distinta sensibilidad de las técnicas empleadas.

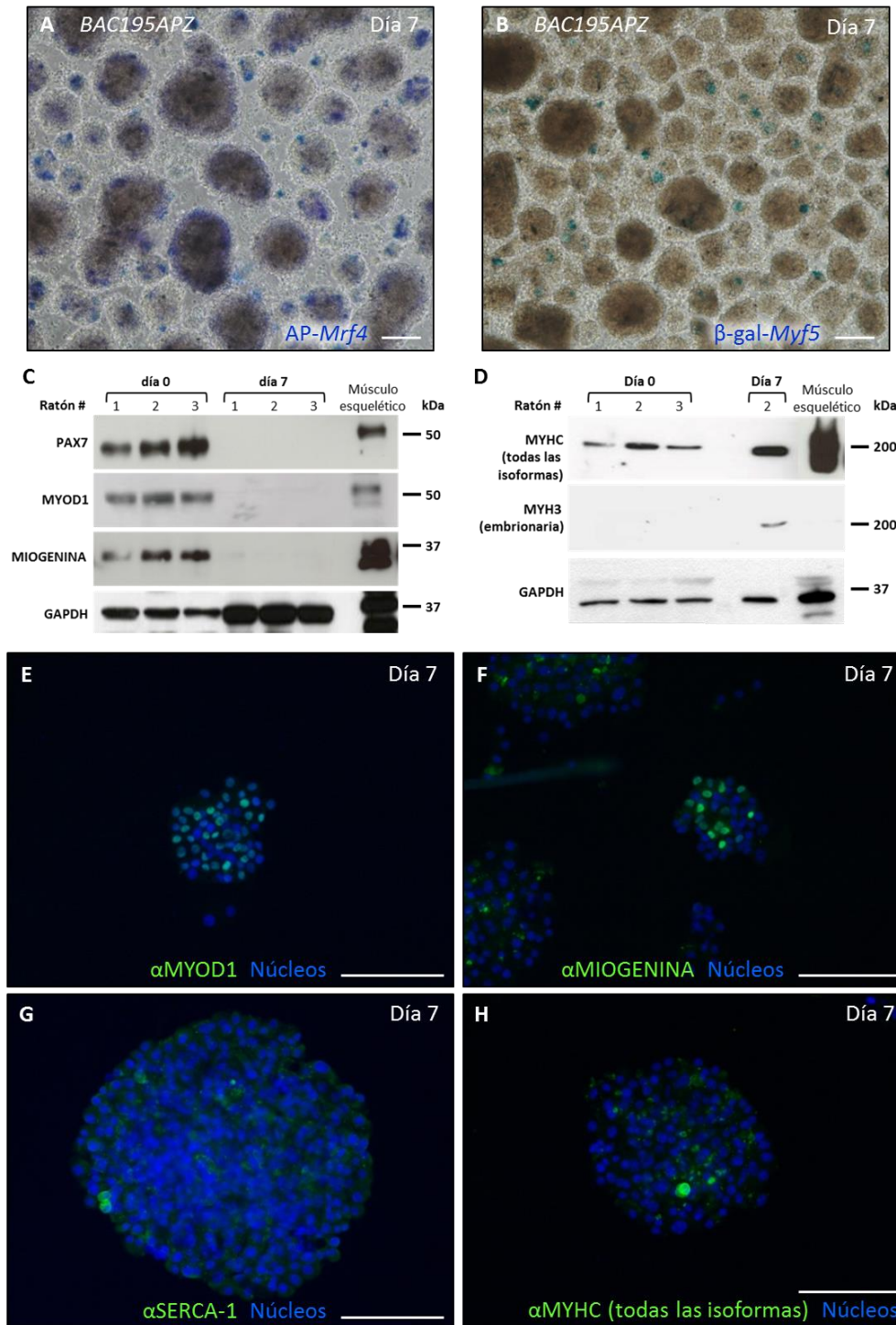


Figura 6.5. Expresión de genes y proteínas miogénicas en el cultivo en suspensión. **(A-B)** Tinción de color azul para la detección de la fosfatasa alcalina relativa a la expresión del gen *Mrf4* **(A)** y de la β -gal relativa a la expresión del gen *Myf5* **(B)** en muestras procedentes del ratón transgénico *B195APZ*. **(C-D)** Análisis de la expresión proteica de PAX7, MYOD1 y MIOGENINA **(C)** y de MYHC (todas las isoformas) y MYH3 (embrionaria) **(D)** por *Western blot* a día 0 y a día 7 en 3 muestras independientes y en el músculo esquelético (control positivo), utilizando el GAPDH como control de carga. **(E-H)** Detección de las proteínas miogénicas MYOD1 **(E)**, MIOGENINA **(F)**, SERCA-1 **(G)** y MYHC (todas las isoformas) **(H)** por inmunofluorescencia (verde) con los núcleos teñidos con Hoechst (azul). Las barras de tamaño representan 100 μ m en los paneles A, B, E, F, G y H.

Prosiguiendo con la caracterización según las fases del protocolo del cultivo se analizó el cultivo en condiciones adherentes, centrándose en los cambios morfológicos y de expresión génica y proteica.

El efecto en la estructura celular por la adhesión a un sustrato rico en proteínas de la matriz extracelular se apreció a través del análisis por MET. Tras 2 días de cultivo (**Figura 6.6 A-C**) se seguían distinguiendo unas células con vacuolas, extenso RER (**Figura 6.6 A, asteriscos blancos y B**) y además, con fibras de colágeno extracelulares próximas (**Figura 6.6 A, flechas**), con lo que se confirmaba la presencia de fibroblastos; y por otro lado se observaron células alargadas que presentaban dos o más núcleos que claramente correspondían a células miogénicas en diferenciación (**Figura 6.6 A, asteriscos negros**). Además, estas células habían comenzado a adoptar características propias de los miotubos: sus mitocondrias se hallaban alineadas en paralelo (**Figura 6.6 C, flechas negras**), y al observar en detalle su citoplasma se encontraron haces de actina y miosina cortados longitudinalmente que habían empezado a organizarse en forma de sarcómeros (**Figura 6.6 C, flechas blancas**). A los 7 días de cultivo se podían apreciar claramente células miogénicas perfectamente diferenciadas formando miotubos (**Figura 6.6 D**), donde se observaban de forma nítida las miofibrillas organizadas en sarcómeros, distinguiéndose en ellas las características bandas A e I y las líneas Z y M (**Figura 6.6 E, flechas blancas**), y las mitocondrias alargadas ubicadas a lo largo de estas estriaciones, típicas de las fibras de músculo esquelético (**Figura 6.6 E, flechas negras**). Mediciones repetidas mostraron que los sarcómeros medían entre 1,5-3,3 μm de largo, las bandas A entre 1-2 μm , las bandas I entre 0,5-1,3 μm , las fibras de actomiosina tenían un grosor de entre 0,3-0,6 μm y las fibras presentaban un diámetro aproximado de 40 μm . En cortes transversales, estos haces organizados de miofibrillas formaban agrupaciones punteadas (**Figura 6.6 F, flechas negras**) alrededor de las cuales se distribuían las mitocondrias (**Figura 6.6 F, flechas negras**). También se observaron muchas caveolas en la membrana plasmática de estos miotubos, típicas vesículas que se encuentran en las células musculares, aunque son más frecuentes en el músculo liso (**Figura 6.6 G, flechas negras**). En lo relativo a los contactos entre célula-célula, se advertían pequeñas uniones adherentes (**Figura 6.6 H, flechas blancas**) y se encontró una unión de tipo GAP (**Figura 6.6 I, flecha blanca**).

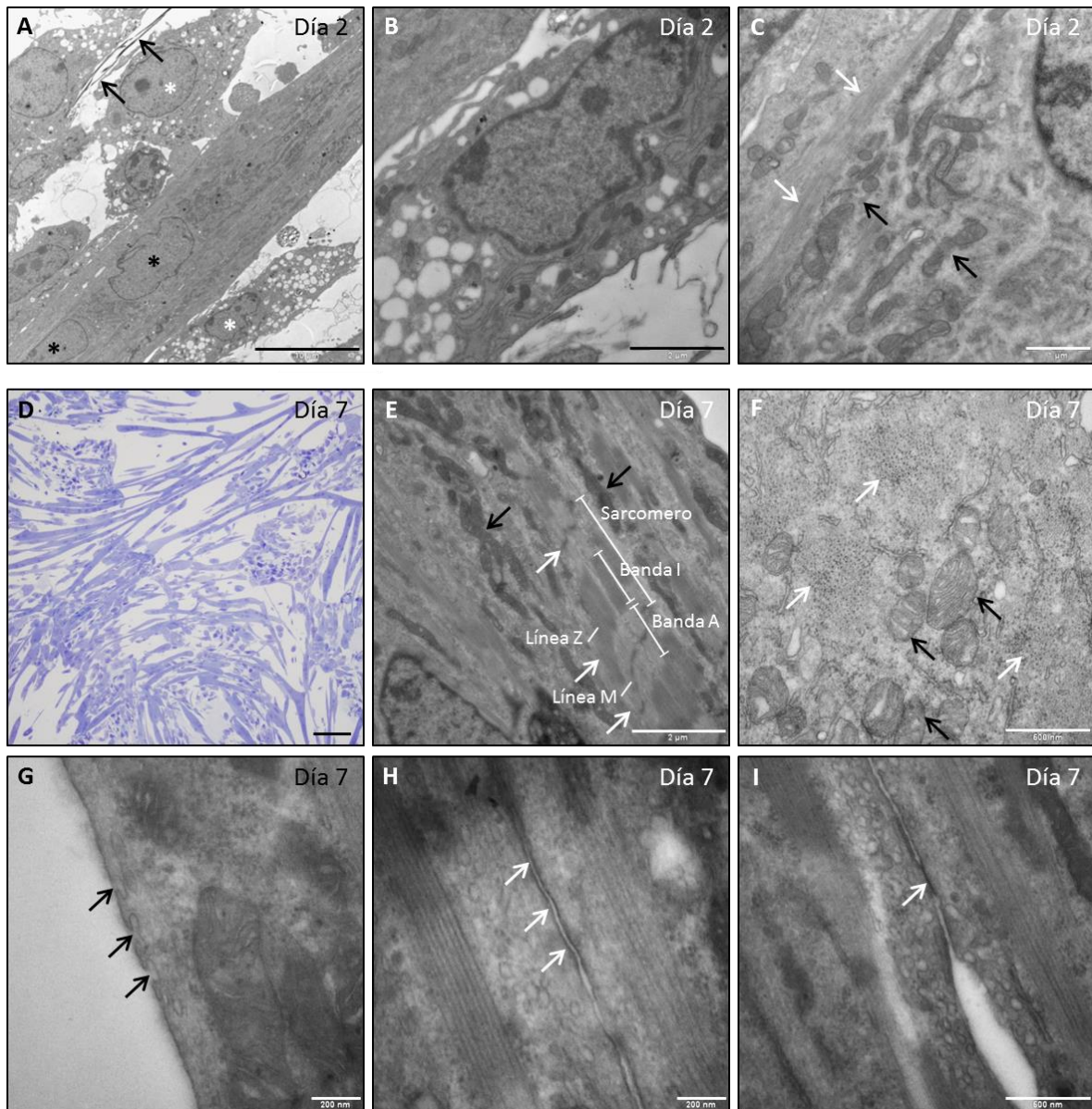


Figura 6.6. Secciones ultrafinas (A-C y E-I) y un corte semifino (D) del análisis a través del MET del cultivo en adhesión a día 2 (A-C) y a los 7 días (D-I). (A) Identificación de distintos tipos celulares como fibroblastos marcados con asteriscos blancos y células miogénicas comenzando a diferenciarse marcadas con asteriscos negros. Fibras de colágeno señaladas con flechas. (B) Célula con características morfológicas de fibroblasto. (C) Detalle de un miotubo donde se observan varias mitocondrias (flechas negras) y haces de miofibrillas (flechas blancas). (D) Aspecto heterogéneo del cultivo con miotubos y otros tipos celulares en un corte semifino. (E) Miofibra diferenciada con mitocondrias alineadas (flechas negras) en paralelo a las miofibrillas (flechas blancas) dispuestas formando los sarcómeros. Se diferencian claramente las bandas A e I y las líneas Z y M características de estas estructuras. (F) Corte transversal donde se señalan con flechas negras las mitocondrias y con flechas blancas los haces agrupados de actina y miosina. (G) Caveolas (flechas negras) localizadas en la membrana plasmática de un miotubo. (H) Uniones adherentes entre dos miotubos señaladas con flechas blancas. (I) Una unión de tipo GAP entre dos miofibras identificada con una flecha blanca. Las barras de tamaño representan 1 μm en el panel C, 2 μm en los paneles B y E, 10 μm en el panel A, 100 μm en el panel D, 200 nm en los paneles H y G, y 500 nm en los paneles F e I.

El desarrollo miogénico observado fue analizado en cuanto a la expresión génica y proteica (**Figura 6.7**). Las muestras se analizaron a los 7 días de cultivo, ya que este momento fue el considerado como el punto culminante de la miogénesis bajo este sistema. La tinción para la fosfatasa alcalina equivalente a la expresión del gen *Mrf4* perfilaba los miotubos, acorde con el papel de este gen en la diferenciación miogénica (**Figura 6.7 A**). En cambio, la tinción para la β -gal equivalente a la expresión del gen *Myf5*, más relacionado con la determinación miogénica, identificó a células mononucleares yuxtapuestas a los miotubos diferenciados, probablemente mioblastos o células madre musculares (**Figura 6.7 B**). La detección por inmunofluorescencia de proteínas miogénicas mostró una gran cantidad de células positivas para el marcador nuclear MIOGENINA, en muchos casos intuyéndose incluso que se trataban de los mionúcleos que formaban las miofibras multinucleadas al estar alineados y agrupados en líneas paralelas (**Figura 6.7 C-D**). Del mismo modo se detectó la expresión de la proteína estructural MYHC (**Figura 6.7 E-H**), revelando un cultivo con abundantes miotubos alargados y con cierta organización espacial. Las miofibras están formadas, entre otras cosas, por haces de miosina y de actina que pueden llegar a organizarse estructuralmente formando los sarcómeros a medida que va madurando la célula. Debido a que estos haces se encuentran intercalados entre sí, el anticuerpo anti-MYHC que reconoce los haces de miosina, remarcó un patrón claro de estriaciones (**Figura 6.7 G-H**), tal y como se observó anteriormente en el análisis por MET.

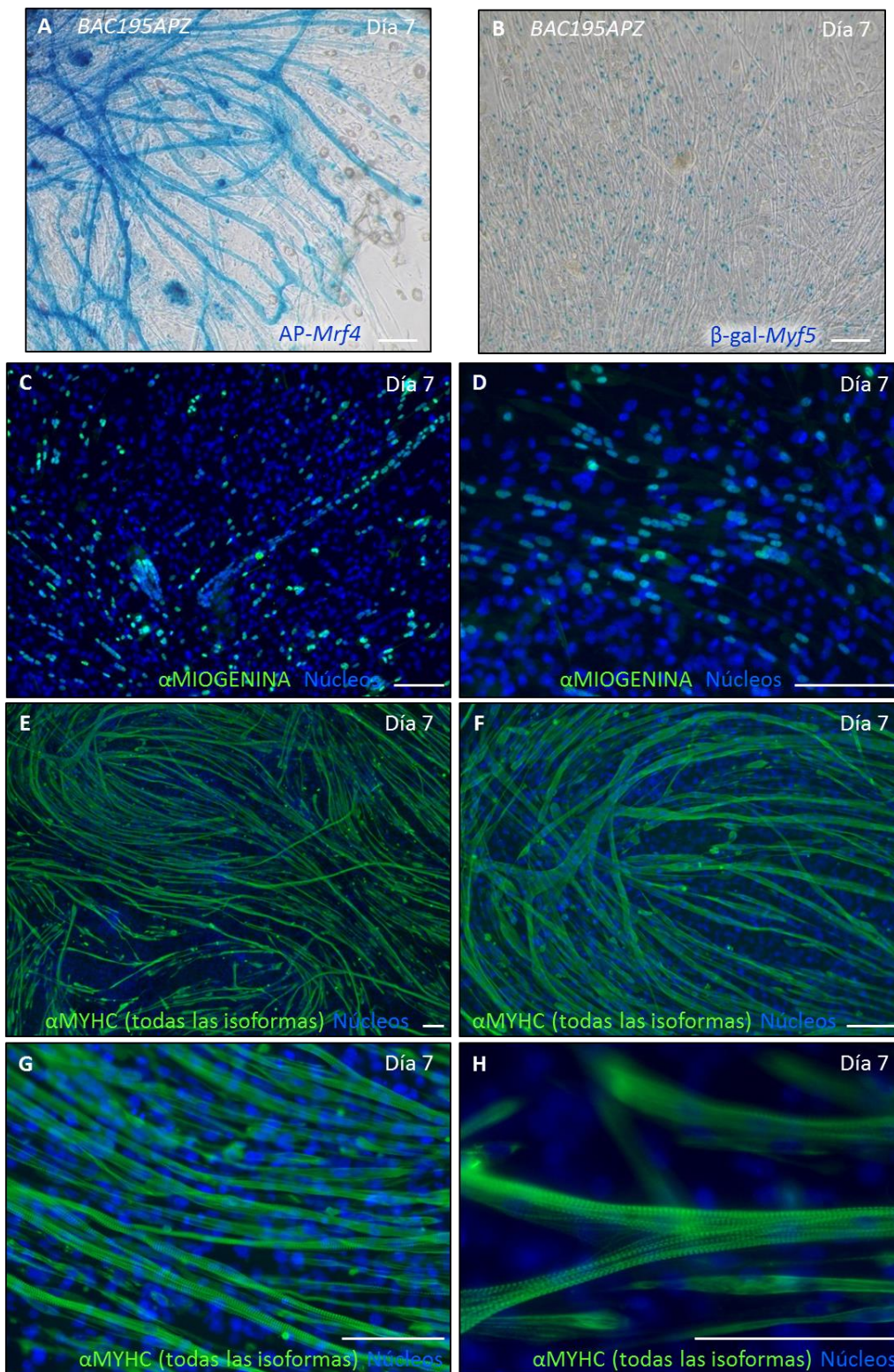


Figura 6.7. Expresión de genes y proteínas miogénicas a los 7 días en el cultivo en adhesión. **(A-B)** Tinción de color azul para la detección de la fosfatasa alcalina relativa a la expresión del gen *Mrf4* **(A)** y de la β-gal relativa a la expresión del gen *Myf5* **(B)** en muestras procedentes del ratón transgénico *B195APZ*. **(C-H)** Detección de las proteínas miogénicas MIOGENINA (verde) **(C-D)** y MYHC (todas las isoformas) (verde) **(E-H)** por inmunofluorescencia con los núcleos teñidos con Hoechst (azul), mostrando fotografías a distintas magnitudes. Las barras de tamaño representan 100 μm en todos los paneles.

Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de células con potencial miogénico que al cabo de los días de cultivo y en determinadas condiciones eran capaces de diferenciarse y especializarse en células musculares, formando un cultivo de miotubos o miofibras que presentaban el aspecto morfológico propio del músculo esquelético y marcadores típicos de este tipo muscular. Sin embargo, algunos detalles ultraestructurales no coincidían con la descripción de este tipo de tejido como la presencia de uniones entre célula-célula, no descritas en el músculo esquelético, pero sí en el cardíaco y en el liso. Además, en vista de la naturaleza contráctil de estas células, el estudio de la expresión de genes y proteínas cardíacas resultó necesario para descartar entre los distintos tipos de células musculares que se pudieran obtener *in vitro* (**Figura 6.8**). El resultado de la RT-qPCR fue concluyente al detectar rápidamente (C_q de valor bajo) el ARN mensajero del receptor de rianodina específico de músculo esquelético (*RyR1*) en los cultivos en adhesión a día 7 al igual que en el control positivo de músculo esquelético (**Figura 6.8 A**), y no el específico de músculo cardíaco (*RyR2*) (C_q de valor alto en las mismas muestras) (**Figura 6.8 B**); y al no detectar tampoco por *Western blot* la proteína cardíaca TROPONINA-I en los cultivos en adhesión de 7 días ni en el músculo esquelético, pero sí en el control positivo de músculo cardíaco (**Figura 6.8 C**), confirmándose el tipo de célula obtenido a partir de este cultivo como el de miotubos contractiles de músculo esquelético.

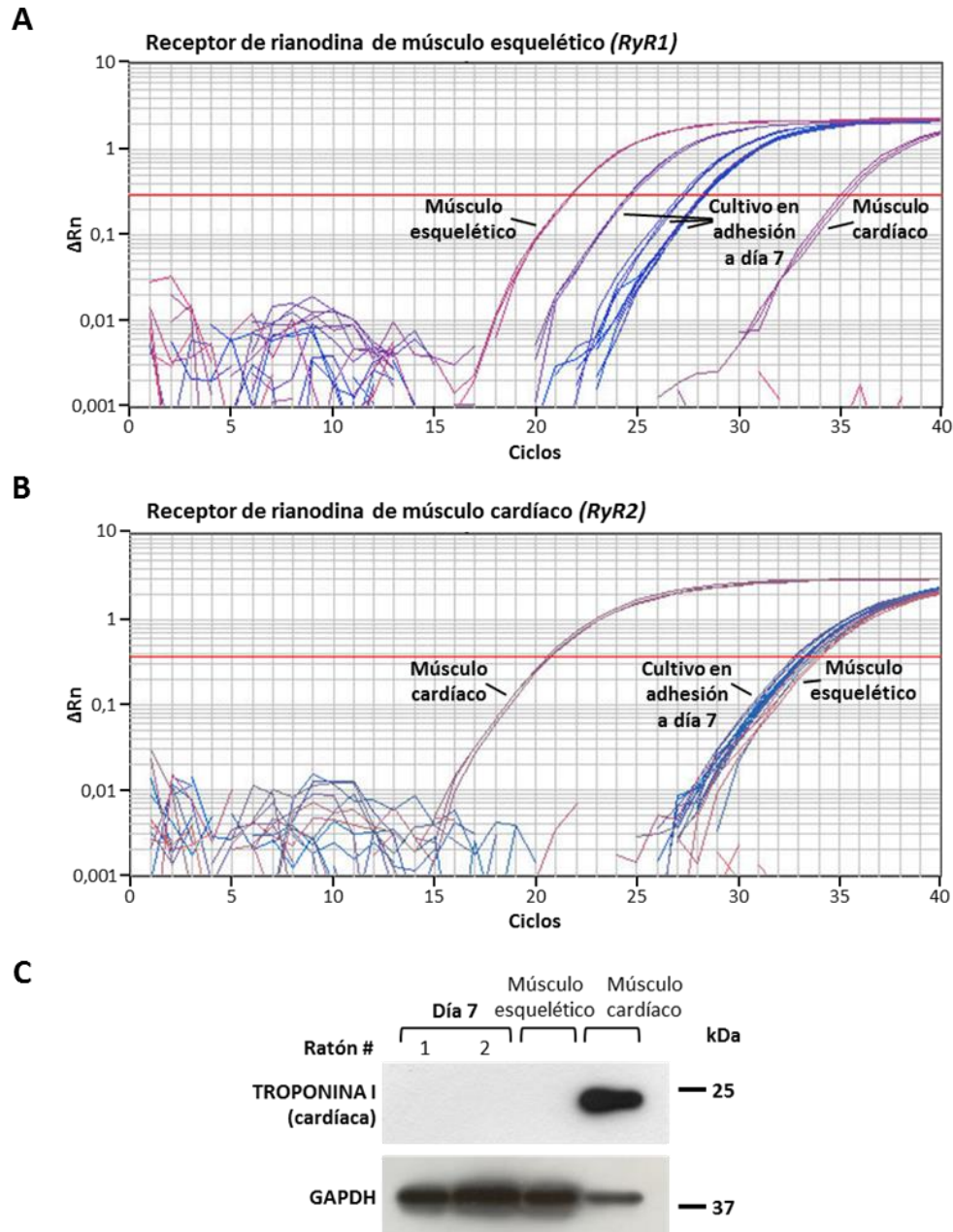


Figura 6.8. Expresión de genes y proteínas de músculo esquelético y cardíaco en el cultivo en adhesión a día 7. **(A-B)** Gráfica de amplificación del resultado de una RT-qPCR para la expresión del gen *RyR1* específico de músculo esquelético **(A)** y del gen *RyR2* específico de músculo cardíaco **(B)** en muestras de cultivo en adhesión a 7 días provenientes de tres ratones distintos y en los controles positivo o negativo según el caso de biopsias de músculo esquelético y cardíaco. Se representan la magnitud de la señal normalizada (ΔRn) versus los números de ciclo de la PCR. La línea roja representa el umbral, un punto estadísticamente significativo por encima del fondo. La intersección entre el umbral y la fase exponencial de la señal de cada muestra establece su valor C_t , el ciclo donde la fluorescencia emitida por el transcrito cruza el umbral. Cuando más bajo es este valor C_t , mayor es la expresión del transcrito. **(C)** Análisis de la expresión proteica de TROPONINA-I (cardíaca) por *Western blot* en cultivos en adhesión a los 7 días de 2 muestras independientes, en el músculo esquelético (control negativo) y en el músculo cardíaco (control positivo), utilizando el GAPDH como control de carga.

6.1.2 Caracterización electrofisiológica de los miotubos contráctiles

Una vez finalizada la caracterización morfológica, estructural y de expresión de marcadores específicos se prosiguió con algunos estudios funcionales para determinar la naturaleza de las contracciones observadas y los receptores implicados en este fenómeno. Para ello, se realizaron diversos experimentos electrofisiológicos por medio de la técnica de *patch-clamp* o de registro por fijación de membranas en cultivos diferenciados (**Figura 6.9, 6.10 y 6.11**).

En una primera aproximación utilizando la variación del parche perforado, manteniendo la resistencia constante y con el voltaje de la membrana fijado a -80mV se midió la corriente iónica generada por el miotubo parcheado en respuesta al estímulo de unos pulsos de 250 milisegundos de distintas soluciones con ACh $100\ \mu\text{M}$ (**Figura 6.9 A-B**). Con una solución basal (Control), la ACh provocó unas corrientes de entrada de $2\ \text{nA}$ rápidas que 5 segundos hasta estabilizarse de nuevo (**Figura 6.9 A**). Con una solución sin Ca^{2+} la corriente generada fue algo menor y la estabilización se alcanzó antes, mientras que en cambio, con una solución sin Ca^{2+} ni Na^+ , la corriente se encontró drásticamente comprometida (**Figura 6.9 A**), por lo que se estableció la participación de estos dos iones en las corrientes causadas por ACh en los miotubos analizados. Lo mismo se observó al representar este experimento en una gráfica donde se muestran en cada caso de solución los porcentajes del pico de la corriente (I_{ACh}) y del pico de carga (Q_{ACh}) provocados por la acetilcolina y normalizados según el pulso inicial, la ausencia de iones de Ca^{2+} y Na^+ resultó en una llamativa reducción de los picos de I_{ACh} y Q_{ACh} (**Figura 6.9 B**).

Siguiendo con la misma técnica con la variación del parche perforado, manteniendo la resistencia constante, pero cambiando a fijar la corriente se midieron las variaciones en el voltaje de la membrana del miotubo parcheado. En esta ocasión, los potenciales de acción captados en un miotubo contrayéndose de manera espontánea fueron suprimidos en presencia de una solución con TTX $1\ \mu\text{M}$, toxina bloqueante de los canales de sodio y que impide la despolarización de la membrana (**Figura 6.9 C**). Para una caracterización adicional de los receptores implicados en este suceso se ensayó el bloqueante neuromuscular dTC a $10\ \mu\text{M}$. Este fármaco actúa sobre los receptores nicotínicos de manera competitiva reduciendo la frecuencia de apertura de los canales iónicos acoplados, inhibiendo la despolarización y produciendo así una parálisis muscular. Se confirmó la presencia de receptores nicotínicos en los miotubos contráctiles ya que con este

fármaco se bloqueó de manera reversible aproximadamente en un 90% el pico de I_{ACh} y el pico de Q_{ACh} provocados por la acetilcolina y normalizados según el pulso inicial (**Figura 6.9 D**).

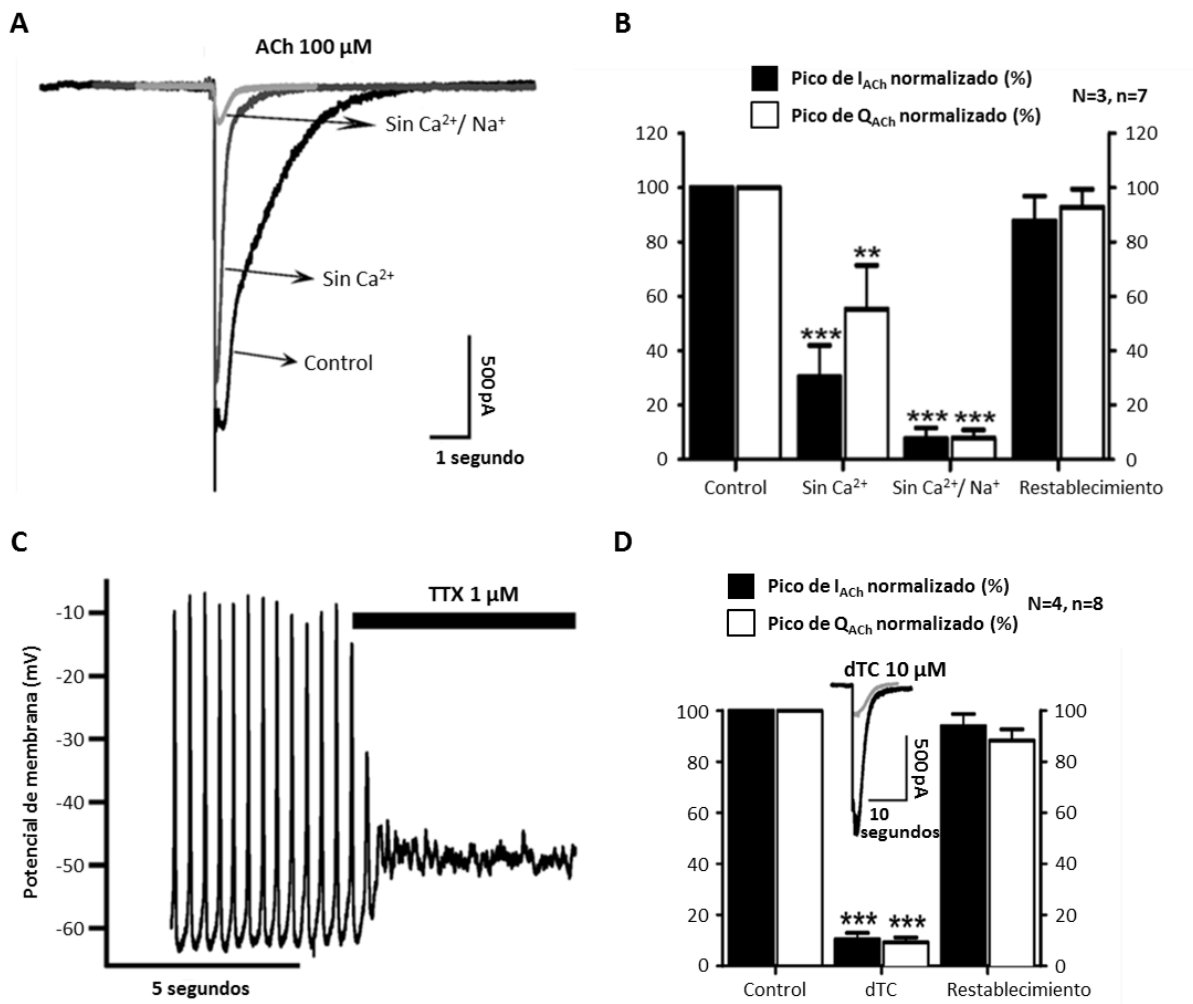
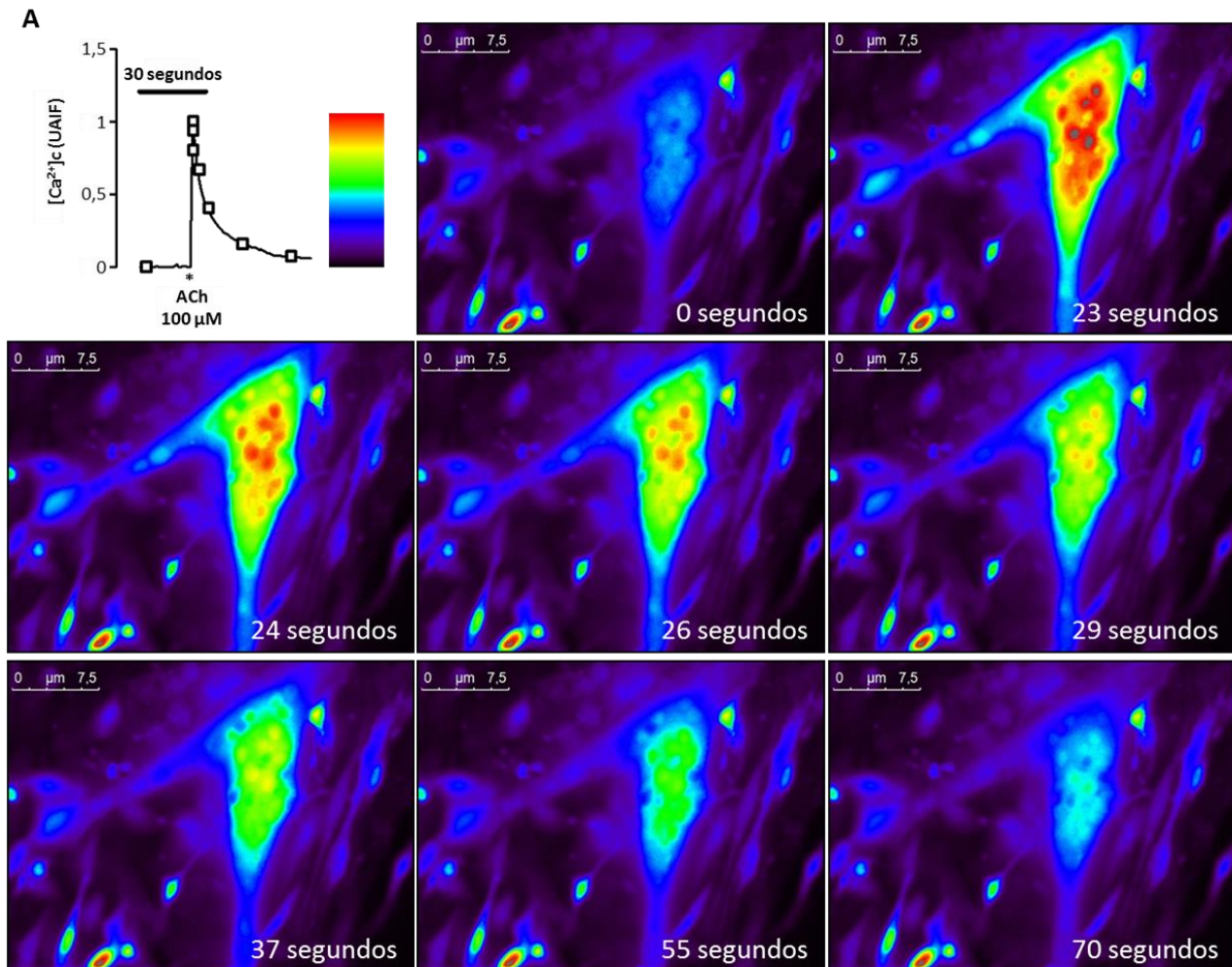


Figura 6.9. Medición de las corrientes iónicas y las variaciones en el voltaje de la membrana de los miotubos contráctiles de cultivos en adhesión a día 10. **(A-B)** Registros de corrientes iónicas en condiciones de parche perforado, la resistencia constante y el voltaje de la membrana fijado. **(A)** Corrientes iónicas provocadas por la ACh en una solución control, sin Ca^{2+} y sin Ca^{2+} ni Na^+ . **(B)** Representación cuantitativa en valores de porcentajes del efecto causado por la eliminación del Ca^{2+} y del Ca^{2+} y del Na^+ y del restablecimiento en el pico de corriente (I_{ACh}) y en el pico de carga (Q_{ACh}) provocados por la acetilcolina y normalizados según el pulso inicial. **(C-D)** Registros de cambios en el voltaje en condiciones de parche perforado, la resistencia constante y la corriente fijada. **(C)** Supresión de los potenciales de acción espontáneos de un miotubo contráctil por la TTX. **(D)** Efecto bloqueante de la dTC en el pico de corriente (I_{ACh}) y en el pico de carga (Q_{ACh}) provocados por la acetilcolina y normalizados según el pulso inicial, representados en una gráfica con valores de porcentajes. Los datos de los paneles B y D se muestran como las medias y el SEM del número de células analizadas (n) de cultivos diferentes (N) indicado entre paréntesis en cada panel. Los asteriscos representan el valor de p según si $p < 0,01$ ** o $p < 0,001$ ***.

La contracción muscular es un proceso que depende de la liberación del Ca^{2+} desde el RS al citoplasma de la célula. En este sentido, se estudió la señalización de la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) mediada por la estimulación de los receptores de ACh con la ayuda de la sonda fluorescente de Ca^{2+} Fura-2 AM. Las células estimuladas por un pulso de ACh $100 \mu\text{M}$ incrementaron su $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tal y como se muestra en la secuencia de fotogramas tomadas a distintos tiempos tras la aplicación (**Figura 6.10**).



Estos cultivos se ensayaron también frente a otros estímulos tales como la nicotina, la cafeína y la histamina, y se midieron los efectos causados en la $[Ca^{2+}]_c$ (**Figura 6.11 A-D**). Los miotubos contráctiles parcheados respondieron a las soluciones con nicotina 30 μ M y con cafeína 20 mM, pero no a la solución con histamina 100 μ M (**Figura 6.11 A-B**). Sin embargo, al analizar otra población celular distinta a los miotubos y también presente en los cultivos, estas tuvieron un patrón de respuesta opuesto, respondieron a la solución con histamina 100 μ M, pero no a las soluciones con nicotina 30 μ M o con cafeína 20 mM (**Figura 6.11 C-D**). La respuesta frente a la ACh y a la nicotina indicó la presencia de receptores nicotínicos, y en este punto se planteó la pregunta de si los incrementos en la $[Ca^{2+}]_c$ observados sucedían a través de los receptores dihidropiridínicos sensibles a cambios de voltaje, que son canales de calcio de tipo L, tal y como ocurría en la contracción muscular para conseguir la activación mecánica de los receptores de rianodina del RS tras la despolarización de la membrana. De modo que se estudió el desplazamiento de la $[Ca^{2+}]_c$ mediada por la ACh en presencia de una solución con nifedipina 3 μ M, bloqueador de este tipo de canales. Sin embargo, no se observó efecto alguno tras la incubación con la solución bloqueante, la amplitud del pico de calcio se mantuvo inalterada (**Figura 6.11 E**). En cambio, una solución con el bloqueante neuromuscular dTC 10 μ M redujo el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ inducida por la ACh, denotando la presencia de receptores nicotínicos y la vía de acción a través de la interacción con ellos (**Figura 6.11 F**).

En conjunto, estos resultados indicaron que los miotubos presentaban corrientes de entrada dependientes de Ca^{2+} y Na^+ provocadas por ACh, potenciales de acción sensibles a TTX, potenciales de acción y elevación transitoria de la $[Ca^{2+}]_c$ sensibles a dTC, elevación transitoria de la $[Ca^{2+}]_c$ provocada por ACh, nicotina y cafeína, y la implicación de receptores nicotínicos en estos procesos.

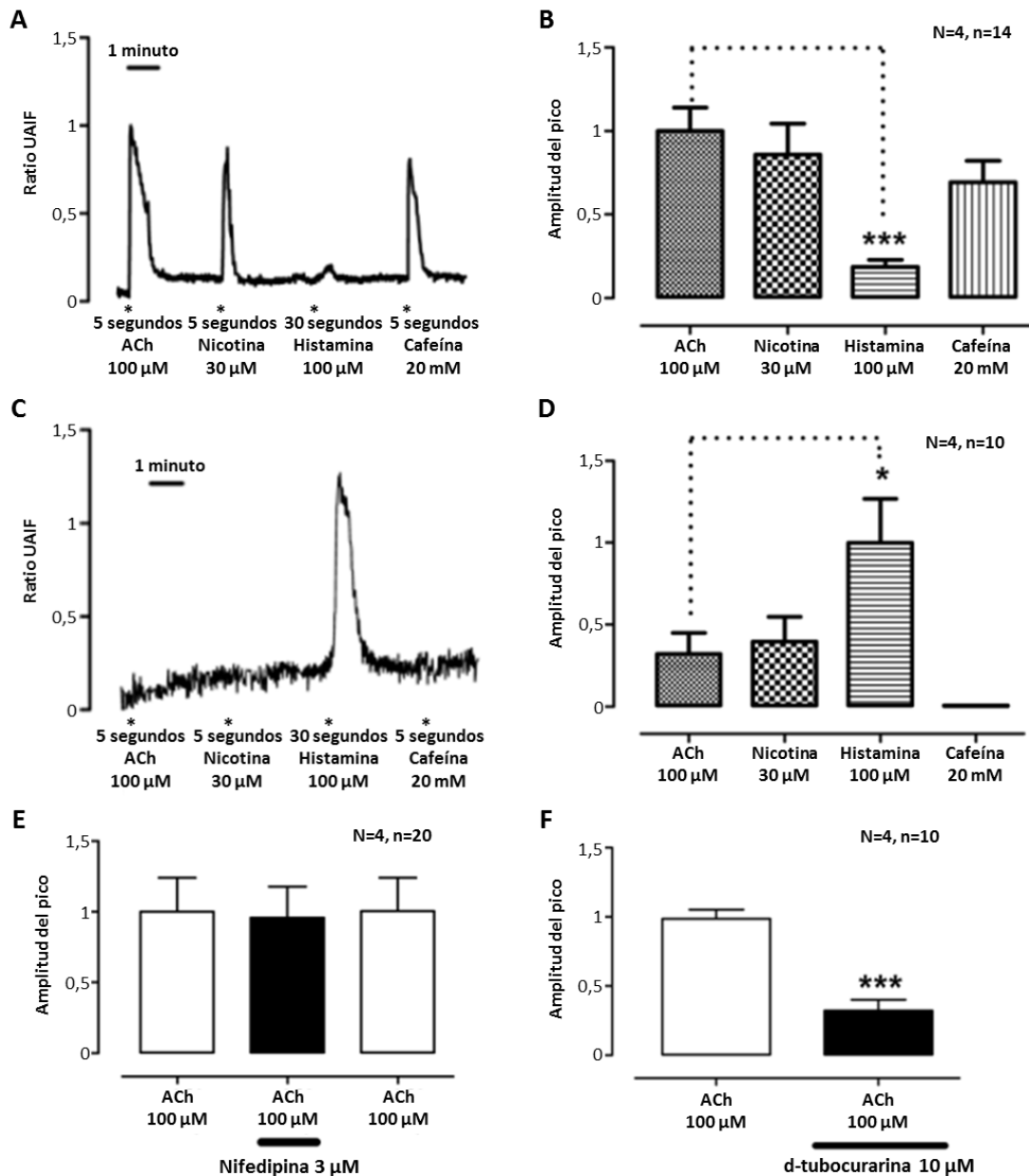


Figura 6.11. Análisis del efecto de diversos compuestos en la concentración de calcio citosólico en cultivos en adhesión a 10 días. **(A)** Cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ de un miotubo representados por los picos equivalentes al ratio de la UAIF emitida por la sonda de Ca_{2+} Fura-2 AM tras recibir el estímulo de la ACh, nicotina, histamina y cafeína. **(B)** Gráfica donde se muestra la amplitud del pico generada en cada caso analizado en el panel **(A)**. **(C)** Cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ de una célula diferente (no miotubo) representados por los picos equivalentes al ratio de la UAIF emitida por la sonda de Ca_{2+} Fura-2 AM tras recibir el estímulo de la ACh, nicotina, histamina y cafeína. **(D)** Gráfica donde se muestra la amplitud del pico generada en cada caso analizado en el panel **(C)**. **(E)** Efecto de la nifedipina en la $[Ca^{2+}]_c$ inducida por la ACh de un miotubo mostrando la amplitud del pico del ratio de la UAIF generada en cada situación. **(F)** Efecto de la dTC en la $[Ca^{2+}]_c$ inducida por la ACh de un miotubo exponiendo la amplitud del pico del ratio de la UAIF generada en cada caso. Los datos de los paneles B, D, E y F se muestran como las medias y el SEM del número de células analizadas (n) de cultivos diferentes (N) indicado entre paréntesis en cada panel. Los asteriscos representan el valor de p según si $p < 0,05$ * o $p < 0,001$ ***.

Las contracciones en el tejido muscular de un ser vivo suceden en un contexto de unión neurona-músculo, siendo la primera la que emite la orden de la acción del segundo. Se inician como una señal neuronal que migra hasta las uniones neuromusculares entre el axón y la fibra muscular y cuando el impulso nervioso llega a esta sinapsis se liberan los neurotransmisores como la acetilcolina. El inicio de este impulso está ligado a la presencia de una neurona que establece una conexión con el músculo. En condiciones *in vitro*, los cultivos primarios murinos de miofibras generadas a partir de biopsias obtenidas de animales adultos pueden llegar a contraerse por mecanismos similares gracias a la unión funcional con una neurona, sin embargo, está descrito igualmente la capacidad que tienen estos miotubos de contraerse de manera espontánea sin la necesidad de recibir una señal impulsora procedente de una neurona (Dennis and Kosnik, 2000; Smolina *et al.*, 2015). En el cultivo generado se llegaron a observar estructuras e interacciones celulares que recordaban a una placa motora en contacto con un axón (**Figura 6.12 A, recuadro y A'**), y a su vez, confirmando lo que indicaban los resultados de los experimentos de electrofisiología, la α -bungarotoxina conjugada con un marcaje fluorescente señaló los receptores nicotínicos de la ACh presentes en los miotubos maduros (**Figura 6.12 B, recuadro y B', flechas blancas**). A pesar de que el método de cultivo utilizado estaba basado inicialmente en un protocolo para la generación y cultivo de neuronas se desconocía si se obtenían neuronas o células similares al término del proceso después de las modificaciones realizadas en el sistema. Pese a los cambios introducidos se halló una abundante red de células con largas prolongaciones positivas para la proteína β -III-TUBULINA detectadas mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo específico para la isoforma neuronal (**Figura 6.12 C-D**).

Estos resultados indicaron que las condiciones de cultivo *in vitro* empleadas promovían la maduración de los miotubos que exhibían receptores de acetilcolina funcionales, el agrupamiento de los mismos a lo largo de las fibras y el crecimiento de células morfológicamente similares a las neuronas que expresaban marcadores específicos. Por consiguiente, se presentaba la posibilidad de generar un co-cultivo entre células músculo-esqueléticas y neuronas mediante la optimización de este sistema.

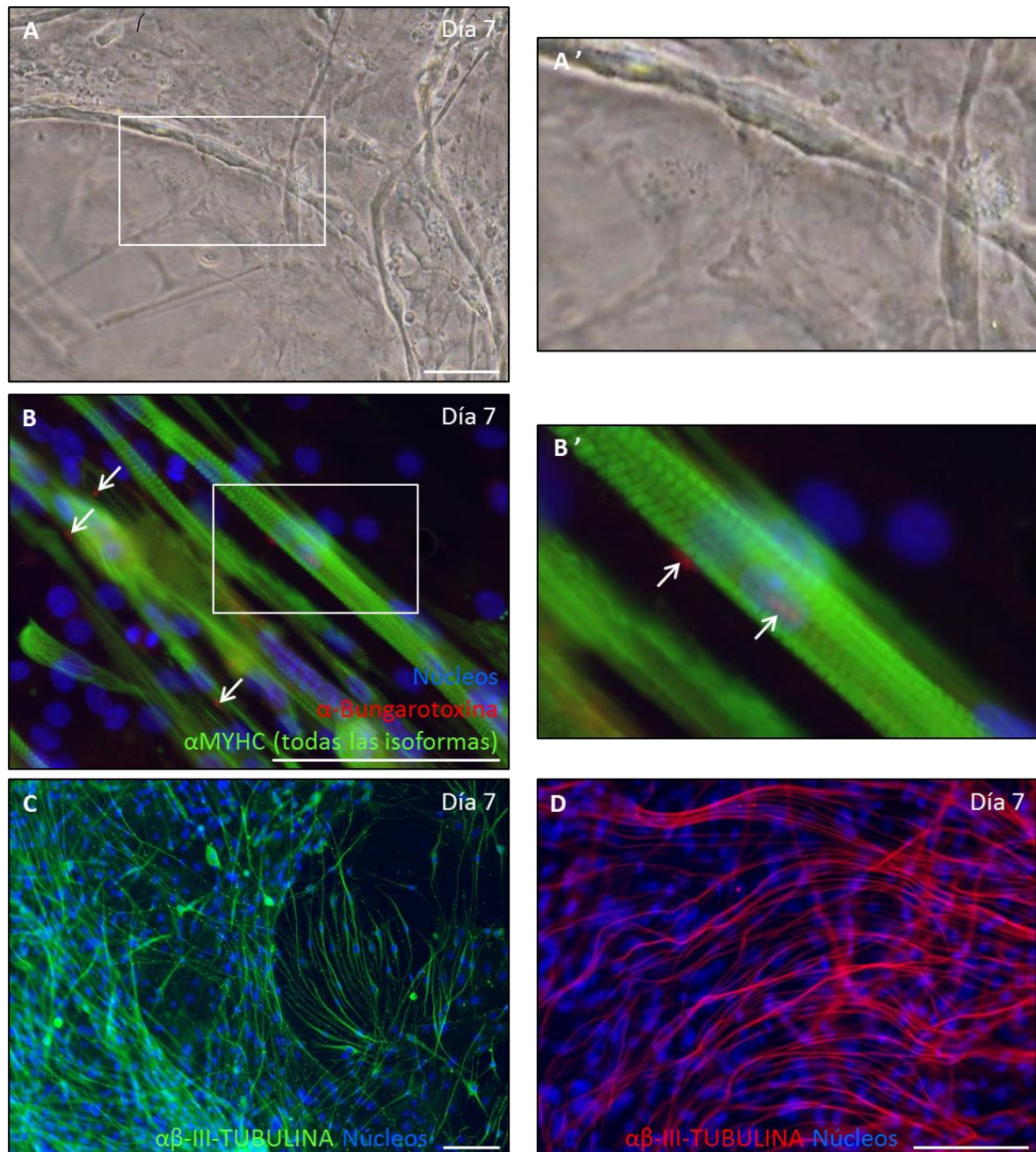


Figura 6.12. Estudio de la presencia de células neuronales y signos de posibles interacciones entre neurona-músculo en cultivos en adhesión a los 7 días. **(A, detalle en A')** Fotografía de microscopio óptico donde se puede observar cómo las prolongaciones de una célula se unen a una estructura similar a la de una placa motora de un miotubo adyacente. **(B, detalle en B')** Identificación de los receptores nicotínicos de la ACh con el uso del antagonista selectivo α -bungarotoxina marcado con fluorescencia (rojo) junto con la detección de la proteína MYHC (todas las isoformas) por inmunofluorescencia, localizando así los receptores presentes en los miotubos (flechas blancas). **(C-D)** Células que expresan la isoforma neuronal de la proteína β -III-TUBULINA detectadas por inmunofluorescencia (verde panel C, rojo panel D). En los paneles B, B', C y D los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Las barras de tamaño representan 100 μ m en todos los paneles.

6.1.3 Comparación del potencial miogénico del método utilizado con el de un protocolo descrito anteriormente

A pesar de que varios estudios habían abordado el tema del potencial miogénico de las células de la piel, a menudo faltaban datos cuantitativos al respecto. Debido a la robusta diferenciación de músculo esquelético obtenida en este trabajo y a la notable contractibilidad observada se decidió compararlo con un protocolo de diferenciación miogénica a partir de piel publicado por (Qiu *et al.*, 2010) realizando todos los experimentos en paralelo. Tanto el aislamiento celular como la fase inicial del cultivo en suspensión se realizaron en común para luego dividir las células obtenidas en dos tipos de cultivo en adhesión diferentes (**Figura 6.13**). De esta manera se pretendía evaluar el efecto de los medios de cultivo y sustratos utilizados en la fusión y formación de los miofibros. El nuevo protocolo que se estableció para la comparativa se basaba en el uso de un agente inhibidor de la metilación del ADN, la 5-Azacitidina, como inductor de la diferenciación miogénica, método compartido por varios otros grupos. El sustrato utilizado como soporte de esta diferenciación celular difería también por el uso del PLO. Se llevó a cabo un proceso de diferenciación en paralelo y se efectuó una comparación directa de los cultivos finales obtenidos a través del análisis de la expresión génica por RT-qPCR (**Figura 6.14, 6.15 y 6.16**) y de la expresión proteica por inmunofluorescencia (**Figura 6.17 y 6.18**) a día 1 y a los 12 días de cultivo en adhesión.

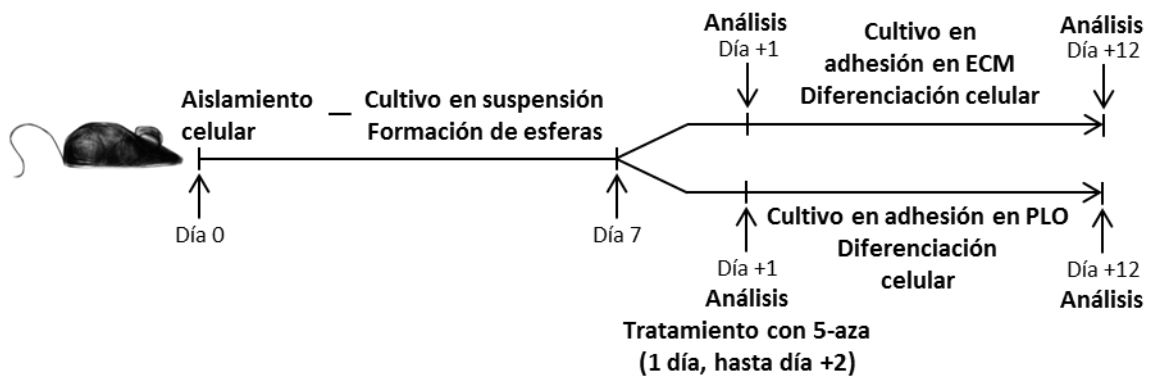


Figura 6.13. Esquema de los protocolos de cultivo *in vitro* utilizados en paralelo, siendo el de arriba el descrito en este trabajo y el de abajo el descrito por (Qiu *et al.*, 2010).

Inicialmente se evaluó la expresión de genes miogénicos en cada tipo de cultivo. En el caso de los cultivos con el sustrato de PLO (**Figura 6.14**), la expresión génica del factor de transcripción *Pax7*, expresado por las células madre musculares con un papel esencial en la especificación miogénica, era mayor al inicio del cultivo, de acuerdo con el papel de este factor y con la evolución

del cultivo hacia la especificación celular (**Figura 6.14 A**). En concordancia con este hecho, la expresión de los demás genes miogénicos analizados *MyoD1*, *Miogenina*, *MyH3* y *MyH2*; con papeles en la determinación, fusión y formación de los miotubos, aumentó al cabo de los días de cultivo (**Figura 6.14 B-E**). En cambio, en los cultivos con el sustrato de ECM (**Figura 6.15**), a excepción de en la muestra 1, la expresión de todos los genes analizados aumentaba a los 12 días; la de los factores más tardíos *MyoD1* y *Miogenina* (**Figura 6.15 B-C**), la de las proteínas miogénicas estructurales *MyH3* y *MyH2* (**Figura 6.15 D-E**) e incluso la del factor miogénico principal *Pax7*, que se encontraba disminuido en los cultivos con el sustrato de PLO (**Figura 6.15 A y 6.14 A**). La muestra 1 presentaba una expresión mayor a día 1 en todos los genes analizados, evidenciando una variabilidad entre cultivos que no se apreció tan llamativamente en los cultivos con el sustrato de PLO.

Después de esta primera evaluación, los datos de cada muestra se normalizaron en base a la expresión de su respectivo día 1 a fin de comparar entre sí los datos normalizados de la expresión a día 12 de cada protocolo procedentes de un mismo ratón, y de esta manera, establecer las diferencias en el potencial miogénico de cada tipo de cultivo (**Figura 6.16**). Salvo en la muestra 1, los transcritos de los genes *Pax7*, *MyoD1*, *Miogenina*, *MyH3* y *MyH2* se encontraban significativamente sobreexpresados en los cultivos que tenían como sustrato el ECM en comparación con los cultivos que tenían como sustrato el PLO (**Figura 6.16 A-E respectivamente**), es decir, los cultivos celulares obtenidos siguiendo el protocolo descrito en este trabajo eran más miogénicos. Volviendo a la muestra que se diferenciaba de la tendencia general, tal y como se ha comentado antes, la muestra 1 cultivada con el sustrato de ECM exhibía una expresión bastante mayor de todos los genes a día 1 (**Figura 6.15**) por lo que al normalizar los datos respecto a ese día 1 el resultado fue de una expresión muy baja a día 12, que al comparar con los respectivos datos de los cultivos con el sustrato de PLO, estos resultaban superiores. A pesar de que este dato señalaba una notable variabilidad del protocolo descrito en este trabajo, también demostraba que era capaz de generar una respuesta miogénica muy rápida y potente en tan sólo un día de cultivo.

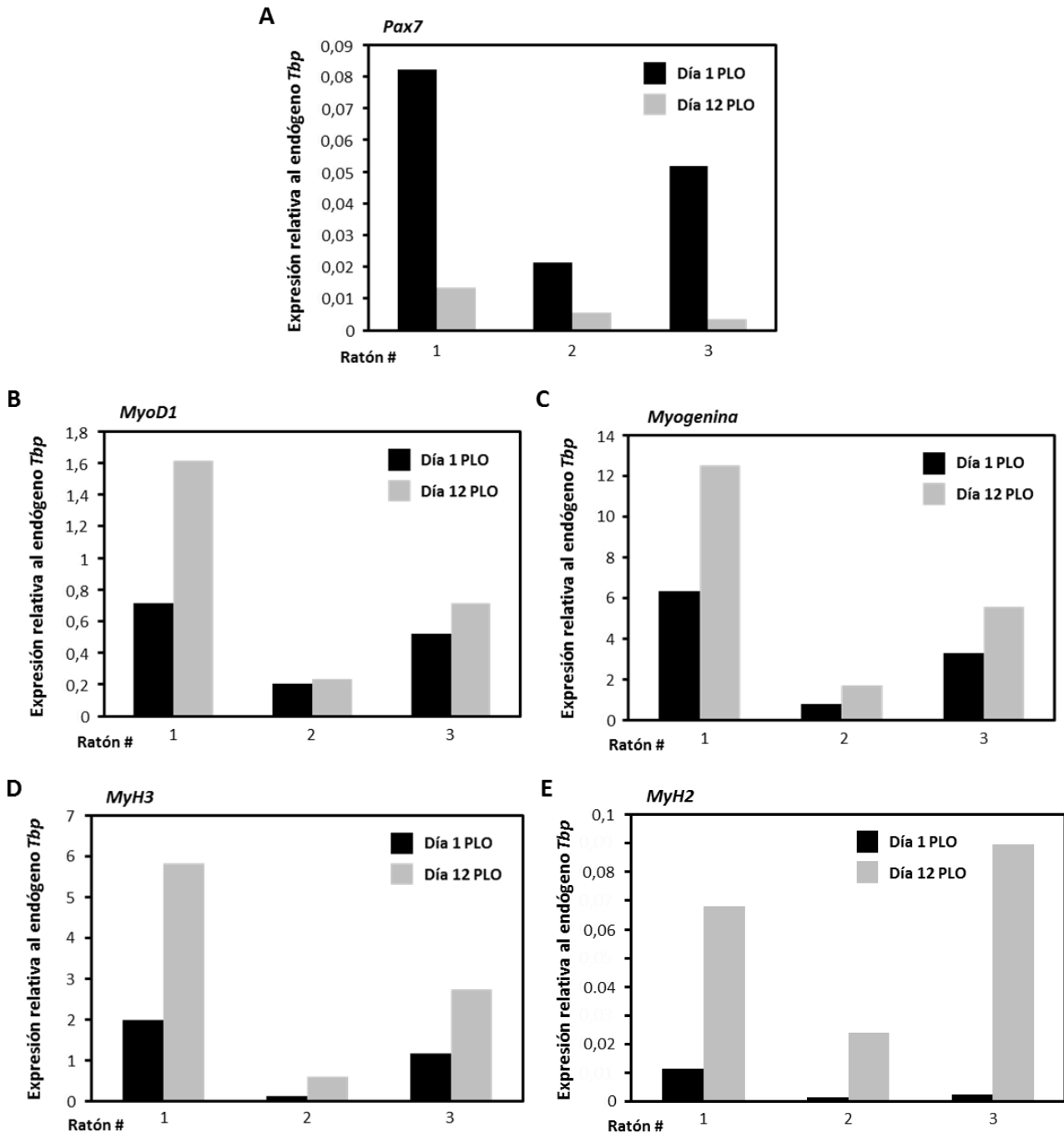


Figura 6.14. Cuantificación de la expresión de determinados genes miogénicos a día 1 y a día 12 del cultivo en adhesión con sustrato de PLO tras seguir el protocolo descrito por (Qiu *et al.*, 2010). Se analizó la expresión de los genes *Pax7* (A), *MyoD1* (B), *Myogenina* (C), *MyH3* (D) y *MyH2* (E). En todos los casos se muestran los valores obtenidos de muestras provenientes de tres ratones distintos y se representan relativizados a la expresión del gen endógeno *Tbp*.

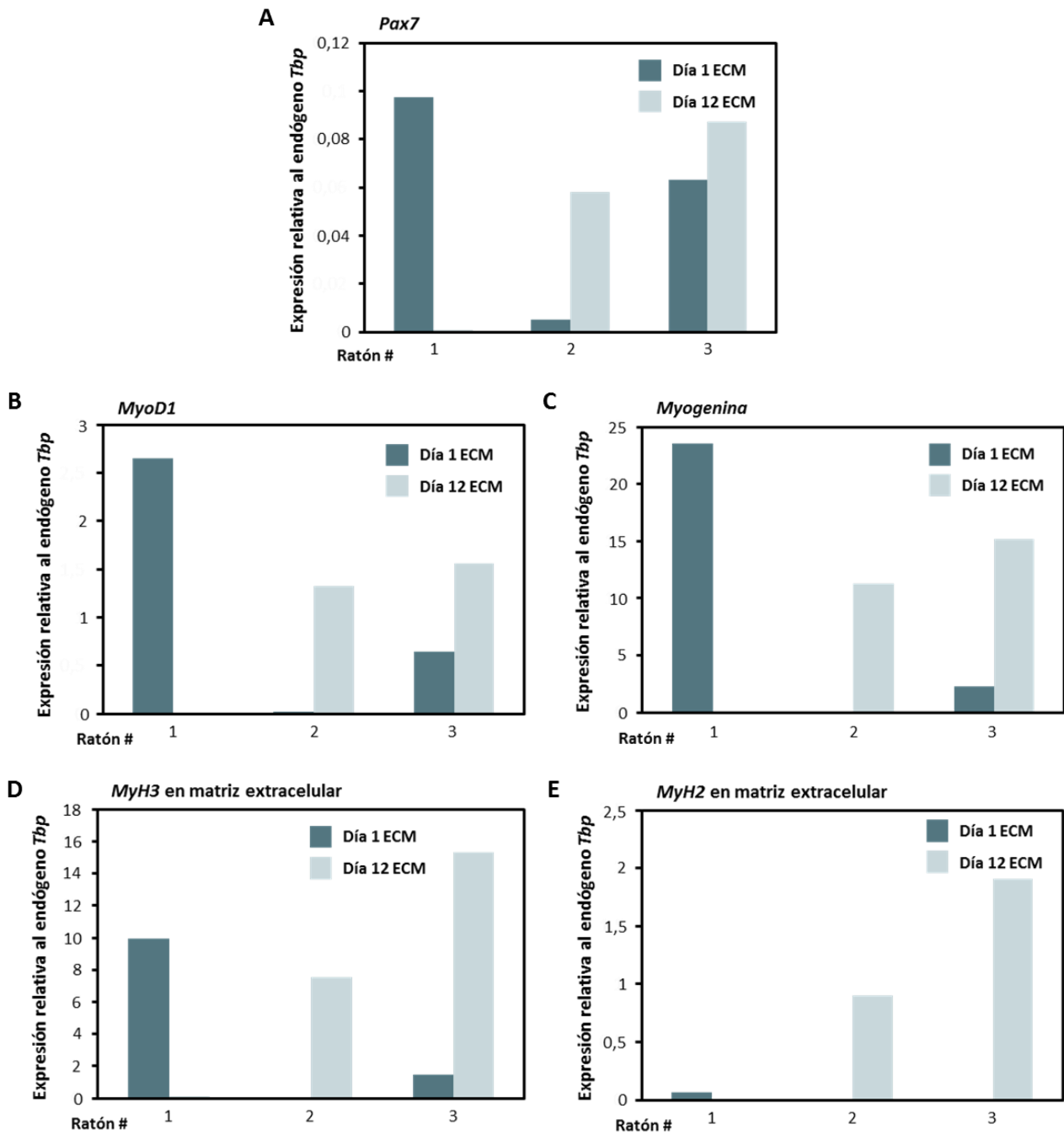


Figura 6.15. Cuantificación de la expresión de determinados genes miogénicos a día 1 y a día 12 del cultivo en adhesión con sustrato de ECM tras seguir el protocolo descrito en este trabajo. Se analizó la expresión de los genes *Pax7* (A), *MyoD1* (B), *Myogenina* (C), *MyH3* (D) y *MyH2* (E). En todos los casos se muestran los valores obtenidos de muestras provenientes de tres ratones distintos y se representan relativizados a la expresión del gen endógeno *Tbp*.

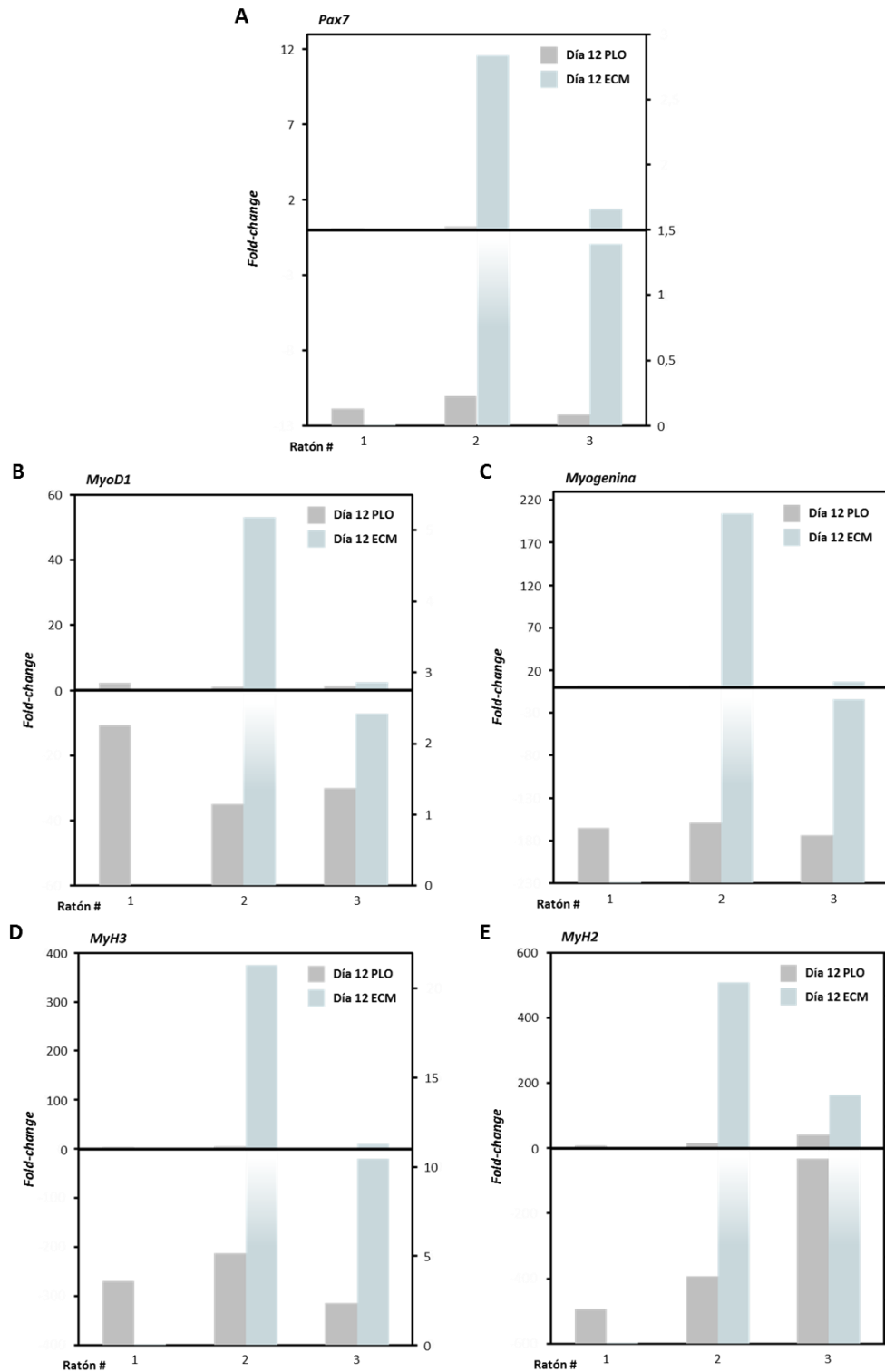


Figura 6.16. Comparativa de la expresión de determinados genes miogénicos a día 12 de cultivo en adhesión entre los de sustrato de PLO y los de sustrato de ECM. Se analizó la expresión de los genes *Pax7* (A), *MyoD1* (B), *Myogenina* (C), *MyH3* (D) y *MyH2* (E). En todos los casos se muestran los valores obtenidos de muestras provenientes de tres ratones distintos y los datos se muestran en *fold-change* normalizados respecto a su correspondiente día 1 en gráficas dobles, donde se representan en la parte superior todos los datos en referencia al eje izquierdo y en la parte inferior los mismos datos pero en referencia al eje derecho que dispone de una escala menor para poder ver los valores de los datos de forma adecuada.

Seguidamente se evaluó la expresión proteica de estos cultivos por inmunofluorescencia. La detección de MYHC (**Figura 6.17**) mostró de manera cualitativa que a día 1 había más células comenzando a fusionarse en los cultivos con sustrato de ECM (**Figura 6.17 C**) que en aquellos con sustrato de PLO (**Figura 6.17 A**). Consecuentemente, al cabo de 12 días se detectaron menos miotubos y de peor aspecto en los cultivos con el sustrato de PLO (**Figura 6.17 B**) en comparación con los obtenidos en los cultivos con sustrato de ECM (**Figura 6.17 D**). Del mismo modo, se cuantificó el número de células que expresaban MIOGENINA a los días 1 y 12 de cultivo en adhesión en sustrato de PLO (**Figura 6.18 A-B**) y en sustrato de ECM (**Figura 6.18 C-D**). Se observó una tendencia positiva, salvo en la muestra 1, hacia una mayor miogénesis en los cultivos con sustrato de ECM, que presentaban a los 12 días mayor cantidad de células con el marcaje fluorescente (**Figura 6.18 E**). Sin embargo, esta cuantificación no mostró diferencias significativas entre los dos tipos de cultivos. Como en el análisis anterior, en el caso de la muestra 1 cultivada con el soporte de ECM, a día 1 mostraba mayor cantidad de células que expresaban esta proteína que a día 12, mayor incluso que en los cultivos con el sustrato de PLO tanto a día 1 como a día 12. Estos resultados apuntaban a una generación de miotubos más rápida y esencialmente mejor en los cultivos con sustrato de ECM.

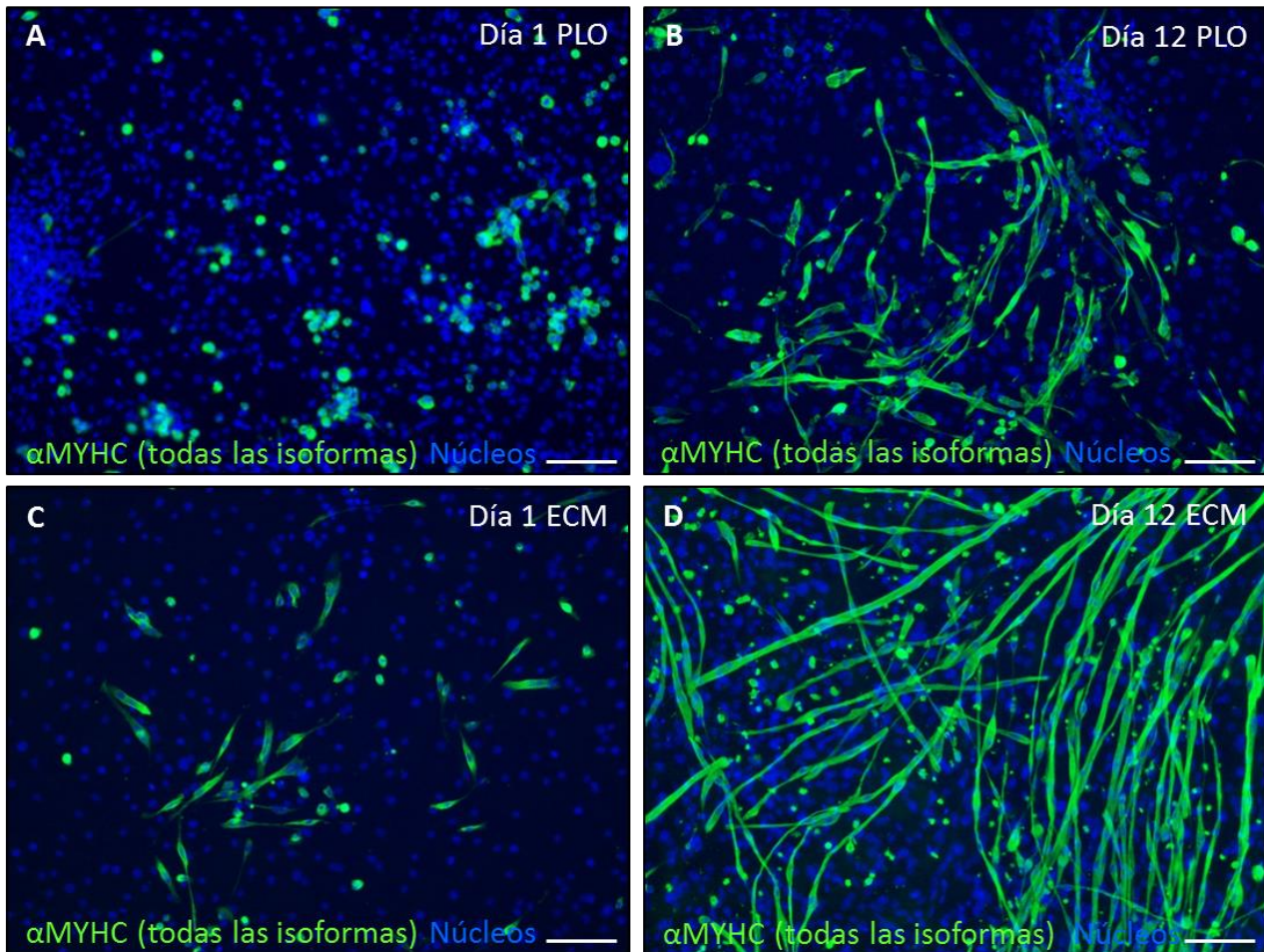


Figura 6.17. Detección de la proteína MYHC (todas las isoformas) por inmunofluorescencia en cultivos en adhesión diferenciados en paralelo. **(A-B)** Cultivos con soporte de PLO que expresan células positivas para este marcaje (verde) a día 1 **(A)** y a día 12 **(B)** de cultivo. **(C-D)** Cultivos con soporte de ECM que expresan células positivas para este marcaje (verde) a día 1 **(C)** y a día 12 **(D)** de cultivo. En todos los paneles los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μ m.

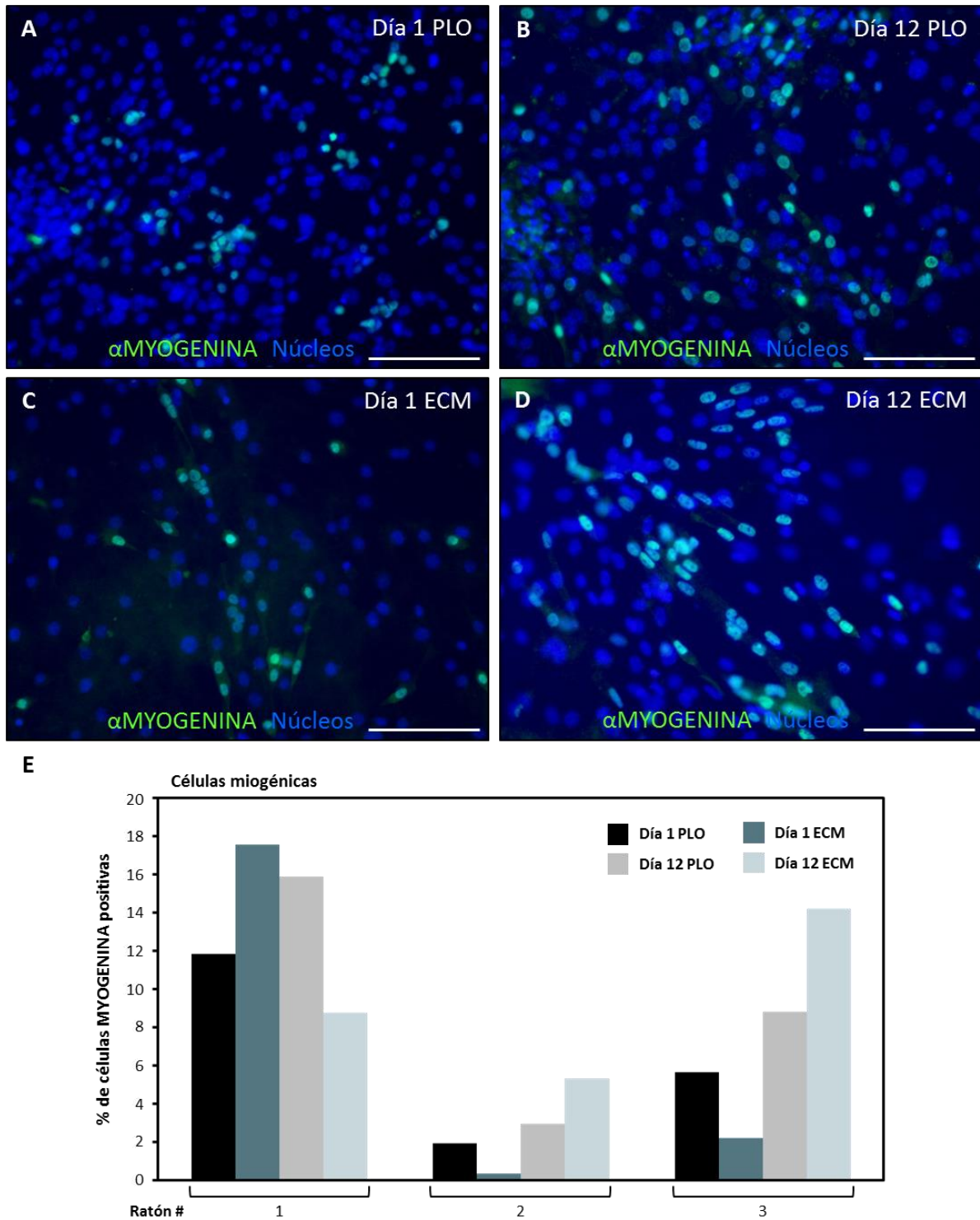


Figura 6.18. Cuantificación de las células positivas para la proteína MIOGENINA detectada por inmunofluorescencia en cultivos en adhesión diferenciados en paralelo. **(A-B)** Cultivos con soporte de PLO que expresan células positivas para este marcaje (verde) a día 1 **(A)** y a día 12 **(B)** de cultivo. **(C-D)** Cultivos con soporte de ECM que expresan células positivas para este marcaje (verde) a día 1 **(C)** y a día 12 **(D)** de cultivo. **(E)** Gráfica donde se representan los porcentajes de células positivas para este marcaje en cada uno de los casos obtenidos de muestras provenientes de tres ratones distintos. En los paneles A, B, C y D los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μ m.

6.1.4 Estudio de la evolución a largo plazo del cultivo celular obtenido

En referencia a las otras poblaciones celulares observadas en cultivo, con el paso del tiempo se observó un deterioro de los miotubos y un aumento de células redondeadas con vesículas en su interior. Estas células resultaron ser adipocitos tal y como mostró la tinción con el colorante de lípidos *Oil Red O* (Figura 6.19).

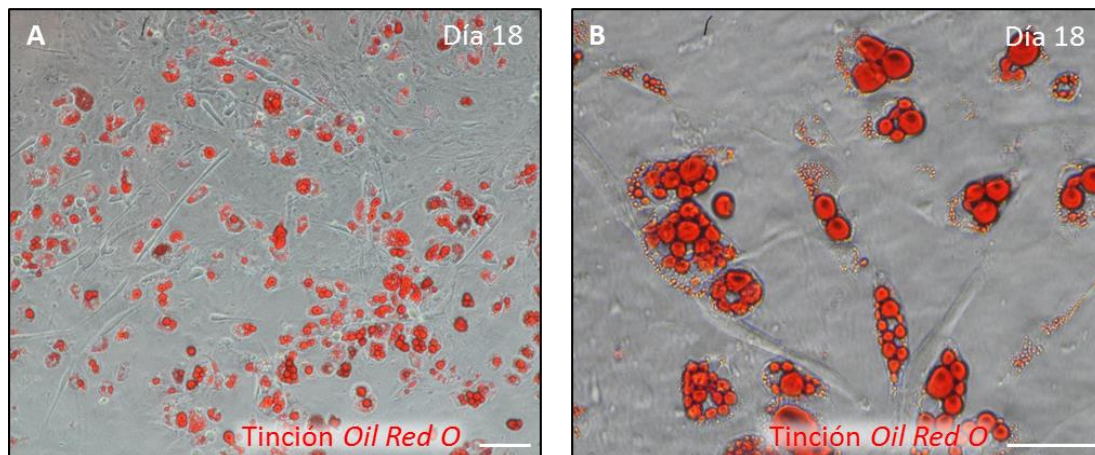


Figura 6.19. Caracterización de las células vesiculares presentes en los cultivos en adhesión a los 18 días. (A-B) Fotografías de microscopio óptico de cultivos en adhesión teñidos con *Oil Red O* donde resaltan en rojo las agrupaciones de vesículas lipídicas que se encuentran dentro de las células. En todos los paneles las barras de tamaño representan 100 μm .

Esta coexistencia, al parecer competitiva o dependiente, de estas dos poblaciones resultó ser de gran interés dado que la degeneración del músculo *in vivo* es concomitante con la infiltración grasa. De modo que para caracterizar este fenómeno simultáneo, primero se comprobó la aparición de estos adipocitos con el paso del tiempo (Figura 6.20). Por un lado, se analizaron los cultivos en adhesión por medio de una tinción cualitativa de *Oil Red O* a los días 1, 7, 14, 21 y 28, en los cuales se observó *de visu* el aumento de esta población a medida que pasaba el tiempo (Figura 6.20 A-E respectivamente), hecho que fue corroborado de manera semicuantitativa mediante mediciones de absorbancia de la elución del colorante (Figura 6.20 F). Se pudo observar una tendencia al alza, aunque no tan clara en la muestra 3, de la absorbancia a lo largo del tiempo, correspondiente a la cada vez mayor cantidad de células con vesículas lipídicas que había en el cultivo. Por otro lado, también como medida indirecta de la aparición de células adipogénicas en cultivo en condiciones adherentes, se cuantificó la presencia de triglicéridos en estos cultivos a día 7 y 28, advirtiendo de

forma clara cómo la concentración de los triglicéridos presentes en cultivo aumentaba a los 28 días, aunque no al mismo nivel en todas las muestras (**Figura 6.20 G**).

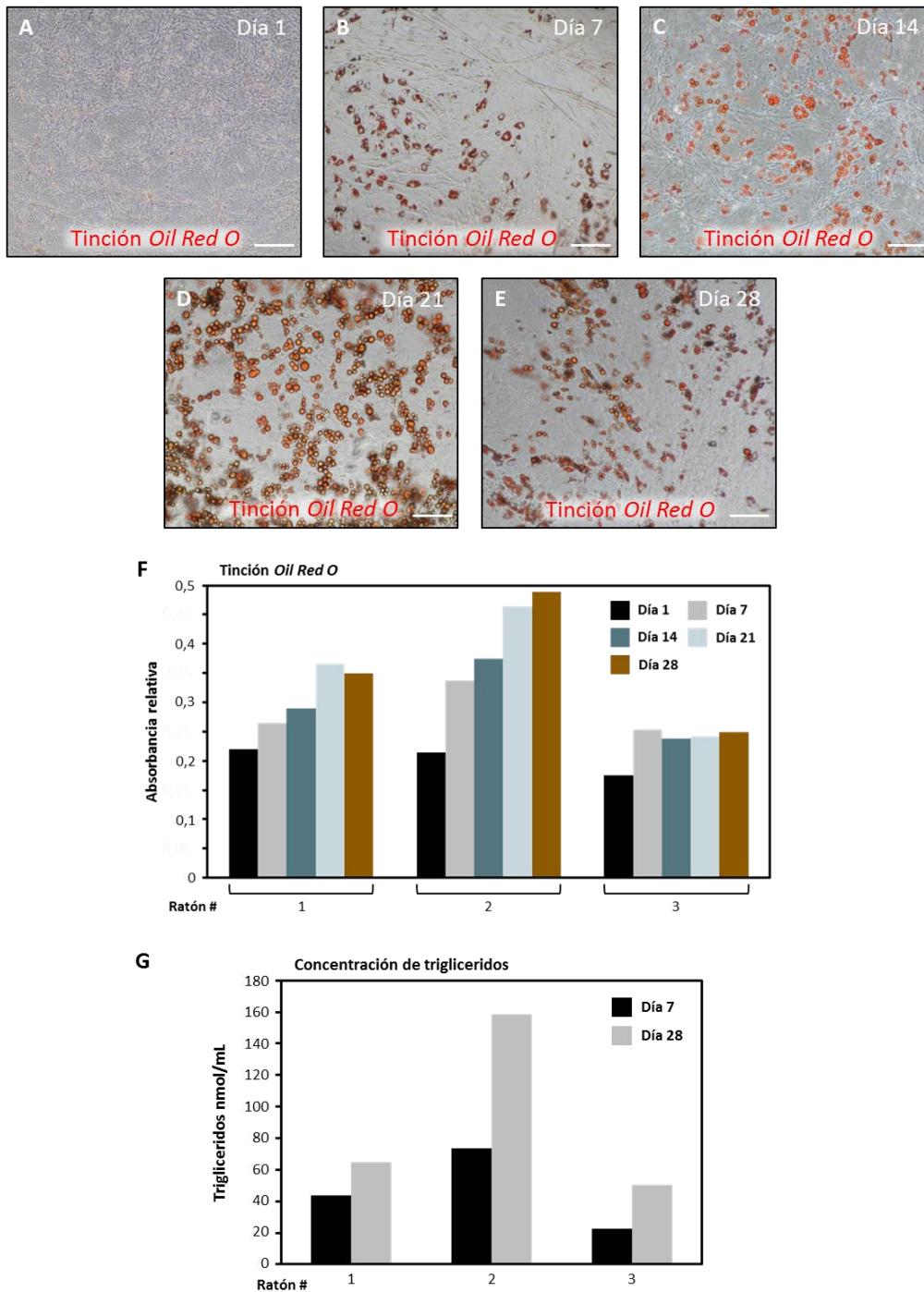


Figura 6.20. Cuantificación de las células adipogénicas presentes en los cultivos en adhesión a lo largo del tiempo. **(A-E)** Fotografías de microscopio óptico de cultivos en adhesión con una tinción cuantitativa de *Oil Red O* donde resaltan en rojo las agrupaciones de vesículas lipídicas que se encuentran dentro de las células a día 1 **(A)**, a los 7 días **(B)**, a los 14 días **(C)**, a los 21 **(D)** y al cabo de 28 días **(E)**. **(F)** Gráfica donde se muestra la absorbancia relativa tomada de la elución del colorante presente en los cultivos teñidos referentes a los paneles A-E. **(G)** Representación gráfica de la concentración de los triglicéridos presentes en los cultivos en adhesión a los días 7 y 28. En los paneles A, B, C, D y E las barras de tamaño representan 100 μm .

Posteriormente se estudió la relación entre la población miogénica y la adipogénica presentes en los cultivos en adhesión (**Figura 6.21**). Inicialmente se examinó la presencia de estas dos poblaciones en conjunto en los cultivos en adhesión a los 7 días a través de la detección de proteínas específicas de cada población por inmunofluorescencia (**Figura 6.21 A-B**). Se localizaron grupos celulares correspondientes a cada tipo celular organizados con cierta separación o delimitación entre ellos mediante el análisis de las proteínas nucleares MIOGENINA y PPAR γ , proteína que regula la diferenciación adipogénica (**Figura 6.21 A**), y las proteínas estructurales MYHC y PERILIPINA, proteína asociada a la superficie de las gotas lipídicas (**Figura 6.21 B**). Según estas observaciones, estas dos poblaciones crecían juntas, pero no solapadas, los adipocitos se localizaban en los espacios huecos en la vecindad de los miotubos. Seguidamente, a lo largo de varios días de cultivo se estudió la expresión de genes determinantes para la miogénesis como Miogenina y *MyH2*, y otros para la adipogénesis como *Ppar γ* , *AdipoQ* y *Fabp4*; la primera de ellas descrita anteriormente como regulador de la diferenciación adipocítica y las otras dos conocidas como proteínas expresadas típicamente por adipocitos (**Figura 6.21 C**). Todos los datos de cada muestra se normalizaron en base a la expresión de su respectivo día 1 para así poder evaluar las variaciones relativas a las interacciones entre estas dos poblaciones. Al contrario que en los análisis anteriores, los resultados obtenidos fueron muy dispares, tanto entre las muestras como entre los genes que se expresaban en los distintos días de análisis, y no se intuía una bajada en la expresión de los genes miogénicos a la vez que aumentaba la expresión de los genes adipogénicos según avanzaban los días. Pese a ello, se advirtió que la expresión de estos dos grupos de genes era inversa; esto es, en el caso de haber un aumento en la expresión de los genes de un tipo celular, la expresión de los genes del otro tipo celular disminuía, no se observaron expresiones semejantes entre genes de los dos distintos linajes celulares. De modo que la regulación génica de estas dos poblaciones era un evento no tanto relacionado con el tiempo de cultivo, sino con la competencia del espacio y en consecuencia, con facilitar el desarrollo de una población celular en contra de la otra.

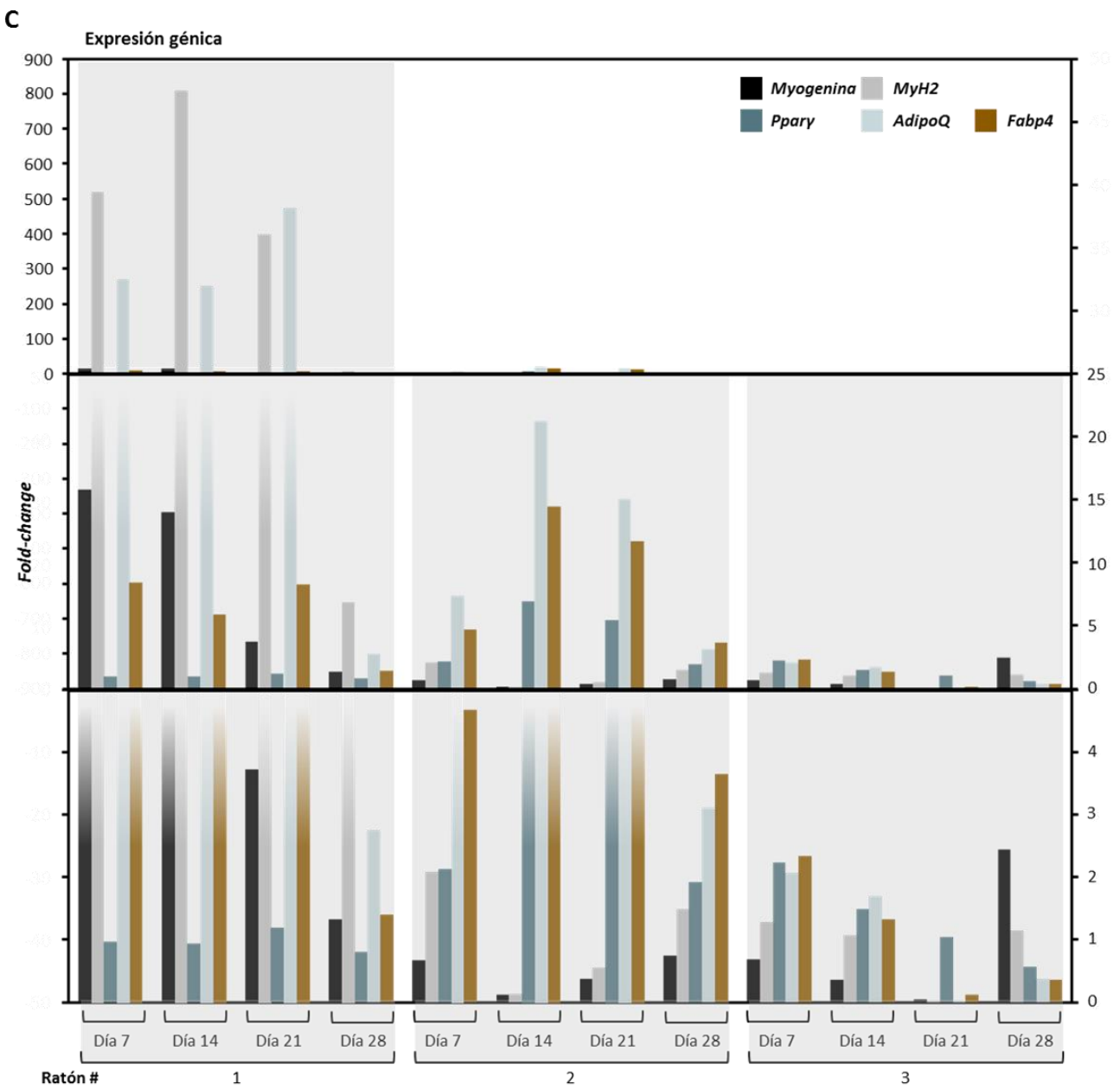
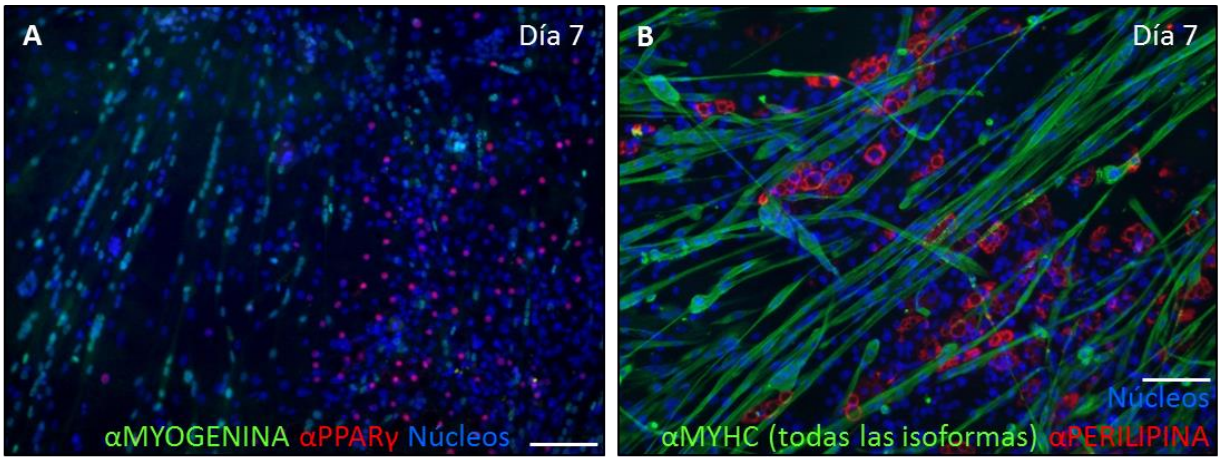


Figura 6.21. Estudio de la relación entre la población celular miogénica y la adipogénica durante el cultivo en adhesión a largo plazo. **(A-B)** Detección por inmunofluorescencia de proteínas miogénicas y adipogénicas en los cultivos en adhesión a los 7 días habiendo células que expresan MIOGENINA (verde) y PPAR γ (rojo) **(A)** y células que expresan MYHC (todas las isoformas) (verde) y PERILIPINA (rojo) **(B)**. **(C)** Análisis de la expresión génica a los días 7, 14, 21 y 28 de cultivo en adhesión. Se analizó la expresión de los genes miogénicos *Miogenina* y *MyH2* y de los genes adipogénicos *Ppar γ* , *AdipoQ* y *Fabp4*. En todos los casos se muestran los valores obtenidos de muestras provenientes de tres ratones distintos y los datos se muestran en *fold-change* normalizados respecto a su correspondiente día 1 en una gráfica triple, donde se representan en la parte superior todos los datos en referencia al eje izquierdo, en la parte intermedia los mismos datos en referencia al eje derecho que dispone de una escala menor y en la parte inferior los mismos datos también en referencia al eje derecho, pero con una escala aún más pequeña para poder ver los valores de los datos de forma adecuada. En los paneles A y B los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μm .

6.2 Aplicación del protocolo de cultivo celular a muestras de músculo

Para determinar la aplicabilidad del protocolo a otros tejidos, en un primer ensayo se aplicó a una biopsia de TA de músculo esquelético (**Figura 6.22**). Se generaron esferas celulares en la primera fase de cultivo en suspensión (**Figura 6.22 A**) y como era de esperar, en el cultivo en adhesión se obtuvieron cultivos de miotubos multinucleados y alargados (**Figura 6.22 B**), que expresaban los genes *Pax7*, *MyoD1*, *Miogenina*, *MyH3* y *MyH2* (**Figura 6.22 C**). Salvo la expresión del gen *Pax7*, que tenía una expresión muy baja en un cultivo tan diferenciado, los demás genes se expresaban de manera considerable, pero de forma algo variable entre las muestras.

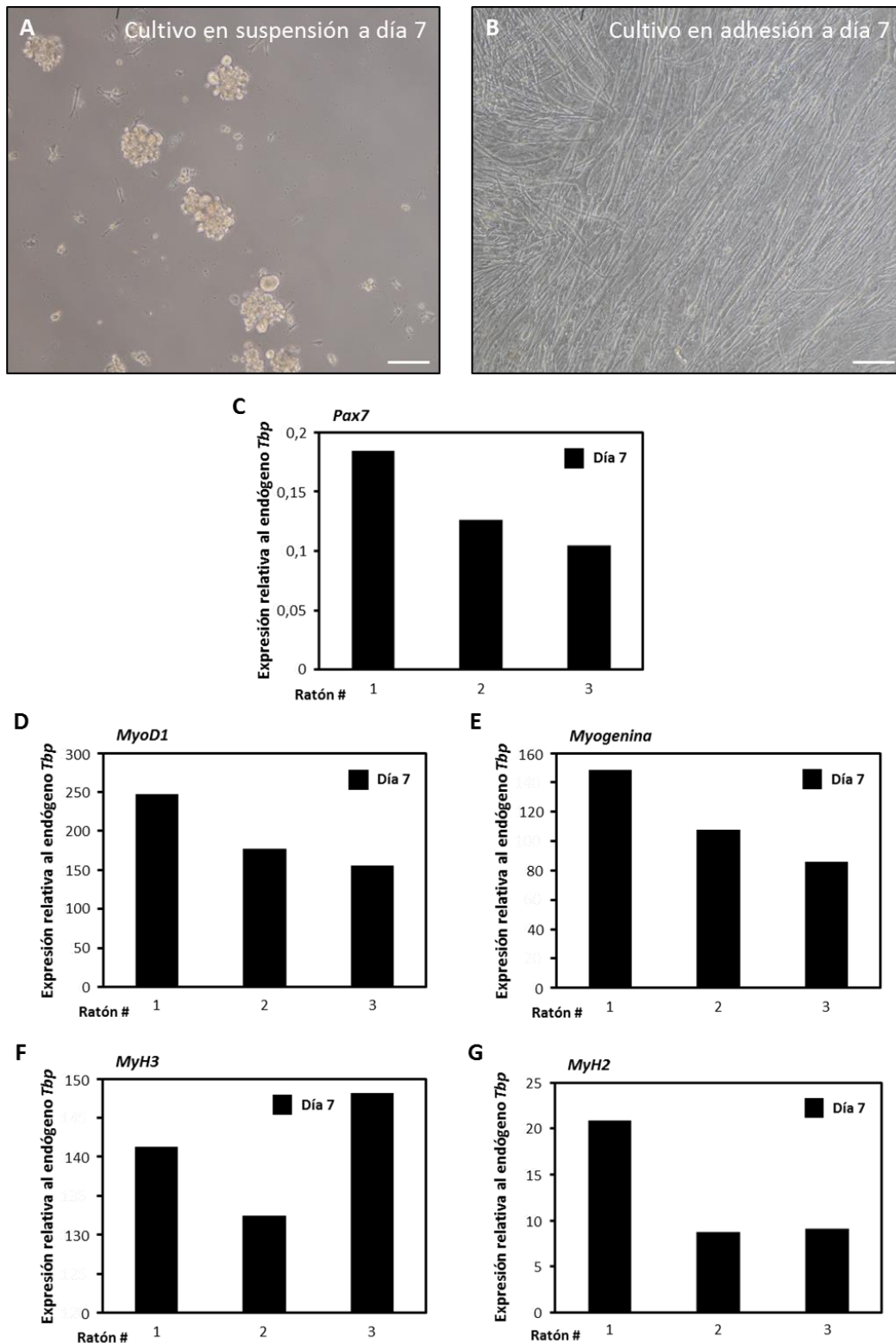


Figura 6.22. Análisis del cultivo a partir de músculo esquelético TA. **(A-B)** Fotografías de microscopio óptico que muestran el aspecto morfológico del cultivo celular a día 7 del cultivo en suspensión **(A)** y a día 7 del cultivo en adhesión **(B)**. **(C-G)** Cuantificación de la expresión de genes miogénicos a día 7 del cultivo en adhesión. Se analizó la expresión de los genes *Pax7* **(C)**, *MyoD1* **(D)**, *Myogenina* **(E)**, *MyH3* **(F)** y *MyH2* **(G)** y en todos los casos se muestran los valores obtenidos de muestras provenientes de tres ratones distintos y se representan relativizados a la expresión del gen endógeno *Tbp*. En los paneles A y B las barras de tamaño representan 100 μ m.

En un segundo ensayo se analizó si por medio de este protocolo se conseguía una diferenciación o bien una transdiferenciación entre tipos de células musculares. A partir de una muestra de músculo liso de vejiga, se cultivaron células aisladas (N = 3 ratones) (**Figura 6.23**). En este caso también se formaron esferas celulares durante el cultivo en suspensión (**Figura 6.23 A**). Sin embargo, en condiciones adherentes la morfología de las células no correspondía con la de los miotubos (**Figura 6.23 B**), sólo se apreció uno pequeño mediante la detección de la proteína MYHC por inmunofluorescencia (**Figura 6.23 C-D**). Es decir, no se obtuvo una diferenciación mayoritaria de miotubos estriados sino que estas esferas dieron lugar a células positivas para la proteína α -SMA, la actina del músculo liso (**Figura 6.23 E-F**).

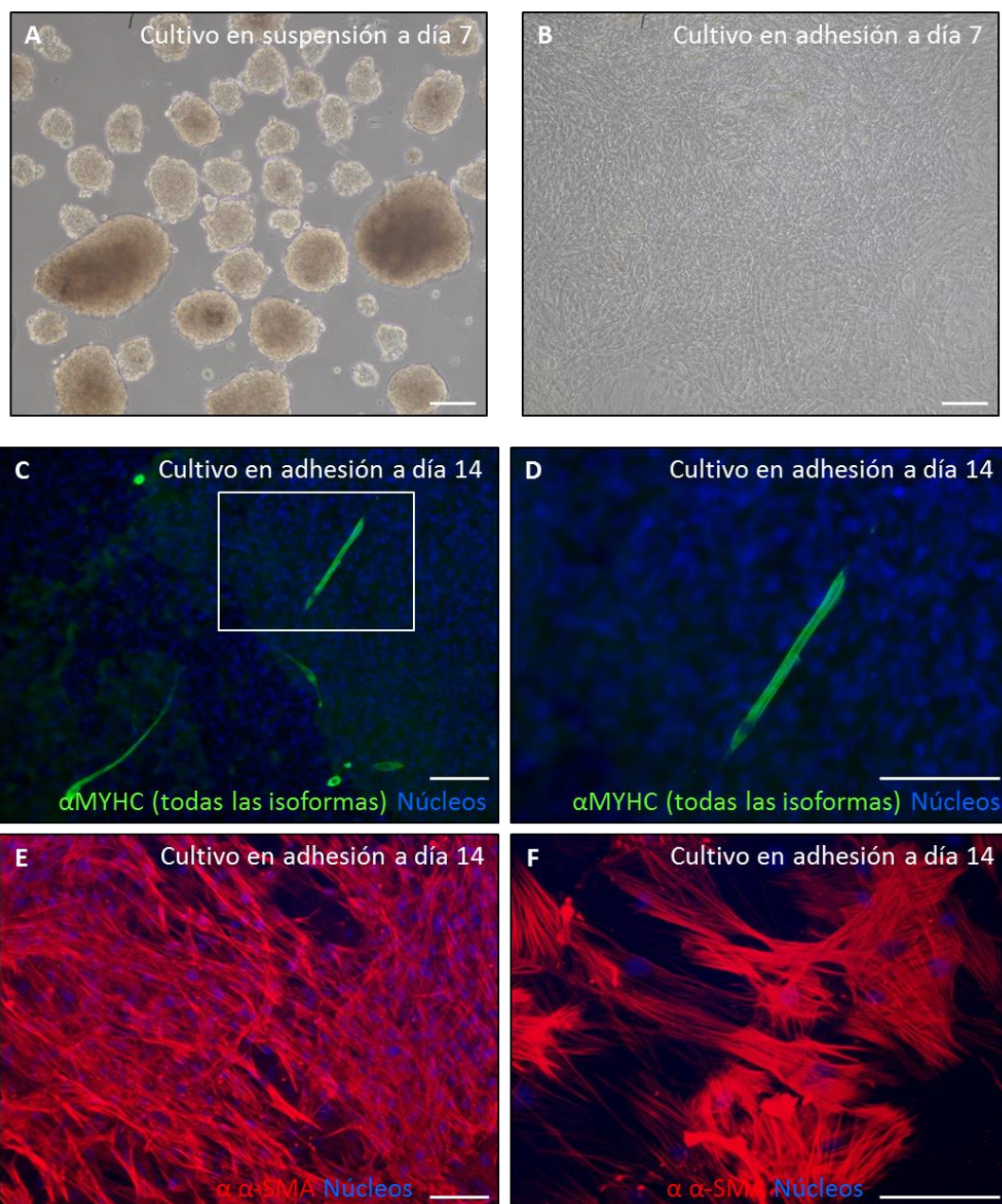


Figura 6.23. Análisis del cultivo a partir de vejiga. **(A-B)** Fotografías de microscopio óptico que muestran el aspecto morfológico del cultivo celular a día 7 del cultivo en suspensión **(A)** y a día 7 del cultivo en adhesión **(B)**. **(C-F)** Caracterización del cultivo por inmunofluorescencia con la detección de la proteína MYHC (todas las isoformas) (verde) **(C-D)** y de la proteína α -SMA (rojo) **(E-F)**. En los paneles C, D, E y F los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Las barras de tamaño representan 100 μ m en todos los paneles.

Estos datos indicaban que era necesaria la presencia de células músculo-esqueléticas *per se* o bien de células con capacidad para diferenciarse en músculo esquelético en la muestra de partida para luego poder obtener una diferenciación músculo-esquelética *in vitro*. Por esto se abordó la identificación de los tipos celulares con estas características que se encontraban en la piel dorsal de los ratones y que generaban el cultivo de miotubos estriados pulsátiles.

6.3 Caracterización del músculo esquelético de la piel dorsal de ratón

Como primera aproximación se procedió a analizar de manera exhaustiva los estadios iniciales del cultivo celular y el tejido de partida en busca de indicios que confirmaran la presencia de músculo esquelético.

Tras el aislamiento celular, a días iniciales en los cultivos en suspensión se observaron estructuras similares a los paquetes de fibras positivas para el marcador de músculo esquelético MYHC que presentaban claras estriaciones (**Figura 6.24**), probablemente remanentes de tejido muscular presente en la biopsia de partida.

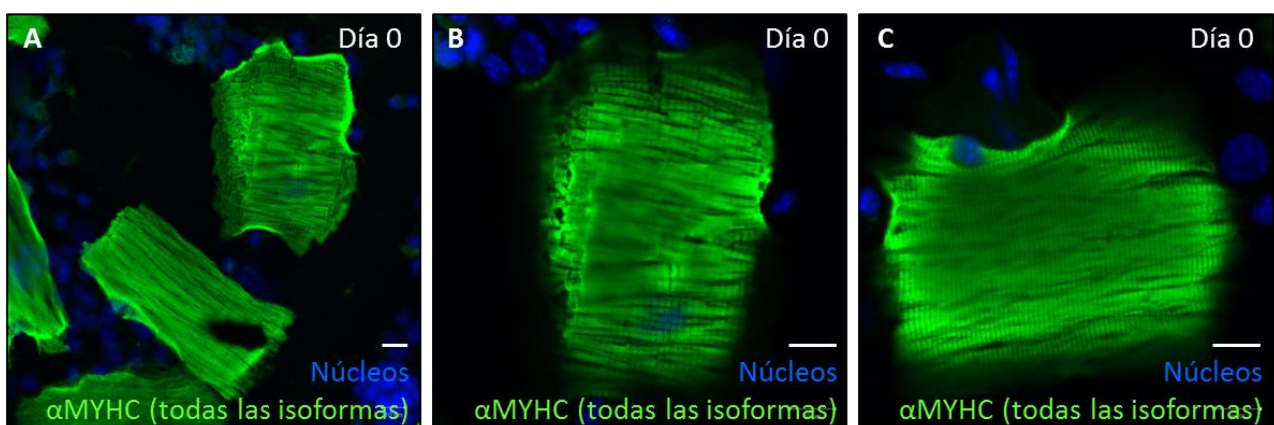


Figura 6.24. Análisis de los restos tisulares de cultivos en suspensión a día 0. **(A-C)** Fotografías obtenidas a través del microscopio confocal de muestras analizadas por inmunofluorescencia para la detección de la proteína MYHC (todas las isoformas) (verde) donde se muestran trozos de tejido con señal positiva. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 10 μm en todos los paneles.

La piel presenta un músculo esquelético subcutáneo, el PC, localizado en la parte más interna de la piel por debajo del tejido adiposo y encima de la fascia (**Figura 6.25 A**). Se observó que expresaba marcadores típicos de músculo esquelético como *Mrf4*, localizado exclusivamente en las fibras que componían este tejido (**Figura 6.25 B**), y como MYHC, proteína sarcomérica por la que se destacaban las estriaciones propias de este músculo (**Figura 6.25 C**).

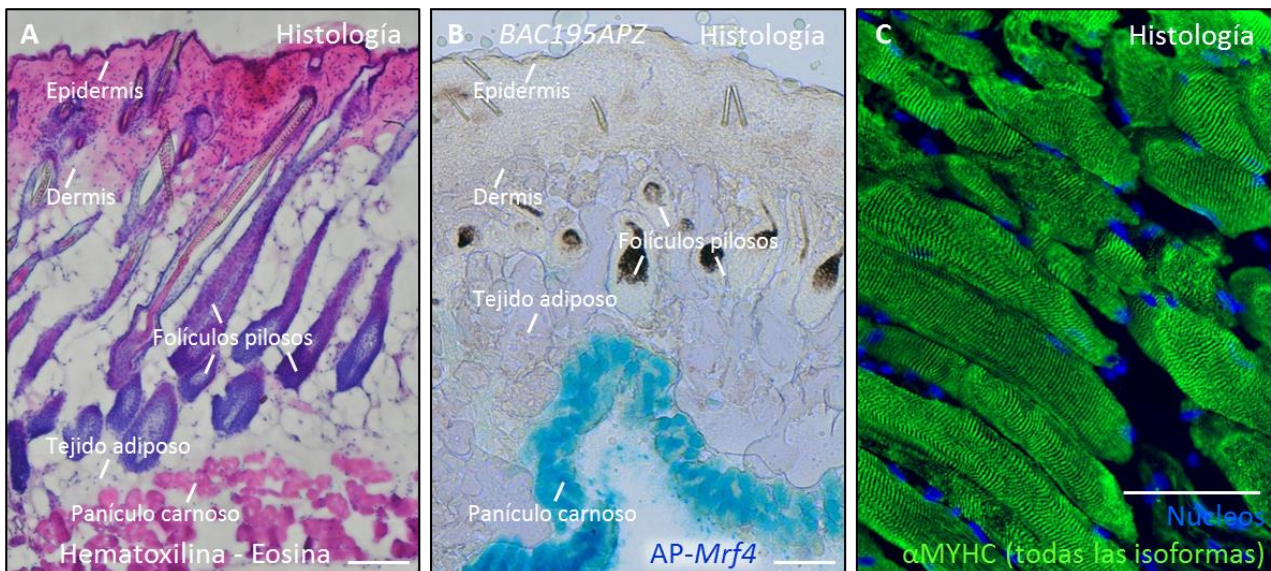


Figura 6.25. Análisis histológico de biopsias de piel dorsal de ratón. **(A)** Fotografía de un corte transversal de la piel donde se resaltan a través de una tinción de Hematoxilina-Eosina las distintas estructuras presentes que son indicadas en el propio panel. **(B)** Tinción de color azul para la detección de la fosfatasa alcalina relativa a la expresión del gen *Mrf4* en un corte transversal de una muestra procedente del ratón transgénico *B195APZ* donde también se indican las estructuras presentes en el propio panel. **(C)** Corte en una orientación algo más longitudinal analizada por inmunofluorescencia para la detección de la proteína MYHC (todas las isoformas) (verde). En el panel C los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Las barras de tamaño representan 100 μm en todos los paneles.

A continuación se examinó si esta capa de músculo albergaba células satélite (**Figura 6.26**). Estas células mononucleadas se identifican en base a su localización específica entre el plasmalema y la lámina basal de las miofibras (Mauro, 1961), por lo que se comenzó con un análisis estructural de las muestras de piel por MET (**Figura 6.26 A-C**). Se localizaron células satélite (**Figura 6.26 A, asterisco blanco**) con núcleo electrodenso, con la cromatina dispuesta en grumos y escaso

citoplasma con pocos orgánulos celulares dentro de su nicho en la periferia de una fibra del PC (**Figura 6.26 A, flechas blancas**) debajo de la lámina basal que rodeaba a la fibra (**Figura 6.26 A, recuadro y B**). Además, a mayores aumentos (**Figura 6.26 B, recuadro y C**) se observó que se daba un contacto directo entre la membrana de la célula satélite (**Figura 6.26 C, flecha blanca**) y la membrana de la fibra muscular (**Figura 6.26 C, flecha negra**). Asimismo, estas células en su estado quiescente se caracterizan por un patrón de expresión de marcadores específicos. Primero se analizó la expresión del gen *Pax3*, factor de transcripción expresado durante el desarrollo embrionario de los músculos esqueléticos, pero que disminuye drásticamente en las fases posteriores no conservándose en todas las células satélite como es el caso de las células satélite del PC, negativas para su expresión (**Figura 6.26 D**). Después se verificó la expresión del gen *Myf5*, que es el primer factor regulador miogénico, aunque no es expresado por todas las células satélite en su estadio basal, detectándose unas cuantas células yuxtapuestas a las fibras longitudinales del PC (**Figura 6.26 E**). Por último, se determinó la expresión del marcador de las células satélite por excelencia, la proteína PAX7 (**Figura 6.26 F, flechas blancas**), junto con la proteína extracelular LAMININA (**Figura 6.26 G, recuadro y G', flechas blancas**), de manera que se posibilitó la localización única de estas células rodeadas de la lámina basal rica en este componente.

De esta manera quedó claramente determinada esta fina capa de músculo estriado dentro de la unidad funcional que constituye la piel del ratón y se identificaron células satélite formando parte de este tejido como las propias del músculo esquelético.

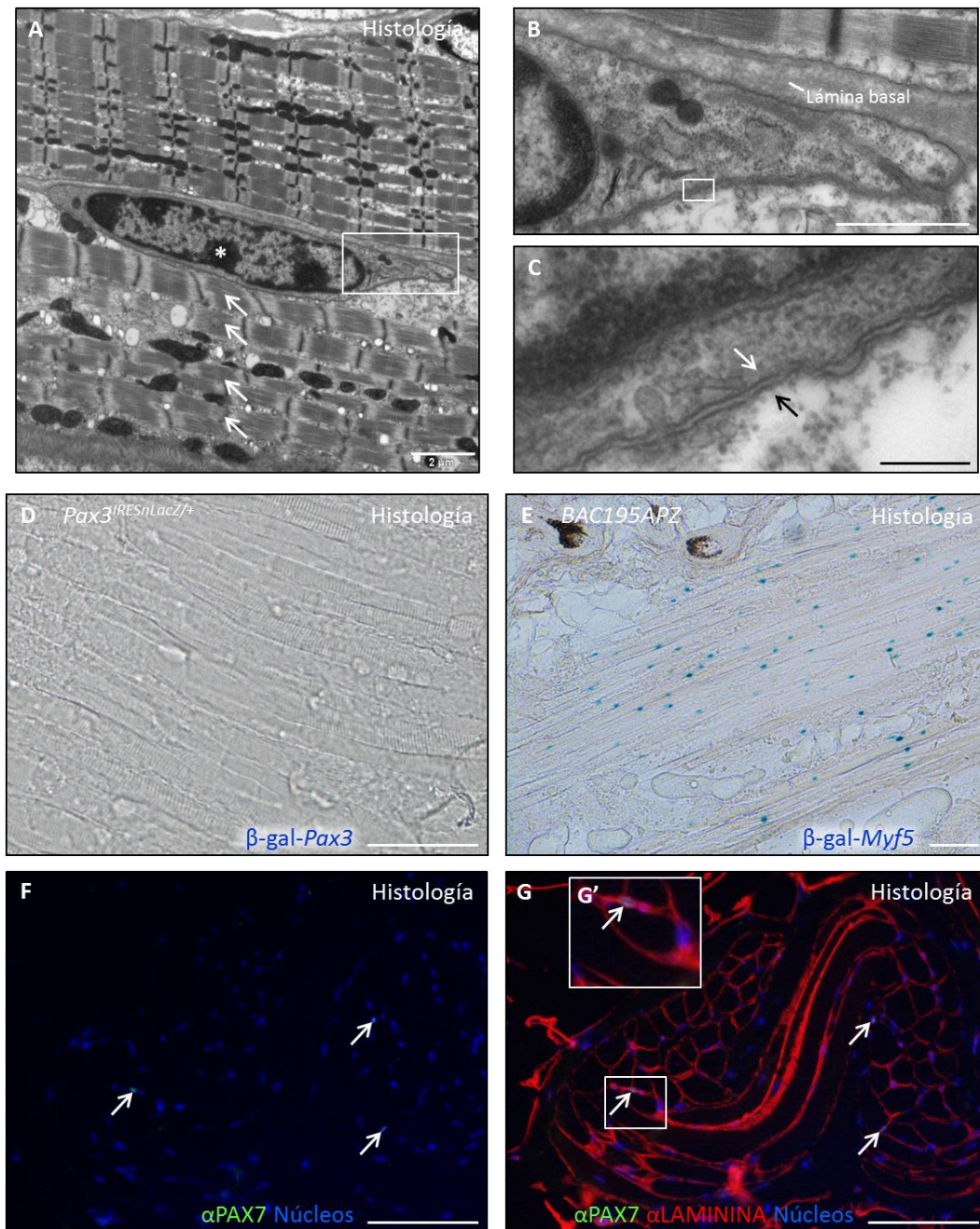


Figura 6.26. Caracterización de las células madre del PC por análisis histológico. **(A-C)** Secciones ultrafinas analizadas por MET donde se muestran, una célula satélite señalada por un asterisco blanco y varias miofibras indicadas por flechas blancas que componen una fibra **(A)**, a mayores aumentos la lámina basal que rodea conjuntamente a la fibra y a la célula satélite **(B)**, y en mayor detalle el contacto entre las membranas celulares de la célula satélite y de la fibra señaladas por una flecha blanca y una negra respectivamente **(C)**. **(D-E)** Tinción de color azul para la detección de la β -gal relativa a la expresión del gen *Pax3* **(D)** y del gen *Myf5* **(E)** en fibras del PC con orientación longitudinal de muestras procedentes de los ratones transgénicos *Pax3*^{JRESnLacZ/+} y *B195APZ* respectivamente. **(F-G)** Detección de las proteínas PAX7 (verde, flechas blancas) y LAMININA (rojo) por inmunofluorescencia, mostrando los canales verde y azul **(F)** y los canales verde, rojo y azul **(G, detalle en G')** de la misma fotografía. En los paneles F y G los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Las barras de tamaño representan 200 nm en el panel C, 1 μ m en el panel B, 2 μ m en el panel A y 100 μ m en los paneles D, E, F y G.

6.3.1 Origen embrionario del PC y de sus células satélite

Pese a que se confirmó la presencia de músculo esquelético en la muestra de partida, quedó por determinar qué población celular se diferenciaba y formaba los miotubos estriados, si provenían de este propio tejido muscular o si derivaban de otra población celular miogénica presente en la piel.

Para ello se diseñaron experimentos de trazados de linaje mediante ratones transgénicos. A la hora de escoger los genes específicos a través de la expresión de los cuales se trazaría la población de interés se tuvo en cuenta el origen embrionario y formación del PC y de los músculos esqueléticos del tronco y de las extremidades (Amini-Nik *et al.*, 2011) (Figura 6.27).

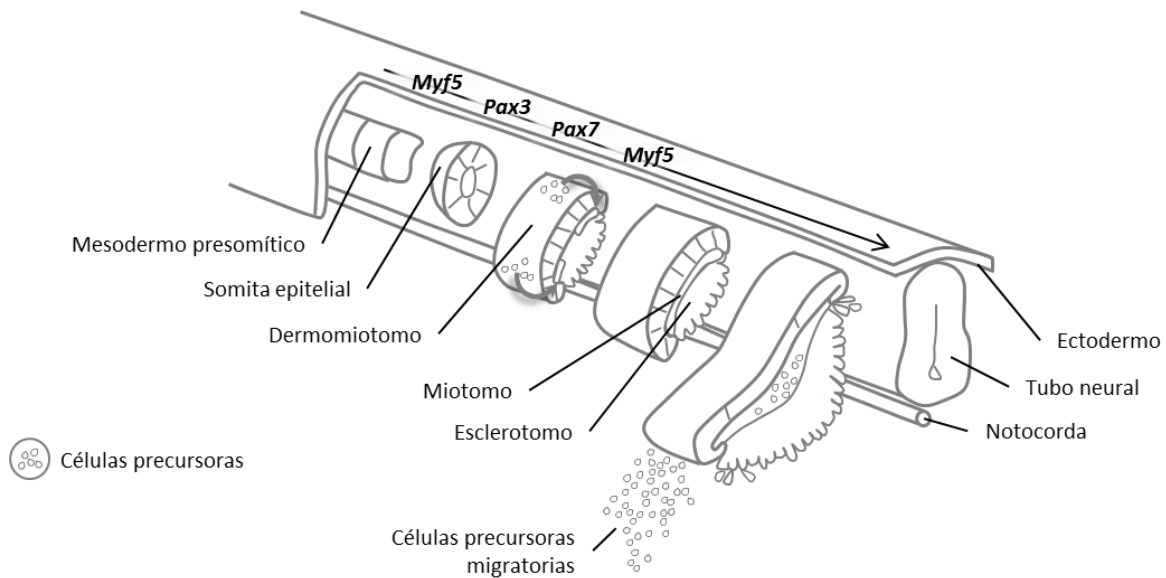


Figura 6.27. Representación esquemática secuencial del desarrollo de las estructuras embrionarias por las que derivan y se forman los músculos esqueléticos en el embrión del ratón, desde el mesodermo presomítico hasta el miotomo, indicando a su vez la sucesión de factores de transcripción determinantes que se expresan en cada fase para la formación de esas estructuras y para la generación de precursores miogénicos.

Por tanto, se planteó utilizar varias líneas de ratones transgénicos para trazar aquella población celular que expresara los genes determinantes para la formación del tejido musculoesquelético, los genes *Pax3*, *Pax7*, y *Myf5*. Para el trazado del gen *Pax3* se utilizó la cepa transgénica *Pax3^{Cre/+}; ROSAmTmG*; para el gen *Pax7* se empleó la cepa inducible *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG*, inducida en la fase postnatal del animal salvo que se indique lo contrario; y en el caso del trazado del gen *Myf5* se utilizaron dos trazados no inducibles diferentes porque se consideró que la cepa transgénica disponible, el *Myf5^{CreSOR}; R26YFP*, presentaba una expresión demasiado amplia de dicho gen, resultando en un trazado de una población celular heterogénea compuesta

por células de distinta naturaleza. Para aclarar el trazado de este gen *Myf5* se generó una nueva cepa transgénica, el *B195AP^{Cre}*, que a diferencia de la anterior restringía la expresión del gen *Myf5*, delimitando así a una población celular menor y más homogénea (**Figura 6.28**) (Swaminathan *et al.*, 2001; Carvajal, Keith and Rigby, 2008).

B195AP^{Cre}; R26R

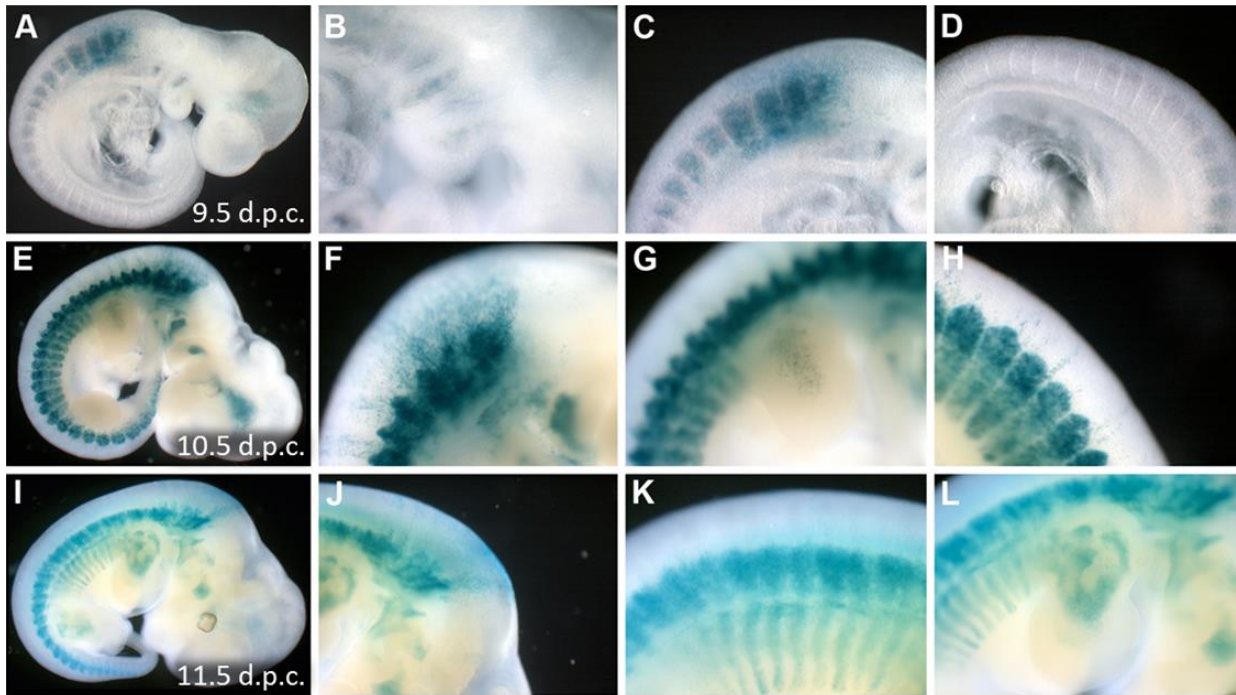


Figura 6.28. Análisis cronológico de embriones de ratón portadores del constructo reportero de *Myf5 B195AP^{Cre}* cruzado con la cepa *R26R*. **(A-L)** Tinción de color azul para la detección de la β -gal relativa a la expresión del gen *Myf5*. Se muestran fotografías representativas de los embriones **(A, E, I)** y detalles de esos mismos embriones **(B-D, F-H, J-L)** a 9.5 d.p.c. **(A-D)**, a 10.5 d.p.c. **(E-H)** y a 11.5 d.p.c. **(I-L)**. A 9.5 d.p.c. la tinción se detecta en sitios conocidos donde se expresa *Myf5* **(A)**, incluyendo los arcos mandibulares y de hioides **(B)**, los somitas cervicales **(C)** y el resto de somitas con la excepción de los más recientemente formados 3 y 4 **(D)**. Este aparente retraso es posiblemente causado por el tiempo que se requiere para generar altos niveles de la proteína Cre a fin de recombinar el locus *R26R*. A 10.5 d.p.c. se pueden detectar células positivas para la tinción en todas las células progenitoras de músculos conocidas por su expresión del gen *Myf5*, comprendiendo todas las somitas, los arcos branquiales, los nervios hipoglosales y el cerebro **(E)**. De forma interesante, un gran número de células teñidas de azul parecen migrar dorsalmente hacia localizaciones no típicas de músculo esquelético **(F)**. También son claramente visibles en las extremidades anteriores **(G)**. Además, las células migratorias no se restringen a posiciones cervicales si no que aparecen a lo largo del embrión, pero siempre en posición dorsal a los somitas; y mientras que la migración a las posiciones cervicales no sigue un patrón aparente, la migración a las posiciones más caudales sucede en líneas rectas **(H)**. Para los 11 d.p.c. la mayoría de las células positivas para la tinción se encuentran delimitadas definiendo las localizaciones de los músculos esqueléticos como los músculos torácicos, los músculos de las extremidades anteriores y posteriores y los músculos derivados del arco de hioides y de los arcos mandibulares **(I)**. Las células positivas continúan migrando en orientación dorsal a los somitas **(J, K)**. Detalle de las células teñidas de azul en las extremidades anteriores **(L)**.

De esta manera, mediante estos trazados de linaje se analizó el origen embrionario del PC y de sus células satélite, comprobando por análisis histológico que a través del trazado de las células derivadas de los precursores que habían expresado dichos genes se llegaba al tejido diana y a sus células madre (**Figura 6.29**). Estos trazados se pudieron seguir y detectar gracias a la expresión del gen reportero de la proteína fluorescente EYFP o EGFP, según el constructo utilizado en cada caso. Mediante su análisis *in situ* por inmunofluorescencia o por detección directa se observó que cuando las células fueron marcadas por los linajes de *Myf5^{CreSOR}; R26YFP*, *Pax3^{Cre/+}; ROSAmTmG* y *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG*, las fibras del PC eran fluorescentes (**Figura 6.29 A-C respectivamente**). En cuanto a las células satélite del PC, estas derivaban de un linaje positivo para *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* confirmado por el trazado más restrictivo de *B195AP^{Cre}; R26YFP*, encontrando en cada caso células positivas para la proteína fluorescente reportero localizadas en su nicho sobre el plasmalema y bajo la lámina basal de las fibras destacada por la expresión de LAMININA (**Figura 6.29 D-E respectivamente, flechas blancas**). Por tanto, y de manera similar a otros músculos del tronco y de las extremidades, el PC y sus células satélite se originan a partir de poblaciones celulares positivas para los genes *Myf5*, *Pax3* y *Pax7*.

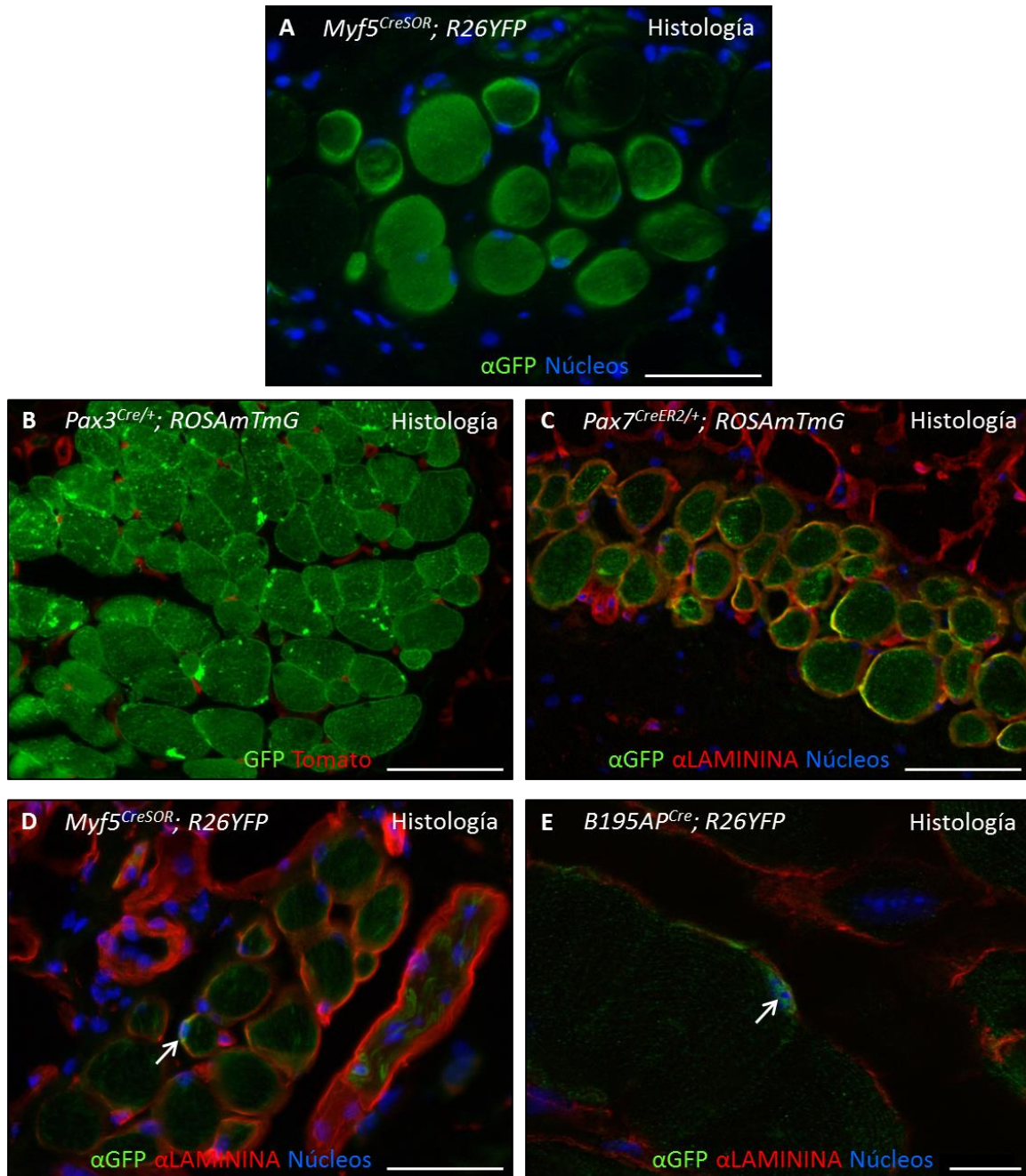


Figura 6.29. Análisis histológico de la piel dorsal de los ratones transgénicos escogidos para los trazados de linaje del PC y de sus células satélite. **(A-C)** Análisis de las proteínas fluorescentes EYFP y EGFP (verde) localizadas exclusivamente en las fibras del PC a través de su observación directa en el caso de las muestras procedentes del ratón *Pax3*^{Cre/+}; *ROSA**mTmG* **(B)**, o por su detección mediante inmunofluorescencia en las muestras provenientes de los ratones *Myf5*^{CreSOR}; *R26YFP* **(A)** y *Pax7*^{CreER2/+}; *ROSA**mTmG*, en este último caso también junto con la detección de la proteína LAMININA (rojo) **(C)**. **(D-E)** Células satélite señaladas con flechas blancas positivas para el trazado de linaje del gen *Myf5* tanto en muestras del ratón *Myf5*^{CreSOR}; *R26YFP* **(D)** como en los del *B195AP*^{Cre}; *R26YFP*, en este caso en una fotografía obtenida a través del microscopio confocal **(E)**, identificadas por inmunofluorescencia por la expresión de EYFP (verde) y por su localización definida por la detección de la proteína LAMININA (rojo). En los paneles A, C, D y E los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Las barras de tamaño representan 100 μm en todos los paneles excepto en el panel E, que corresponde a 10 μm .

6.4 Cultivo, caracterización y análisis del potencial miogénico de las células derivadas del PC

6.4.1 Enriquecimiento en cultivo en suspensión de las células derivadas del PC

Una vez determinado que los trazados de linaje escogidos a través de la expresión de los genes *Myf5*, *Pax3* y *Pax7* definían el tejido y las células de interés, se analizaron los cultivos en suspensión con la idea de localizar en las esferas células derivadas de estos linajes.

Tal y como se ha descrito anteriormente, se detectaron células miogénicas durante la primera fase de cultivo en condiciones de suspensión (**Figura 6.3, 6.4 y 6.5**), pero en este caso, además de determinar la presencia de células miogénicas, se analizó si estas se mantenían durante el cultivo hasta el último día e incluso si proliferaban. Antes de valerse de los trazados para responder a estas preguntas se volvieron a analizar los datos de expresión génica obtenidos por RT-qPCR relativos a la **Figura 6.4**, pero esta vez normalizando los datos de cada muestra en base a la expresión de su respectivo día 1 (**Figura 6.30**). La expresión de los genes *Miogenina* (**Figura 6.30 C**) y *MyH3* (**Figura 6.30 D**) en la muestra 1 aumentaban considerablemente tras 7 días en cultivo aunque no tanto en las otras dos muestras, no observándose un incremento en la expresión de los otros genes *Pax7*, *MyoD1* y *MyH2* (**Figura 6.30 A, B, E, respectivamente**).

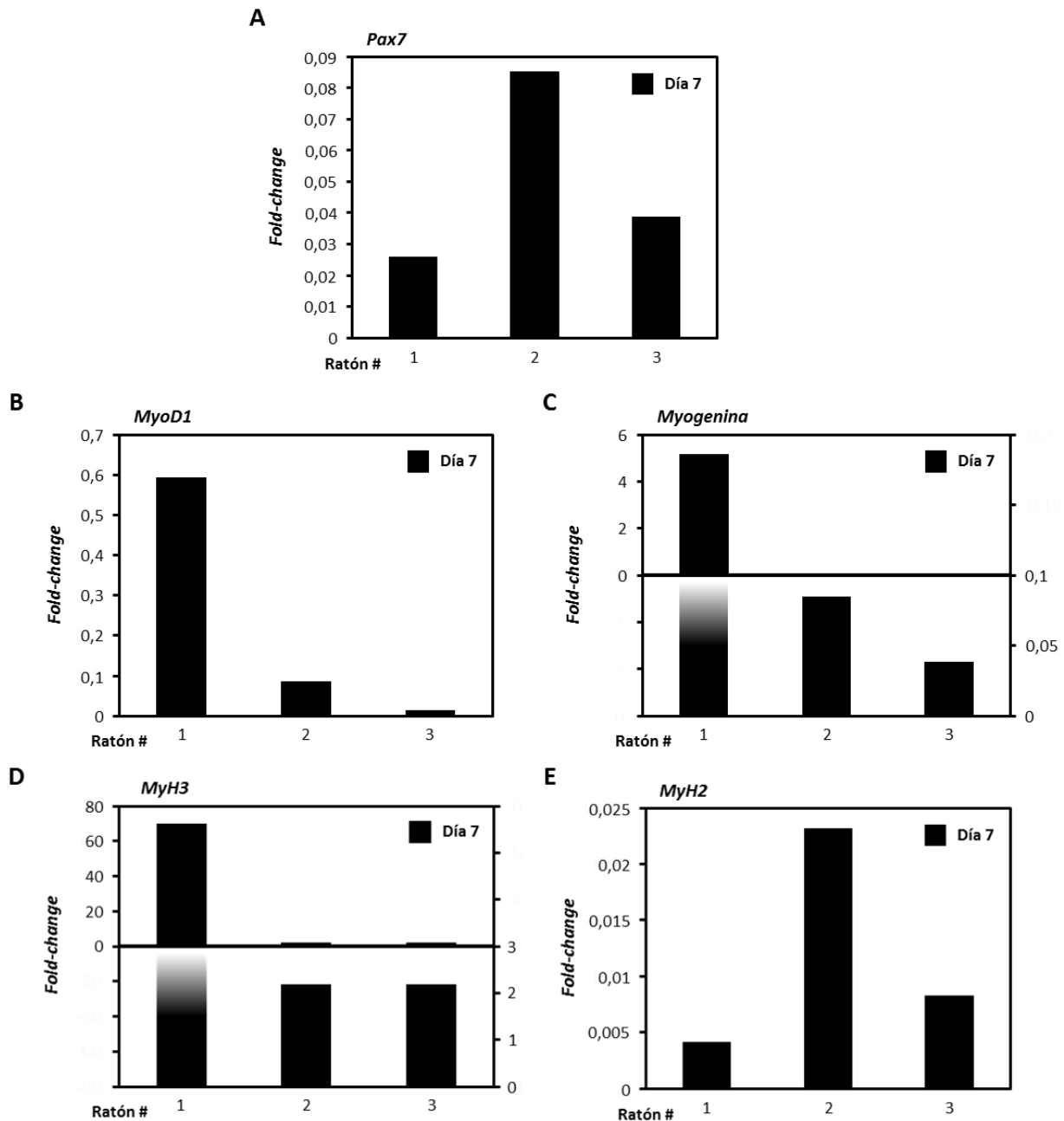


Figura 6.30. Expresión de determinados genes miogénicos a día 7 de cultivo en suspensión respecto a su expresión inicial. Se analizó la expresión de los genes *Pax7* (A), *MyoD1* (B), *Myogenina* (C), *MyH3* (D) y *MyH2* (E), mostrando los datos en *fold-change* normalizados respecto a su correspondiente día 1 de los valores obtenidos de muestras provenientes de tres ratones distintos. En los paneles C y D los datos se exponen en gráficas dobles donde se representan en la parte superior todos los datos en referencia al eje izquierdo y en la parte inferior los mismos datos pero en referencia al eje derecho que dispone de una escala menor para poder ver los valores de los datos de forma adecuada.

Seguidamente se verificó la presencia de células positivas para EYFP o EGFP a través de un análisis del cultivo en suspensión a los 7 días por citometría de flujo (**Figura 6.31 A-D**). Se detectó un porcentaje variable de células derivadas de los precursores que habían expresado los genes escogidos para los trazados; $72,2 \pm 9,9$ % en el caso de las muestras de *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* (**Figura 6.31 A**), $17,6 \pm 18,4$ % en las muestras de *B195AP^{Cre}; R26YFP* (**Figura 6.31 B**), $56,3 \pm 8,3$ % en el trazado de *Pax3^{Cre/+}; ROSAmTmG* (**Figura 6.31 C**) y en el del *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG* un $17,4 \pm 15,9$ % (**Figura 6.31 D**). Por lo tanto, estas células se mantenían en estas condiciones de cultivo y más aún, proliferaban a lo largo de los días del cultivo, tal y como se vio al analizar cultivos del trazado de *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG* a día 1, 3 y 7, donde se detectó un creciente número de células positivas para EGFP (**Figura 6.31 E**). Estos resultados indicaban que las células derivadas de los precursores miogénicos proliferaban en estas condiciones de cultivo y exhibían una ventaja relativa sobre otras células presentes en la esfera en cuanto a la supervivencia y/o a la tasa de proliferación.

A través de estos experimentos se confirmó que las células trazadas hasta el cultivo en suspensión provenían de células precursoras miogénicas, pero no necesariamente del PC o de la muestra de tejido disociada original, estas células podrían generarse durante el cultivo *in vitro* al formarse las esferas. Se realizó un estudio del transcriptoma de estas células al inicio y al final del cultivo en suspensión con el fin de determinar si se trataba de poblaciones celulares diferentes o relacionadas entre sí. Para ello se aisló la población positiva para el linaje de *Myf5* trazado por *B195AP^{Cre}* mediante una separación por citometría de flujo a día 0 y 7 del cultivo, y una vez obtenida la población de interés se analizó su patrón de expresión génica (**Figura 6.31 F-G**). Entre los 4.735 genes diferencialmente expresados entre las dos muestras, 52 sondas (15 genes) estaban asociadas por ontología génica (*Gene Ontology* (GO)) con la categoría de “Células satélite” y 154 sondas (63 genes) se clasificaron bajo la de “Diferenciación de células musculares estriadas” (**Figura 6.31 F**). A través del análisis de estas sondas o genes miogénicos se estableció que los marcadores asociados a las células satélite activadas y/o a mioblastos inmaduros como *Musk*, *MyoD1*, *Shh*, *Igfbp5* y *Bmp4* se expresaban preferentemente a día 0 y en cambio, aquellos asociados con la determinación y/o diferenciación de los mioblastos como *Cdh2*, *Rara/Rarb*, *MyH3*, *Kcnh1* y *Myf6* se encontraban sobreexpresados a día 7 (**Figura 6.31 G**). Así pues se observaron diferencias mínimas entre las poblaciones celulares analizadas, más relacionadas con la aparición de genes miogénicos propios de la maduración y definición de esta población celular que con que se trataran de dos

poblaciones diferentes y no vinculadas. De esta manera, se descartó el efecto *in vitro* como causa de la aparición de las células miogénicas en el cultivo en suspensión.

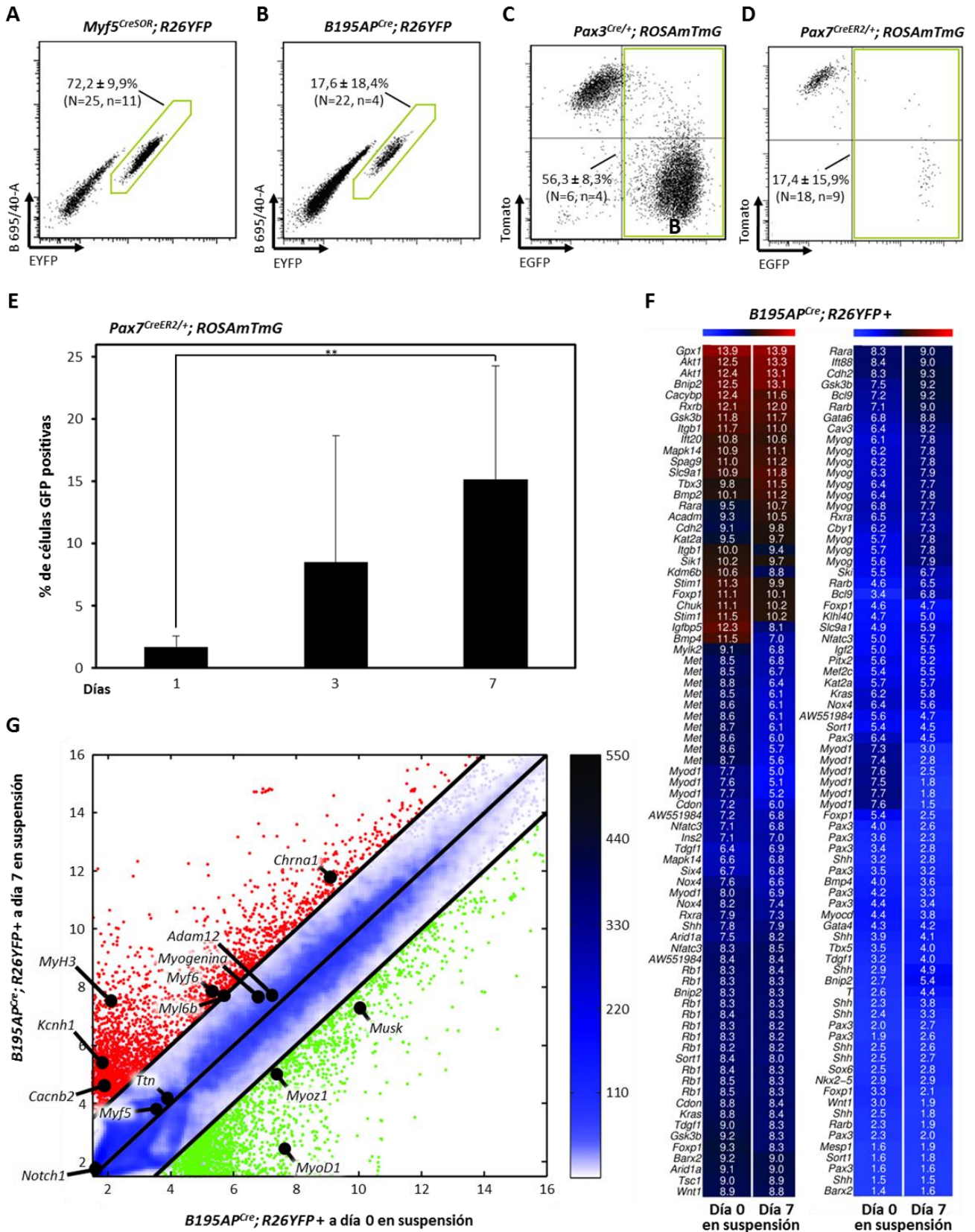


Figura 6.31. Análisis de los trazados de linaje a nivel de cultivo celular en suspensión. **(A-D)** Cuantificación mediante citometría de flujo del número de células positivas para EYFP y EGFP en muestras de cultivo en suspensión a los 7 días provenientes de los ratones *Myf5^{CreSOR}*; *R26YFP* **(A)**, *B195AP^{Cre}*; *R26YFP* **(B)**, *Pax3^{Cre/+}*; *ROSA^{mTmG}* **(C)** y *Pax7^{CreER2/+}*; *ROSA^{mTmG}* **(D)**. Se muestran las medias \pm desviación estándar de los datos obtenidos en experimentos replicados de manera independiente según se especifica en cada caso siendo N = ratones y n = experimentos. **(E)** Representación gráfica del recuento por citometría de flujo del número de células positivas para EGFP a los días 1, 3 y 7 de un mismo cultivo proveniente del linaje de *Pax7^{CreER2/+}*; *ROSA^{mTmG}*, donde se representan las medias y la desviación estándar de los valores obtenidos de N = 9 ratones y n = 5 experimentos. **(F-G)** Análisis comparativo de todo el ARN mensajero transcrito en la población celular EYFP positiva del trazado de *B195AP^{Cre}*; *R26YFP* separada por citometría de flujo a los días 0 y 7 de cultivo. **(F)** *Heat map*-s donde se muestran los niveles de expresión de 154 sondas (63 genes) diferencialmente expresadas a día 0 y a día 7 asociadas con la categoría “Diferenciación de células musculares estriadas” del GO. **(G)** Gráfica de dispersión pareada donde se compara la expresión génica de las dos muestras en una escala logarítmica. Los genes sobreexpresados en la muestra de la ordenada cuando es comparada con la muestra de la abscisa se señalan en puntos rojos, en puntos verdes los sub-expresados y con puntos negros se indica la posición de algunos marcadores miogénicos tales como *MyoD1*, *Myoz1*, *Musk*, *Adam12*, *Miogenina*, *Ttn*, *Myf5*, *Notch1*, *Chrna1*, *Myl6b*, *Myf6*, *MyH3*, *Cacnb2* y *Kcnh1*. La barra de color indica la densidad de la dispersión. Los asteriscos representan el valor de p según $p < 0,01$ **.

6.4.2 Formación de miotubos *in vitro* a partir de células derivadas del PC

En el cultivo en adhesión se confirmó la capacidad y la identidad miogénica de las células trazadas EYFP o EGFP positivas de los diferentes linajes en estudio a través de la inmunocolocalización de estas proteínas fluorescentes con la proteína miogénica estructural MYHC (**Figura 6.32 A-D**). A pesar de que los trazados de linaje no eran completamente puros en el sentido de que se detectaron diferentes tipos celulares positivos para algunas de las proteínas reportero fluorescentes, se observó en todos los casos una contribución de estas células marcadas a la formación de los miotubos, y de manera destacable no se observaron miotubos MYHC positivos que fueran negativos para las proteínas reportero fluorescentes EYFP o EGFP, indicando que todos los miotubos provenían de células derivadas del PC. Este fenómeno de la contribución miogénica por parte de las células EGFP+ detectadas en las esferas del linaje de *Pax7^{CreER2/+}*; *ROSA^{mTmG}* se analizó en detalle a través del estudio de un mismo cultivo en adhesión a distintos días, y se observó cómo a lo largo del cultivo el porcentaje de células EGFP+ mononucleadas disminuía de manera significativa con el aumento del porcentaje de las células EGFP+ multinucleadas (**Figura 6.32 D**).

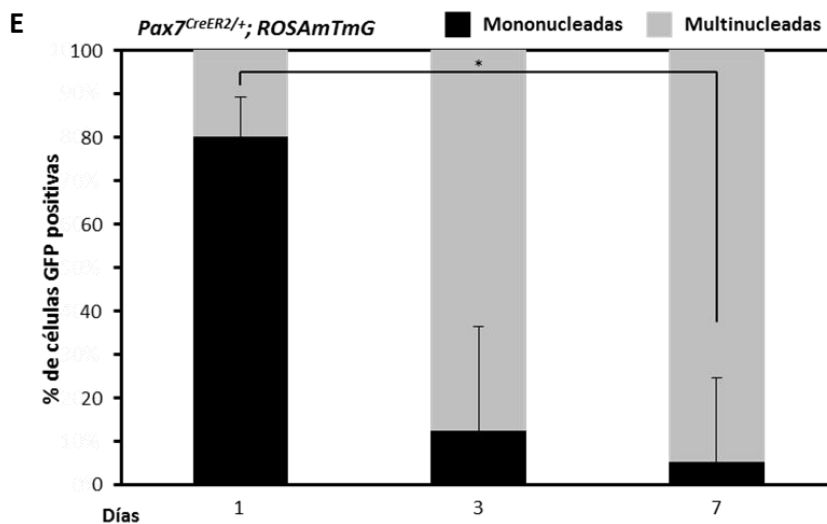
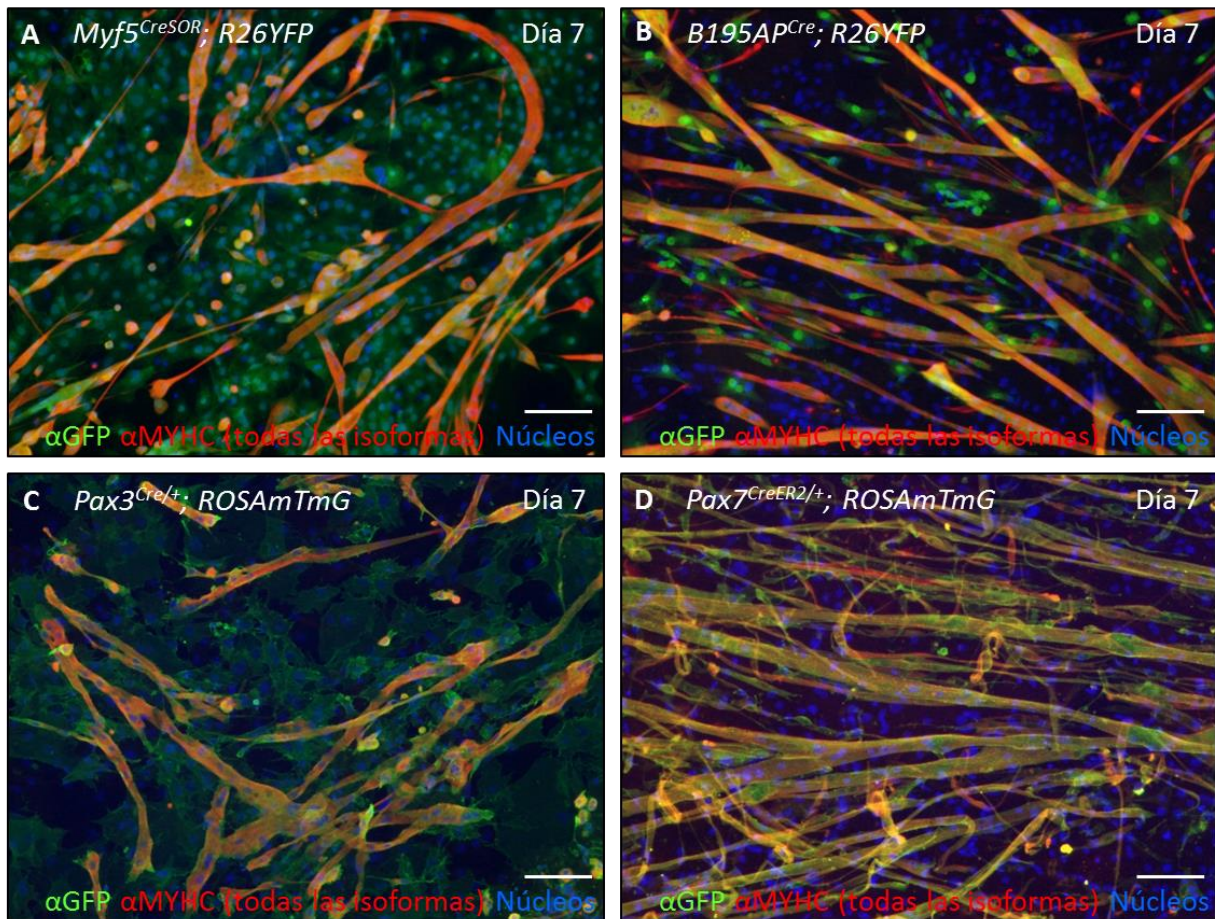


Figura 6.32. Análisis de los trazados de linaje a nivel de cultivo celular en adhesión. **(A-D)** Detección de las proteínas fluorescentes EYFP y EGFP (verde) y de la proteína miogénica estructural MYHC (todas las isoformas) (rojo) por inmunofluorescencia en cultivos de 7 días procedentes de los ratones transgénicos *Myf5^{CreS^{OR}}*; *R26YFP* **(A)**, *B195AP^{Cre}*; *R26YFP* **(B)**, *Pax3^{Cre/+}*; *ROSA^{mTmG}* **(C)** y *Pax7^{CreER2/+}*; *ROSA^{mTmG}* **(D)**. **(E)** Representación gráfica del porcentaje de células mono y multinucleadas positivas para EGFP por inmunofluorescencia a los días 1, 3 y 7 de un mismo cultivo, donde se representan las medianas y la desviación estándar de los valores obtenidos de 3 ratones *Pax7^{CreER2/+}*; *ROSA^{mTmG}* en un experimento. Los asteriscos representan el valor de p según $p < 0,05$ *. En los paneles A, B, C y D los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μ m.

Para confirmar la contribución de las células trazadas derivadas del PC a la formación de los miotubos se estudió el potencial miogénico de las poblaciones celulares positiva y negativa. Las muestras se separaron por citometría de flujo en base a la fluorescencia emitida en las fracciones positiva y negativa para EYFP o EGFP dependiendo del constructo utilizado, y se cultivaron en condiciones adherentes durante 7 días (**Figura 6.33**). La capacidad para formar miotubos estriados se limitaba principalmente a la fracción positiva de los trazados de linaje estudiados, fracción celular derivada de aquellas células que habían expresado los genes *Myf5* (**Figura 6.33 A, C**) o *Pax7* (**Figura 6.33 F**), donde se detectaron por inmunofluorescencia miotubos MYHC positivos (**Figura 6.33 A, C, F**). Sólo unos pocos miotubos MYHC positivos se llegaron a formar en las fracciones negativas, diferenciación no representativa del cultivo obtenido en esas fracciones (**Figura 6.33 D-E y G-H**).

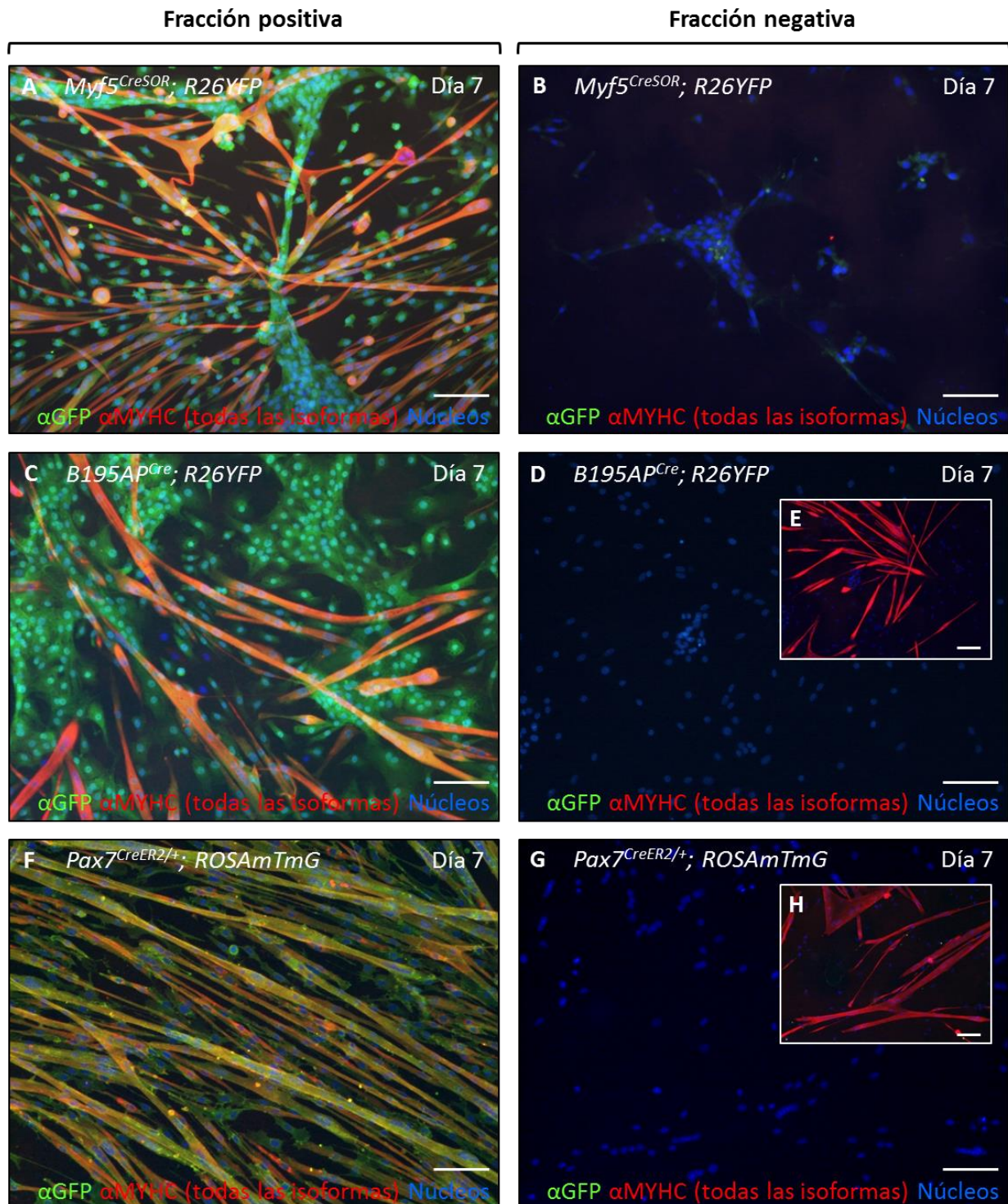


Figura 6.33. Contribución a la diferenciación miogénica de las fracciones celulares linaje+ y linaje- separadas por citometría de flujo. Cultivos en adhesión a los 7 días de las fracciones celulares positiva (A, C, E) y negativa (B, D, F) de los trazados de *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* (A-B), *B195AP^{Cre}; R26YFP* (C-D) y *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG* (E-F) analizadas por inmunofluorescencia detectando las proteínas fluorescentes EYFP y EGFP (verde) y la proteína miogénica estructural MYHC (todas las isoformas) (rojo). Los recuadros E y H simbolizan una diferenciación minoritaria del cultivo. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μm en todos los paneles.

La confirmación de que los miotubos derivaban de los linajes *Myf5*, *Pax3* y *Pax7* no eliminó la posibilidad de que hubiera otras poblaciones celulares que también dieran lugar a los miotubos. Fue preciso analizar otras opciones para establecer las células precursoras presentes en el cultivo celular y para poder entender las capacidades que poseían (**Figura 6.34**).

En este sentido, la participación de las células perivasculares de la dermis o del propio PC en la miogénesis observada *in vitro* se estudió a través del trazado de linaje del gen *Cspg4* que codifica la proteína sarcoglicano condroitín sulfato 4, también conocida como NG2, y es expresado por células progenitoras oligodendrocíticas y pericitos entre otros tipos celulares (Ampofo *et al.*, 2017). Mediante este constructo se trazaron las células intersticiales localizadas dentro del PC (**Figura 6.34 A, flechas blancas**) que tras el cultivo celular no daban lugar a los miotubos identificados por la expresión de la proteína MYHC (**Figura 6.34 B**), descartando una contribución por parte de las células *Cspg4+* y su progenie a la diferenciación miogénica *in vitro*.

Por otro lado, se estudió la contribución de las células precursoras dérmicas, aquellas identificadas por la baja expresión *in situ* del gen *Pax3* (Djian-Zaouche *et al.*, 2012). Como ya se ha mostrado previamente, el PC se originaba a partir de precursores celulares que habían expresado el gen *Pax3* durante el desarrollo embrionario. Así pues, para diferenciar las dos poblaciones, las células fueron distinguidas por su expresión *in situ* del gen *Pax3* a través de la expresión de GFP. Las células GFP positivas se localizaron en su nicho adyacente a la papila dérmica del folículo piloso, y no se detectó ninguna en la zona del PC (**Figura 6.34 C**). Luego del periodo de cultivo, estas células no participaron en la formación de los miotubos (**Figura 6.34 D**). Además, para reforzar este resultado se separaron las tres fracciones descritas en el artículo referenciado por medio de citometría de flujo, de modo que los melanocitos se delimitaron dentro de la fracción GFP positiva alta correspondiente al $1,2 \pm 0,4\%$ de la población, las células precursoras dérmicas en la fracción GFP positiva baja siendo el $0,5 \pm 0,1\%$ de la población, y el resto en la fracción GFP negativa (**Figura 6.34 E**). En la fracción GFP positiva alta sólo se observaron células fusiformes (**Figura 6.34 H**) y cierto es que se observó una leve formación de miotubos en la fracción GFP negativa donde se agrupaban aquellas células que no expresaban *Pax3*, pero también en la fracción GFP positiva baja que representaba a algunas poblaciones de precursoras dérmicas (**Figura 6.34 F-G**), indicando que alguna población celular de la piel con una baja expresión del gen *Pax3* albergaba un leve potencial miogénico, aunque no llegaba a formar un cultivo mayoritario de miotubos.

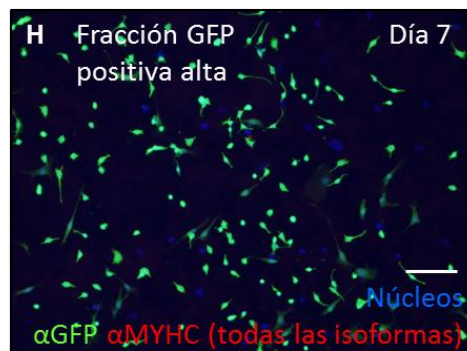
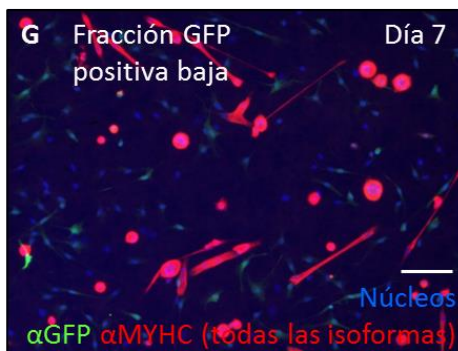
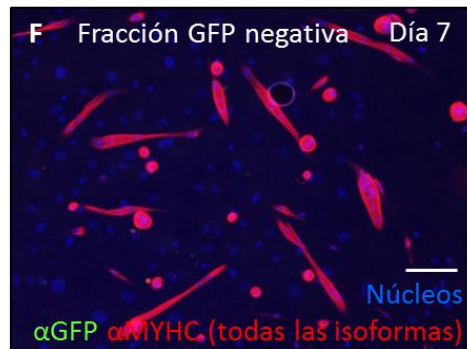
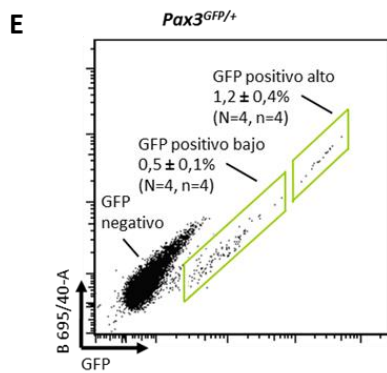
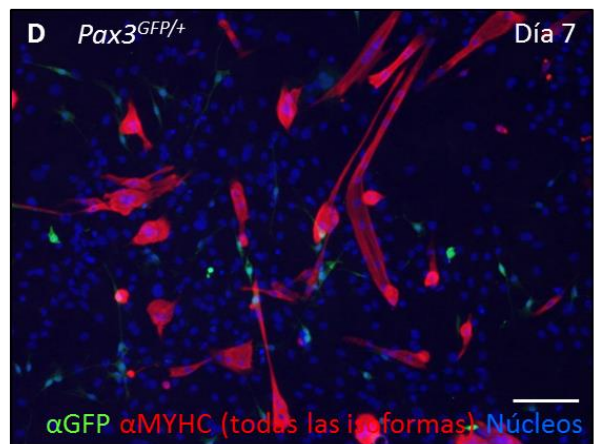
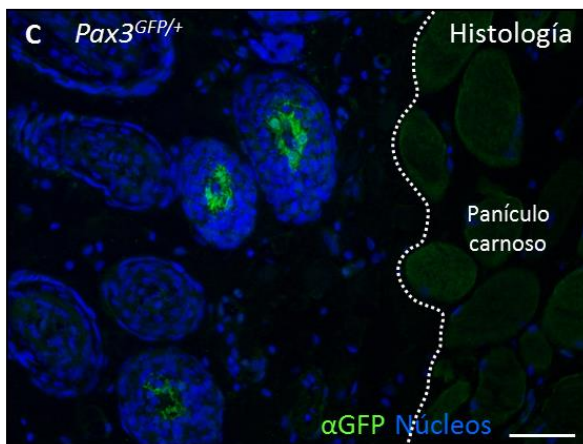
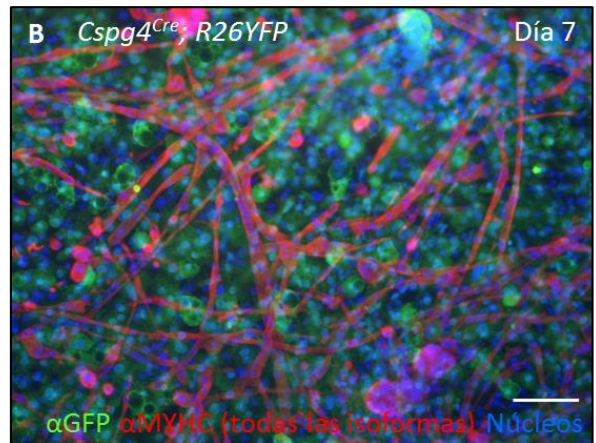
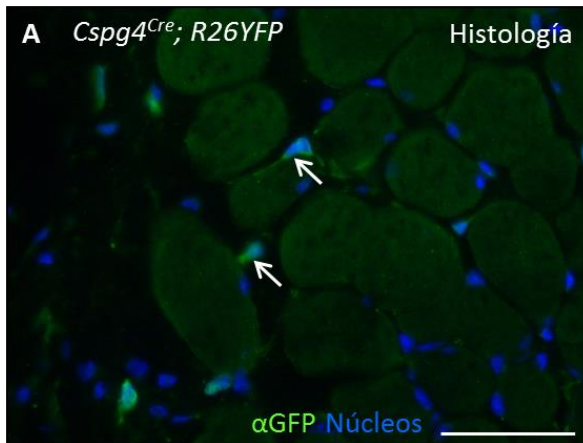


Figura 6.34. Contribución a la generación de los miotubos por parte de otras poblaciones celulares no-miogénicas *per se*. **(A-B)** Trazado de linaje de *Cspg4^{Cre}; R26YFP* localizando las células trazadas EYFP positivas (verde) por inmunofluorescencia en una sección histológica de la piel dorsal indicadas con flechas blancas **(A)** y analizando la expresión proteica de EYFP (verde) y MYHC (todas las isoformas) (rojo) por inmunofluorescencia en el cultivo en adhesión a los 7 días **(B)**. **(C-H)** Estudio de las células de la piel que expresan el gen *Pax3 in situ* con el uso de la cepa transgénica *Pax3^{GFP/+}* no siendo este un trazado de linaje. Localización *in situ* de las células que expresan este gen a través de la detección por inmunofluorescencia de la proteína reportero GFP (verde) en un corte histológico donde se delimita el PC con una línea de puntos **(C)** y en el posterior cultivo en adhesión de 7 días junto con la detección de la proteína miogénica MYHC (todas las isoformas) (rojo) **(D)**. **(E-H)** Análisis y separación por citometría de flujo donde se muestran las tres fracciones bien diferenciadas; la GFP positiva alta, la GFP positiva baja y la GFP negativa **(E)**, para cultivarlas por separado en condiciones adherentes durante 7 días, detectando por inmunofluorescencia la proteína reportero GFP (verde) y la proteína miogénica MYHC (todas las isoformas) (rojo) **(F-H)**. Los datos de la citometría de flujo se representan como las medias \pm desviación estándar de los valores obtenidos en experimentos replicados de manera independiente según se especifica por N = ratones y n = experimentos. En los paneles A, B, C, D, F, G y H los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μ m.

6.4.3 Análisis de expresión de marcadores de superficie y aislamiento de la población miogénica derivada del PC

Dada la posibilidad de acotar la población miogénica mediante los trazados de linaje estudiados se trató de definir dicha población realizando un examen masivo de los marcadores de superficie que presentaban, con el propósito de posteriormente poder aislarla sin necesidad de manipulación genética.

Para este experimento se verificó la presencia o ausencia de 176 marcadores de superficie en los cultivos celulares en suspensión obtenidos de los trazados de linaje de *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* y *Cspg4^{Cre}; R26YFP* (véase el Anexo I). Estos cultivos se analizaron por citometría de flujo al cabo de 7 días realizando una doble separación celular, teniendo en cuenta al mismo tiempo la fluorescencia de la proteína reportero y la fluorescencia del anticuerpo unido a un determinado marcador (**Figura 6.35 A**).

A la hora de analizar los datos, en primer lugar se examinaron aquellos marcadores que se expresaban de forma exclusiva por células de la fracción miogénica, en este caso, de la fracción EYFP positiva del trazado de linaje del gen *Myf5*. Sin embargo, los marcadores presentes únicamente en la fracción positiva de este linaje no se relacionaban con la miogénesis (**Figura 6.35 B, segunda columna**). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta ahora se hipotetizó que la

población celular miogénica responsable de la miogénesis *in vitro* se trataba de una población minoritaria y que sus marcadores de superficie estarían expresados en un bajo porcentaje. Aplicando otras pautas de análisis se distinguieron los marcadores en dos grandes grupos (**Figura 6.35 B, tercera y cuarta columna**) y al examinar en detalle aquellos expresados por una población celular menor que el 50%, pero mayor que el 2% (límite para considerarla positiva) (**Figura 6.35 B, cuarta columna**) se distinguió un marcador en concreto que aparecía en las fracciones EYFP+ y EYFP- del trazado de linaje del gen *Myf5*, pero que apenas se expresaba en las fracciones del trazado de linaje del gen *Cspg4*; el marcador SYNDECAN-4 (**Figura 6.35 C-D**). Esta proteína es un proteoglicano transmembrana marcador de las células satélite y que cumple con funciones importantes durante la regeneración muscular (Cornelison and Filla, 2001; Rønning *et al.*, 2015). Se seleccionó por ello este marcador para realizar experimentos de separación por citometría de flujo en base a su expresión, por si pudiera ser suficiente como para aislar la población miogénica de interés (**Figura 6.36**).

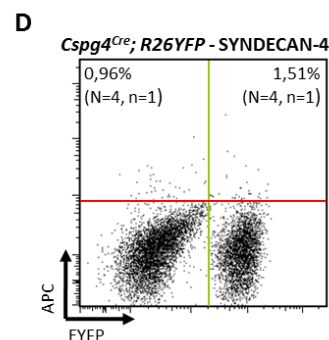
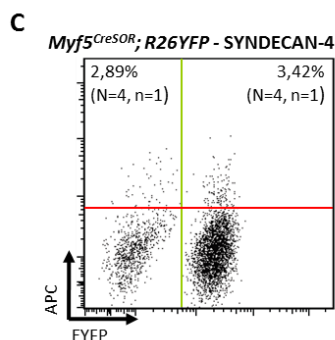
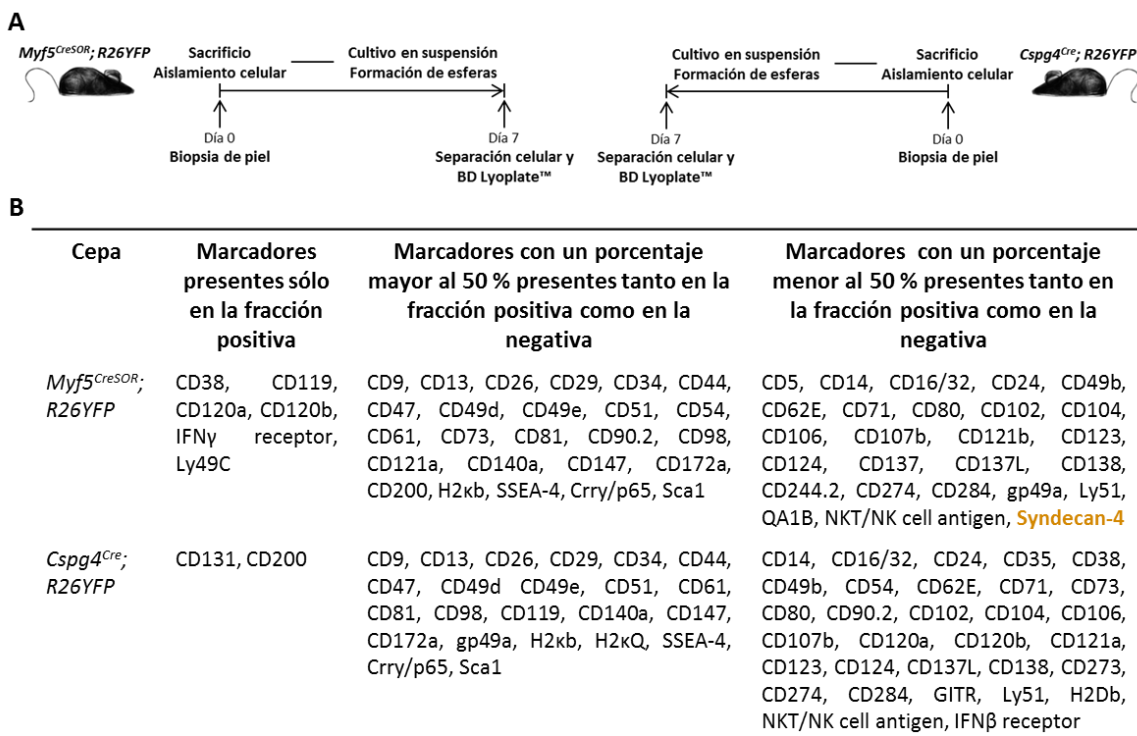


Figura 6.35. Análisis masivo de la expresión de proteínas de superficie por citometría de flujo en poblaciones celulares determinadas por los trazados de linaje. **(A)** Esquema del diseño experimental realizado con las líneas de trazado *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* (izquierda) y *Cspg4^{Cre}; R26YFP* (derecha), donde una vez cultivadas las células en suspensión durante 7 días se analizó la expresión de los marcadores de superficie en cada fracción celular negativa y positiva para el trazado de linaje. **(B)** Tabla resumen de los marcadores destacados de acuerdo con las distintas premisas utilizadas para su clasificación. **(C-D)** Cuantificación mediante citometría de flujo del número de células que expresaban la proteína SYNDECAN-4 y eran a su vez negativas para EYFP (cuadrante superior izquierda) o bien positivas para EYFP (cuadrante superior derecha) dentro del linaje del gen *Myf5* **(C)** o del gen *Cspg4* **(D)**. Se muestran las medias \pm desviación estándar de los datos obtenidos según se especifica por N = ratones y n = experimentos.

Al separar una muestra de cultivo celular no transgénica derivada de un ratón control *CD1* según la expresión de SYNDECAN-4 se cuantificó sólo un $0,86 \pm 0,004\%$ de células positivas (**Figura 6.36 A**), que se diferenciaron en miotubos estriados MYHC positivos (**Figura 6.36 C**) al igual que el cultivo control no separado (**Figura 6.36 B**). No obstante, también se detectaron miotubos MYHC positivos en la fracción SYNDECAN-4 negativa (**Figura 6.36 D**). Se planteó entonces la necesidad de acotar más la población de interés por lo que se repitió el experimento, pero partiendo de una muestra del transgénico *Myf5^{CreSOR}; R26YFP*, de manera que se separaron cuatro poblaciones celulares; la población EYFP- SYNDECAN-4+ correspondiente al $0,5 \pm 0,005\%$, la fracción EYFP+ SYNDECAN-4+ al $1,44 \pm 0,01\%$, la fracción EYFP- SYNDECAN-4- al $11,35 \pm 0,004\%$ y la población EYFP+ SYNDECAN-4- al $27,45 \pm 0,01\%$ (**Figura 6.36 E**). En la muestra control sin separar se detectaron miotubos EYFP y MYHC positivos (**Figura 6.36 F**). Sin embargo, esta aproximación tampoco permitió realizar una separación completa de la población miogénica, ya que tanto en la fracción EYFP+ SYNDECAN-4+ como en la EYFP+ SYNDECAN-4- se obtuvieron miotubos MYHC positivos (**Figura 6.36 G-H respectivamente**). Al parecer, el aislamiento de la población en base a la expresión de la proteína de superficie SYNDECAN-4 no era lo suficientemente específico como para obtener un resultado puro. No obstante, si bien es cierto que los miotubos se formaban tanto en la fracción SYNDECAN-4+ como en la SYNDECAN-4-, siempre se generaban en la fracción positiva para el linaje del gen *Myf5* (**Figura 6.36 I-J**), confirmando una vez más el origen miogénico de los miotubos.

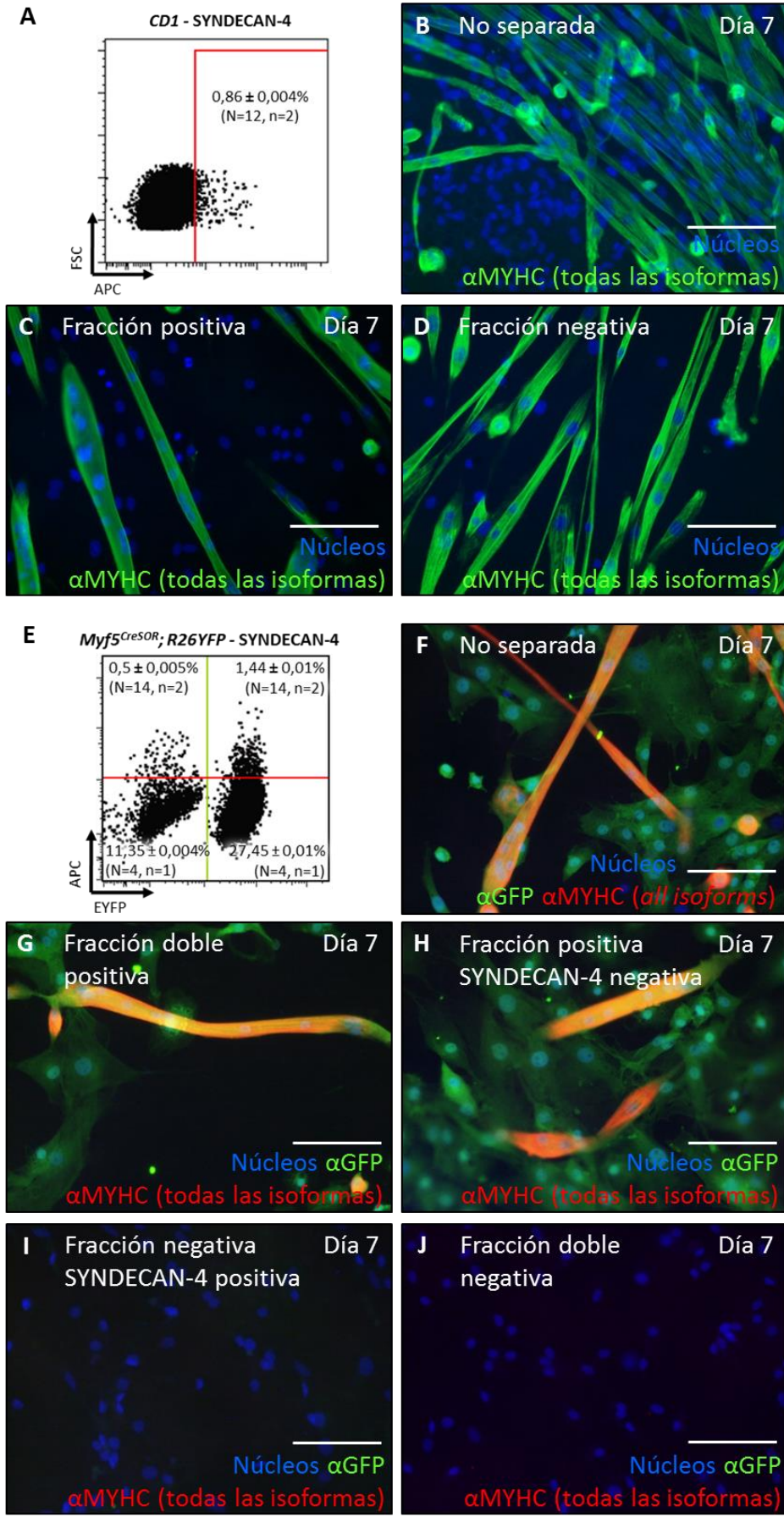


Figura 6.36. Análisis del potencial miogénico en cultivos en adhesión a los 7 días de las distintas fracciones separadas por citometría de flujo en base a la expresión de SYNDECAN-4. **(A-D)** Separación del cultivo celular obtenido a partir de un ratón no transgénico (*CD1*) en base a la expresión del marcador SYNDECAN-4 indicando la media \pm desviación estándar de los datos obtenidos según se especifica por N = ratones y n = experimentos **(A)** junto con la detección de los microtubulos MYHC (todas las isoformas) positivos (verde) por inmunofluorescencia en el cultivo no separado **(B)**, en el de la fracción positiva **(C)** y en el de la negativa **(D)**. **(E-J)** Separación doble del cultivo celular del ratón transgénico *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* en base a la expresión de la proteína reportero EYFP y del marcador SYNDECAN-4 mostrando las medias \pm desviación estándar de los datos obtenidos según se especifica en cada caso por N = ratones y n = experimentos **(E)** y análisis por inmunofluorescencia de la expresión de EYFP (verde) y MYHC (todas las isoformas) (rojo) en el cultivo no separado **(F)**, en el derivado de la fracción EYFP+ SYNDECAN-4+ **(G)**, de la fracción EYFP+ SYNDECAN-4- **(H)**, de la EYFP- SYNDECAN-4+ **(I)** y de la EYFP- SYNDECAN-4- **(J)**. En los paneles B, C, D, F, G, H, I y J los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μ m.

Para esclarecer la identidad y potencial miogénico de las fracciones separadas se realizó un análisis transcriptómico de todas ellas, de la muestra control CD1 y de los trazados de linaje de *Myf5^{CreSOR}; R26YFP*, *B195AP^{Cre}; R26YFP*, *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG* y *Cspg4^{Cre}; R26YFP*, todos ellos fraccionados en base a la expresión de SYNDECAN-4 y del reportero fluorescente si era el caso. Los resultados obtenidos se compararon a su vez con datos publicados en la base de datos GEO (**véase el Anexo II**) (**Figura 6.37**). A través de un análisis de PCA de la expresión de un total de 78 *arrays* correspondientes a 35 poblaciones celulares diferentes se observó cómo las muestras derivadas de la piel, tanto las miogénicas como las no miogénicas, se agrupaban junto a muestras miogénicas conocidas, pero también en conjunto con fibroblastos y células intersticiales musculares (**Figura 6.37 A**). Cuando se realizó un agrupamiento jerárquico aplicando la correlación métrica y el enlace promedio, las fracciones consideradas miogénicas se ramificaron juntas y se encontraron separadas de la fracción no miogénica, la positiva para el linaje del gen *Cspg4*, (**Figura 6.37 B**). La expresión de factores miogénicos clave como *MyoD1*, *Myf6*, *Ttn* y *Miogenina* se encontraba reducida en la fracción no miogénica (linaje positivo del gen *Cspg4*) cuando se comparó con la expresión de las poblaciones miogénicas (**Figura 6.37 C**). Además, de entre los 1476 genes que se encontraban sobreexpresados cuando fueron comparadas las poblaciones miogénicas seleccionadas y la población no miogénica, y de los 3397 genes sobreexpresados al comparar las poblaciones miogénicas de las bases de datos con la misma población no miogénica se encontraron 1000 genes en común (**Figura 6.37 D**). Finalmente, un análisis de enriquecimiento en grupos de genes (GSEA) mostró dos categorías relacionadas con el desarrollo del músculo entre aquellos términos

enriquecidos significativamente en el análisis GSEA (Figura 6.37 E). Tomados en conjunto, estos datos del análisis transcriptómico sugerían que los precursores miogénicos de la piel tenían un origen muscular.

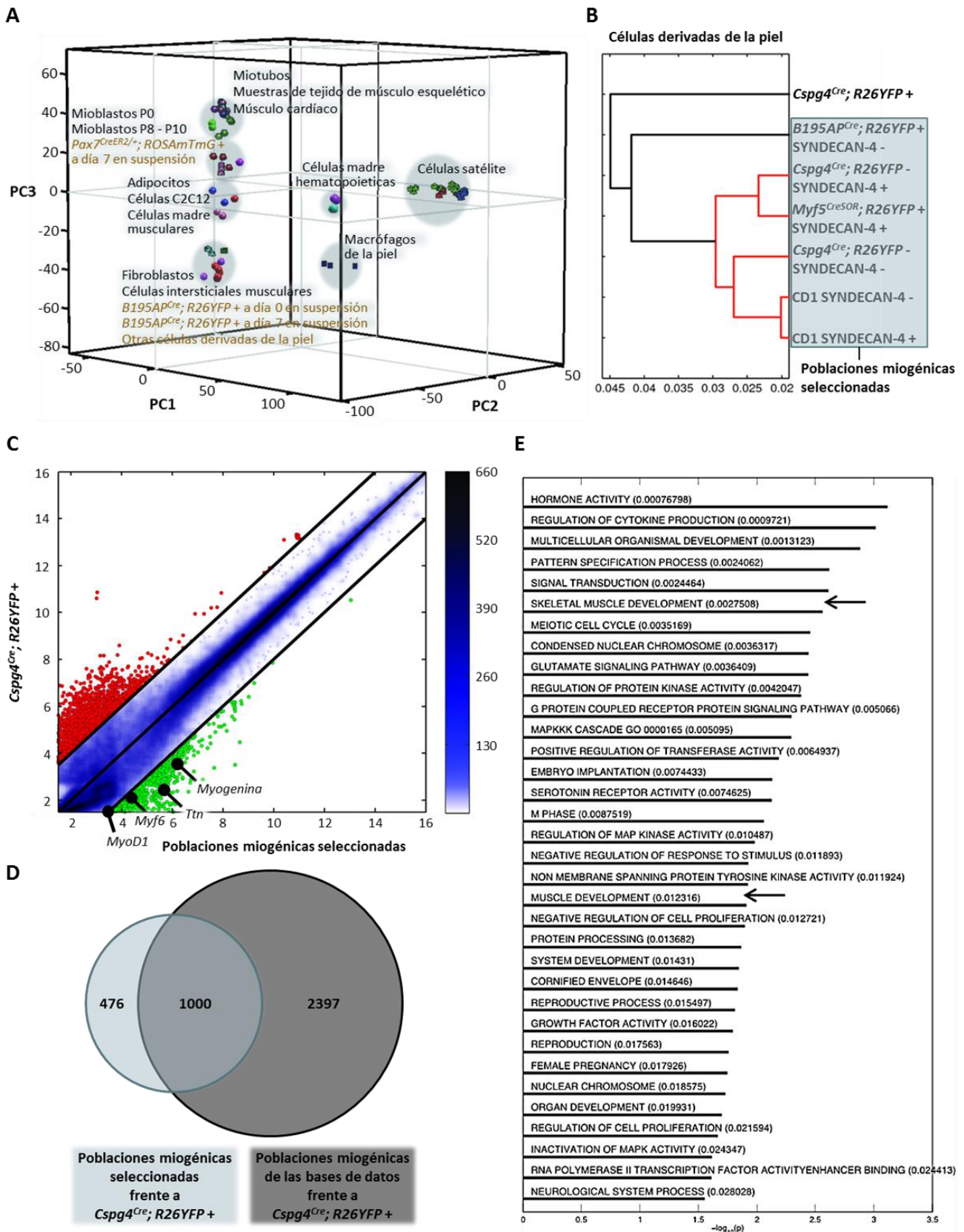


Figura 6.37. Análisis del transcriptoma de las fracciones separadas por citometría de flujo comparadas entre sí y con los datos publicados en la base de datos GEO. Para configurar el panel A se analizaron las fracciones *CD1 SYNDECAN-4+/-*, *Myf5^{CreSOR}*; *R26YFP+ SYNDECAN-4+*, *Cspg4^{Cre}*; *R26YFP- SYNDECAN-4+/-*, *Cspg4^{Cre}*; *R26YFP+*, *B195AP^{Cre}*; *R26YFP+ SYNDECAN-4-*, *B195AP^{Cre}*; *R26YFP+* a día 0 en suspensión/a día 7 en suspensión y *Pax7^{CreER2/+}*; *ROSA^{mTmG+}*. Para el resto de los paneles se utilizaron las mismas muestras salvo las tres últimas. **(A)** Representación gráfica del PCA de los datos de expresión génica donde el primer componente principal (PC1) captura el 47% de la variabilidad, el PC2 el 13% y el PC3 un 7,3%. **(B)** Agrupamiento jerárquico de las muestras mediante el método de la correlación métrica y el enlace promedio donde se agruparon las poblaciones indicadas como las *poblaciones miogénicas seleccionadas*, utilizadas en conjunto en posteriores análisis. **(C)** Gráfica de dispersión pareada donde se compara la expresión génica de las dos muestras en una escala logarítmica. Los genes sobreexpresados en la muestra de la ordenada cuando es comparada con la muestra de la abscisa se señalan en puntos rojos, en puntos verdes los sub-expresados y con puntos negros se indica la posición de los marcadores miogénicos *MyoD1*, *Myf6*, *Ttn* y *Miogenina*. La barra de color indica la densidad de la dispersión. **(D)** Diagrama de Venn mostrando la superposición de (I) los genes sobreexpresados entre las poblaciones miogénicas seleccionadas y la fracción *Cspg4^{Cre}*; *R26YFP+* y de (II) los genes sobreexpresados entre las poblaciones miogénicas de las bases de datos y la fracción *Cspg4^{Cre}*; *R26YFP+*. **(E)** Barra donde se muestran los términos GSEA-enriquecidos significativos (los valores de p se muestran entre paréntesis) en una escala de $-\log_{10}(p)$. Las flechas indican los términos GSEA relacionados con el desarrollo del músculo.

6.4.4 Implicación de las células satélite del PC en la formación de los miotubos *in vitro*

Para corroborar la hipótesis de que las células satélite del PC son las únicas responsables de la diferenciación miogénica observada *in vitro* se realizó un experimento de depleción *in vivo* y se analizó el cultivo en adhesión resultante de estas muestras (**Figura 6.38**). Gracias al uso de la cepa transgénica inducible *Pax7^{CreER2/+}*; *R26R^{GFP-DTA/+}* (N = 3 ratones) se eliminó la población celular que expresaba el gen *Pax7* en el adulto, eliminando así la población de las células satélite del PC (**Figura 6.38 A**). La muestra con ausencia de dicha población celular resultó en un cultivo sin diferenciación miogénica (**Figura 6.38 C, F, H**), no se detectaron células PAX7 positivas ni miotubos MYHC positivos por inmunofluorescencia (**Figura 6.38 F, H respectivamente**). En cambio, en el cultivo procedente de los ratones control (**Figura 6.38 B, D, E, G**) se observaron miotubos MYHC positivos (**Figura 6.38 G**) con células PAX7 positivas (**Figura 6.38 D**), algunas de ellas localizadas incluso en la periferia de los miotubos (**Figura 6.38 E**). Con esto quedó inequívocamente demostrado que la miogénesis derivada de la piel se originaba a partir de las células satélite del PC.

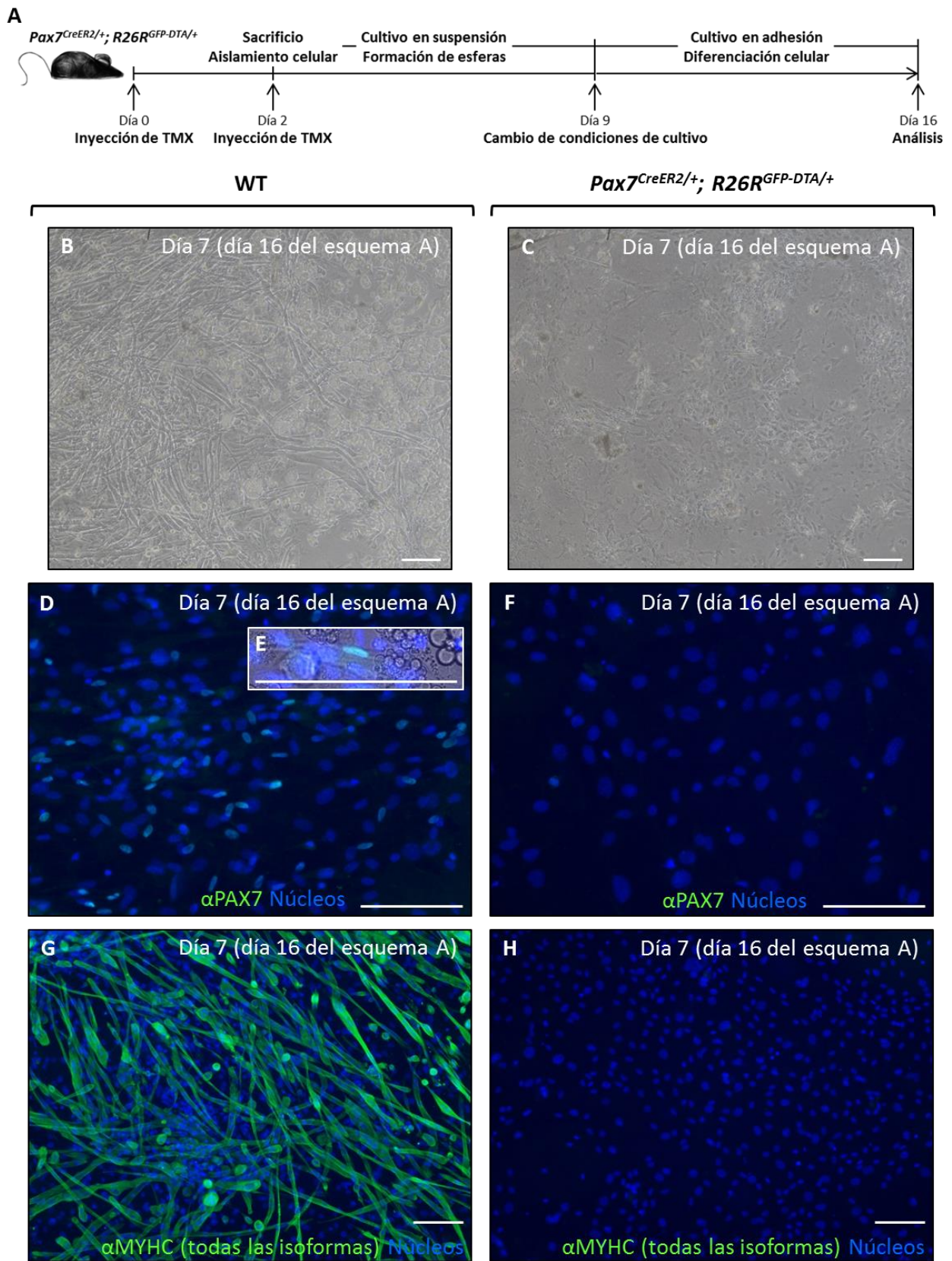


Figura 6.38. Cultivo celular analizado en adhesión a 7 días tras la supresión de la población de las células satélite del PC. **(A)** Esquema del diseño experimental utilizado mostrando que los ratones fueron inducidos con TMX 3 días antes y el mismo día del sacrificio para procesar las biopsias hasta su cultivo en adhesión. **(B-H)** Cultivos obtenidos a partir de una muestra control WT **(B, D, E, G)** y de una muestra procedente del ratón $Pax7^{CreER2/+}; R26R^{GFP-DTA/+}$ **(C, F, H)**. **(B-C)** Aspecto morfológico de los cultivos obtenidos. **(D-H)** Detección por inmunofluorescencia de las proteínas PAX7 (verde) **(D-F)** y MYHC (todas las isoformas) (verde) **(G-H)**. En los paneles D, E, F, G y H los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y en estos paneles y en los paneles B y C las barras de tamaño representan 100 μm .

6.4.5 Potencial regenerativo de las células derivadas del PC en un modelo de daño muscular *in vivo*

A fin de medir el posible uso de esta población celular en experimentos con mayor carácter traslacional se evaluó su capacidad regenerativa *in vivo* (**Figura 6.39**). En diversos trabajos previos se ha evaluado el potencial miogénico de precursores dérmicos en ensayos *in vivo* de distintas características (Montanaro *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2010; Wakabayashi *et al.*, 2010), pero no se ha estudiado en un mismo ensayo la capacidad de incorporación al nicho de las células madre y el potencial regenerativo de las células inyectadas. Por ello, se planteó un diseño experimental más completo basado en los descritos por Boldrin y colaboradores (Boldrin *et al.*, 2009, 2012) que permitían analizar la incorporación de las células inyectadas a los nichos vaciados por la irradiación, determinar su supervivencia dentro de esos nichos y medir su funcionalidad tras generar daño por CTX (**Figura 6.39 A**). Se inyectaron células cultivadas en suspensión durante 7 días procedentes del ratón $B195AP^{Cre}; R26YFP$ en 3 ratones de la cepa inmuno-suprimida $Foxn1^{nu}$, pero sólo en uno de ellos se encontraron fibras regenerativas con núcleos centrales (**Figura 6.39 B, recuadros C y E**) positivas para EYFP por inmunofluorescencia (**Figura 6.39 C-F**). En esta muestra se detectaron 30 fibras EYFP positivas, que suponían el 1,22% de las fibras totales de ese corte histológico. Además, las células EYFP positivas también se localizaron en el espacio intersticial del músculo y algunas parecían posicionarse bajo la membrana basal LAMININA positiva, indicando una repoblación del compartimento de las células satélite (**Figura 6.39 D, F, flechas blancas**). Esto sugería que las células satélite del PC trazadas por el gen *Myf5*, sobrevivían dentro del nicho de las células madre y contribuían a la regeneración del músculo dañado, fusionándose y dando lugar a fibras regenerativas.

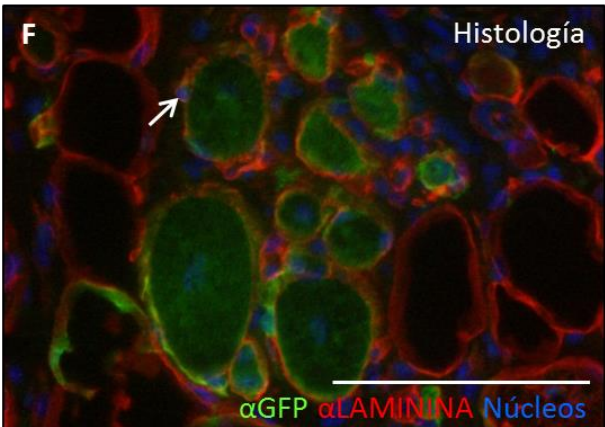
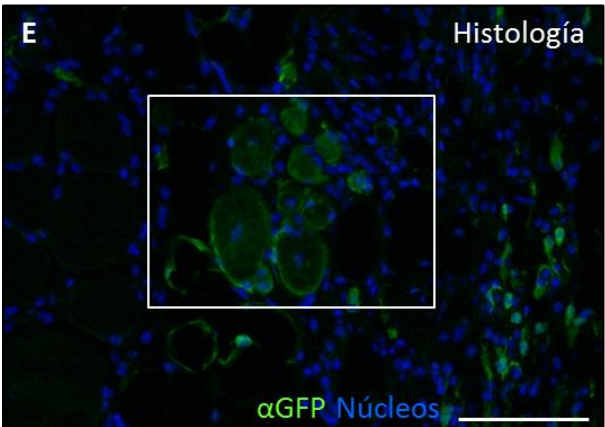
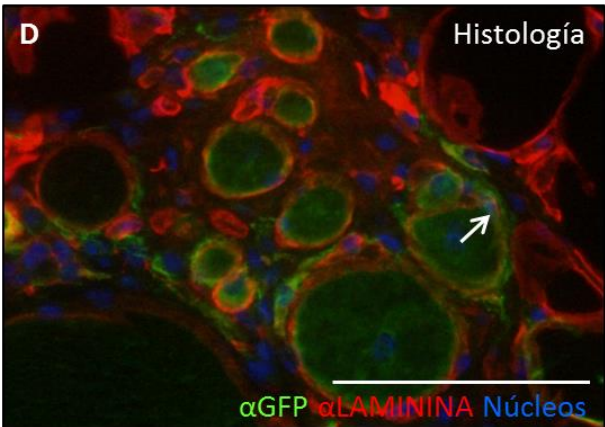
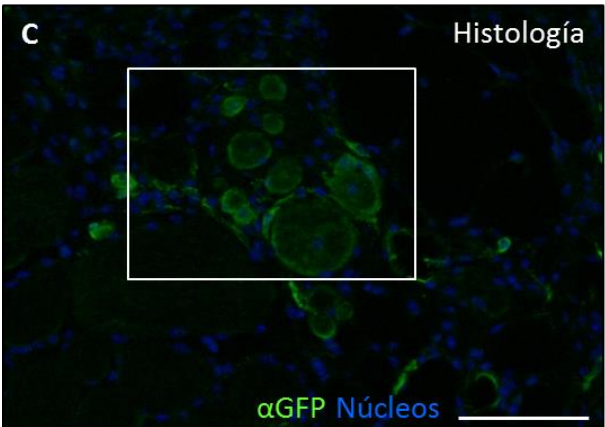
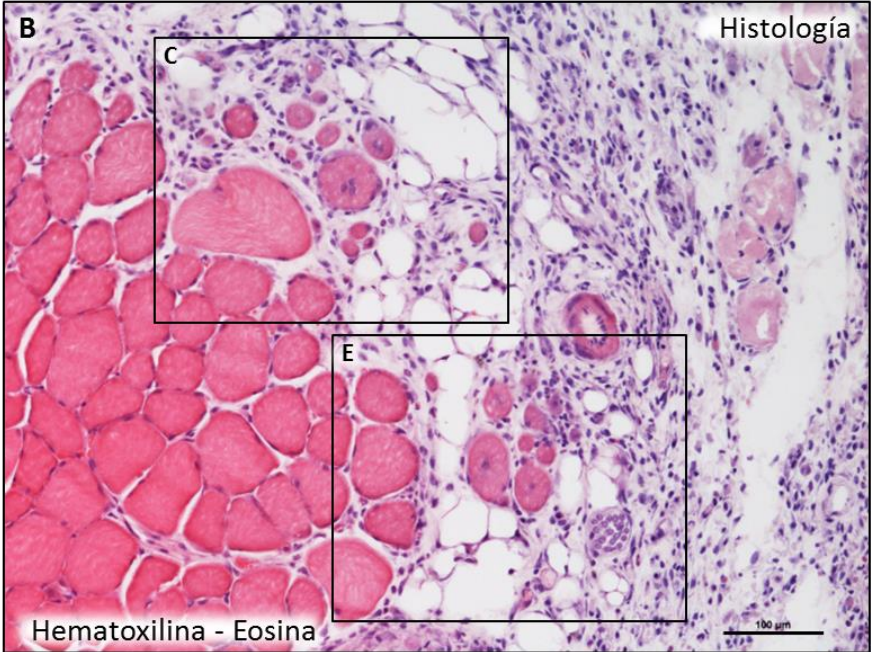
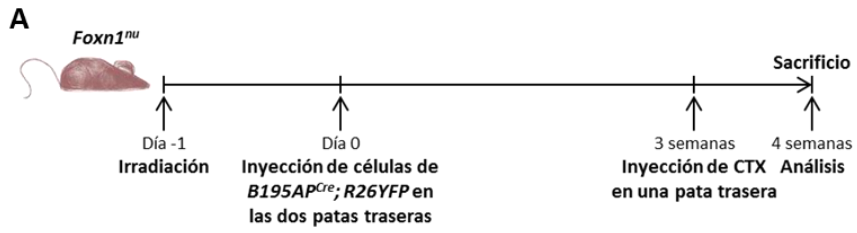


Figura 6.39. Contribución a la regeneración muscular *in vivo* por parte de células del trazado de *B195AP^{Cre}; R26YFP* cultivadas en suspensión hasta los 7 días. **(A)** Representación del diseño experimental planteado donde a los ratones de la cepa inmuno-suprimida *Foxn1^{nu}* se les inyectaron las células procedentes de ratones *B195AP^{Cre}; R26YFP* en las dos patas posteriores irradiadas para más tarde dañar sólo una de ellas con CTX. **(B-F)** Análisis histológico de los músculos TA del grupo experimental. **(B)** Corte transversal del músculo esquelético teñido con Hematoxilina-Eosina donde se destacan en los recuadros C y E las fibras regenerativas con los núcleos centrales correspondientes a las mismas fibras EYFP positivas (verde) detectadas por inmunofluorescencia **(C, E)**, donde a su vez, en fotografías con mayor magnificación de estas mismas fibras analizadas por inmunofluorescencia para la detección de las proteínas EYFP (verde) y LAMININA (rojo), se llegan a observar células posicionadas en el nicho de las células satélite indicadas con flechas blancas **(D, F)**. En los paneles C, D, E y F los núcleos se tiñeron con Hoechst y en estos mismos y en el panel B las barras de tamaño representan 100 μm .

Estas células representan así a la población miogénica de la piel dorsal del ratón previamente descrita (Pai, 1965; Chaudhari, Delay and Beam, 1989; Courbin *et al.*, 1989; Adams and Beam, 1990; Salvatori *et al.*, 1995; Gibson *et al.*, 1995; Wise, Watt and Jones, 1996; Relvas *et al.*, 1997; Goldring, Jones and Watt, 2000; Pye and Watt, 2001; Goldring *et al.*, 2002; Montanaro *et al.*, 2003; Rufaut *et al.*, 2006; Wakabayashi *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2010; Somuncu *et al.*, 2015, 2016), la principal población celular miogénica capaz de generar una diferenciación músculo esquelética no sólo *in vitro* sino también *in vivo*.

6.5 Contribución de las células derivadas de la médula ósea al PC y a la formación de miotubos *in vitro*

En referencia al papel fisiológico del propio PC y de sus células satélite, el grupo de Brazelton y colaboradores describió en el 2003 un resultado interesante sobre la incorporación de las células derivadas de la médula ósea a los distintos músculos esqueléticos del ratón, mostrando que tras el trasplante de médula ósea realizado entre ratones y en ausencia de daño, las células derivadas de la médula ósea se injertaban en el PC en un porcentaje significativamente mayor en comparación con los otros músculos analizados. Sin embargo, no profundizaron sobre el porqué de este hecho o sobre la función que pudieran estar cumpliendo estas células en el músculo esquelético.

Por esta razón, se repitió el experimento realizado por este grupo, para confirmar dichos resultados, pero también para analizar si esta población puede contribuir a la población de las células satélite, adquirir características miogénicas y contribuir a la generación de miotubos

estriados *in vitro* (**Figura 6.40**). 3 ratones de la cepa *Bmi1^{CreER/+}; R26YFP* fueron irradiados previo al trasplante de médula ósea de los ratones donantes *Act-RFP*. A los 15 meses se analizó la piel dorsal y se cultivaron las células hasta su análisis a los 7 días de cultivo en adhesión (**Figura 6.40 A**). *Bmi1* es un factor de transcripción expresado por la mayoría de las células madre, incluyendo las células satélite del músculo esquelético (Robson *et al.*, 2011). En los animales trasplantados, el PC tuvo una considerable contribución por parte de las células DsRed positivas derivadas de la médula ósea, obteniendo un recuento del 6,95% de fibras DsRed positivas al analizar las muestras por inmunofluorescencia, valor que se encontraba en el rango esperado según lo publicado por Brazelton y colaboradores (Brazelton, Nystrom and Blau, 2003) (**Figura 6.40 B-D, flechas blancas**). Además, se detectaron células del donante posicionadas en el nicho de las células satélite (**Figura 6.40 E, flecha blanca**). Para arrojar luz sobre el estado funcional de estas células, estas se aislaron y cultivaron. El cultivo en adhesión a los 7 días obtenido a partir de las células aisladas de la piel del ratón trasplantado demostró que la progenie de las células DsRed positivas derivadas de la médula ósea no contribuía a la formación de los miotubos (**Figura 6.40 F**), sino que generaba unas pocas células con pequeñas prolongaciones (**Figura 6.40 G**). Estos resultados indicaban que las células del donante eran capaces de repoblar el nicho de las células madre del músculo, pero que no llegaban a adquirir unas características miogénicas funcionales, no siendo capaces de generar miotubos *in vitro*.

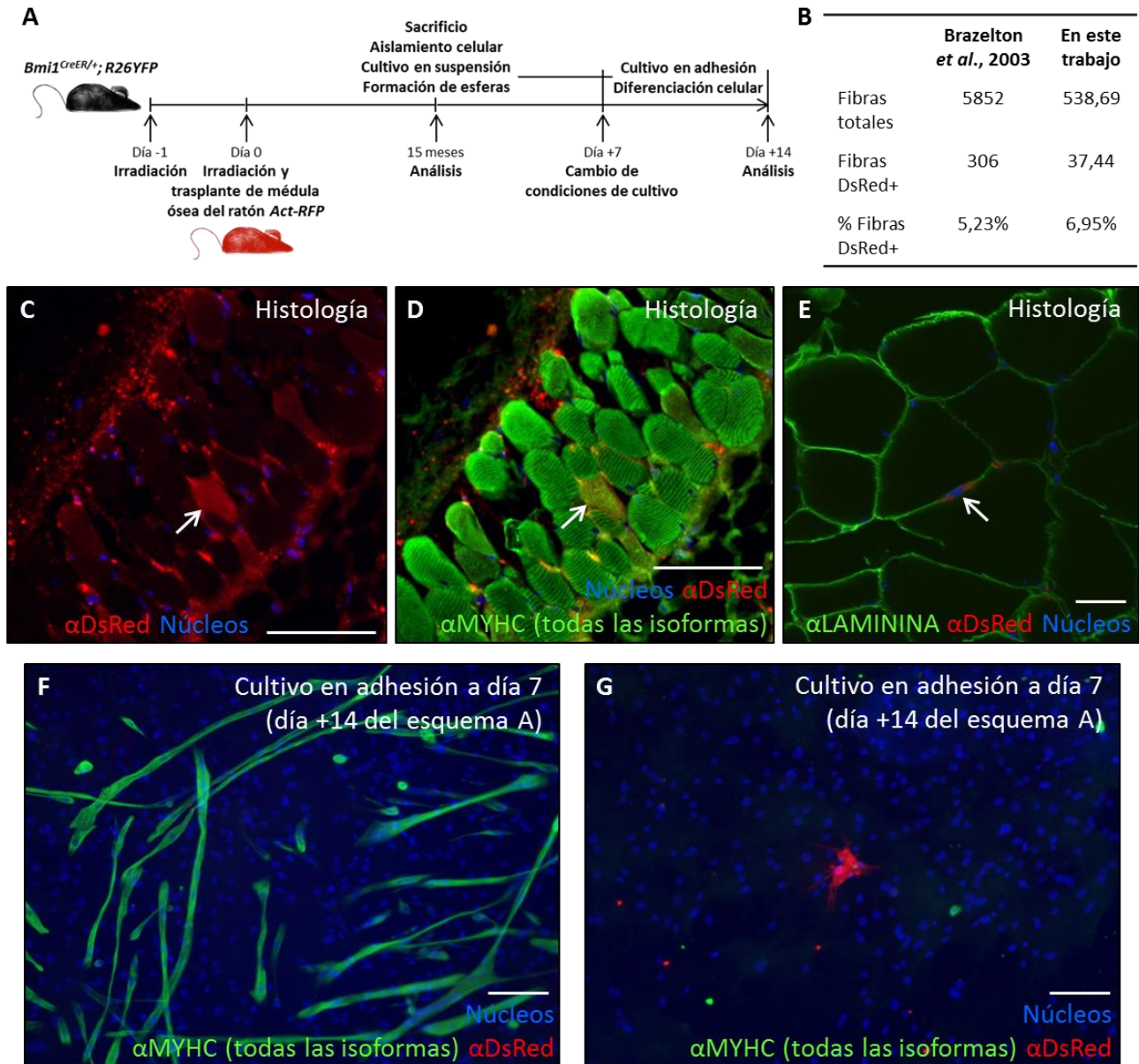


Figura 6.40. Contribución de las células derivadas de la médula ósea al PC y a los cultivos en adhesión resultantes. **(A)** Esquema del diseño experimental utilizado donde los ratones *Bmi1^{CreER/+}; R26YFP* irradiados fueron trasplantados con la médula ósea de ratones *Act-RFP* y sacrificados a los 15 meses para su análisis y cultivo celular. **(B)** Resultados de la cuantificación de la incorporación de las células DsRed positivas derivadas de la médula ósea al PC como las fibras DsRed positivas publicada y la realizada en este trabajo. **(C-G)** Análisis por inmunofluorescencia de cortes histológicos **(C-E)** y de cultivos en adhesión a los 7 días **(F-G)** donde se muestran señalada por flechas blancas una fibra DsRed positiva (rojo) **(C)** localizada dentro del PC MYHC (todas las isoformas) positivo (verde) **(D)**, una célula DsRed positiva dentro del nicho de una célula satélite resaltado por el marcaje de LAMININA (verde) también indicada por una flecha blanca en una fotografía obtenida a través del microscopio confocal **(E)**, y un cultivo celular en el que se han generado miotubos DsRed negativos (rojo) y MYHC (todas las isoformas) positivos (verde) **(F)** y células DsRed positivas (rojo) **(G)**. En los paneles D, E, F y G los núcleos se tiñeron con Hoechst, las barras de tamaño en los paneles C, D, F y G representan 100 µm y en el panel E 20 µm.

6.6 Papel fisiológico del PC en homeostasis y en respuesta a herida

Se considera que el PC es particularmente regenerativo de acuerdo con los resultados sobre la alta incorporación de las células derivadas de la médula ósea al PC y por la morfología heterogénea de sus fibras (Brazelton, Nystrom and Blau, 2003). Siguiendo con el estudio de su función dentro de la piel se quiso verificar esta alta capacidad regenerativa del PC en condiciones fisiológicas y en presencia de daño.

Para ello se indujo con TMX el trazado de linaje del gen *Pax7* al momento de realizar la herida por escisión en la piel del ratón de dos grupos de ratones de N = 3 cada uno, analizando uno a los 5 días y otro a los 10 días (**Figura 6.41 A**). Se realizó un estudio histológico de las muestras, primero tiñéndolas con Hematoxilina-Eosina para comprobar la profundidad (hasta el PC) de la biopsia tomada con el sacabocados (**Figura 6.41 B**) y la morfología del tejido dañado, que tenían un aspecto desorganizado y lleno de tejido inflamatorio tanto a los 5 días (**Figura 6.41 C**) como a los 10 días (**Figura 6.41 D**); y después analizando directamente la expresión de EGFP (**Figura 6.41 E-M**). En contraste con las muestras control (**Figura 6.41 E, H**), tras la inducción por TMX pero en ausencia de daño se observó expresión de EGFP en el PC a los 5 días (**Figura 6.41 F, K**) y también a los 10 días (**Figura 6.41 I, L**), donde la fluorescencia aumentaba ligeramente respecto al día 5 (**Figura 6.41 M**). En respuesta a la herida, las fibras positivas para EGFP o bien la intensidad de la fluorescencia de estas aumentó de manera significativa respecto al control negativo (**Figura 6.41 M**) tanto a los 5 días (**Figura 6.41 G**) como a los 10 días (**Figura 6.41 J**), indicativo de una mayor respuesta regenerativa inducida por el daño.

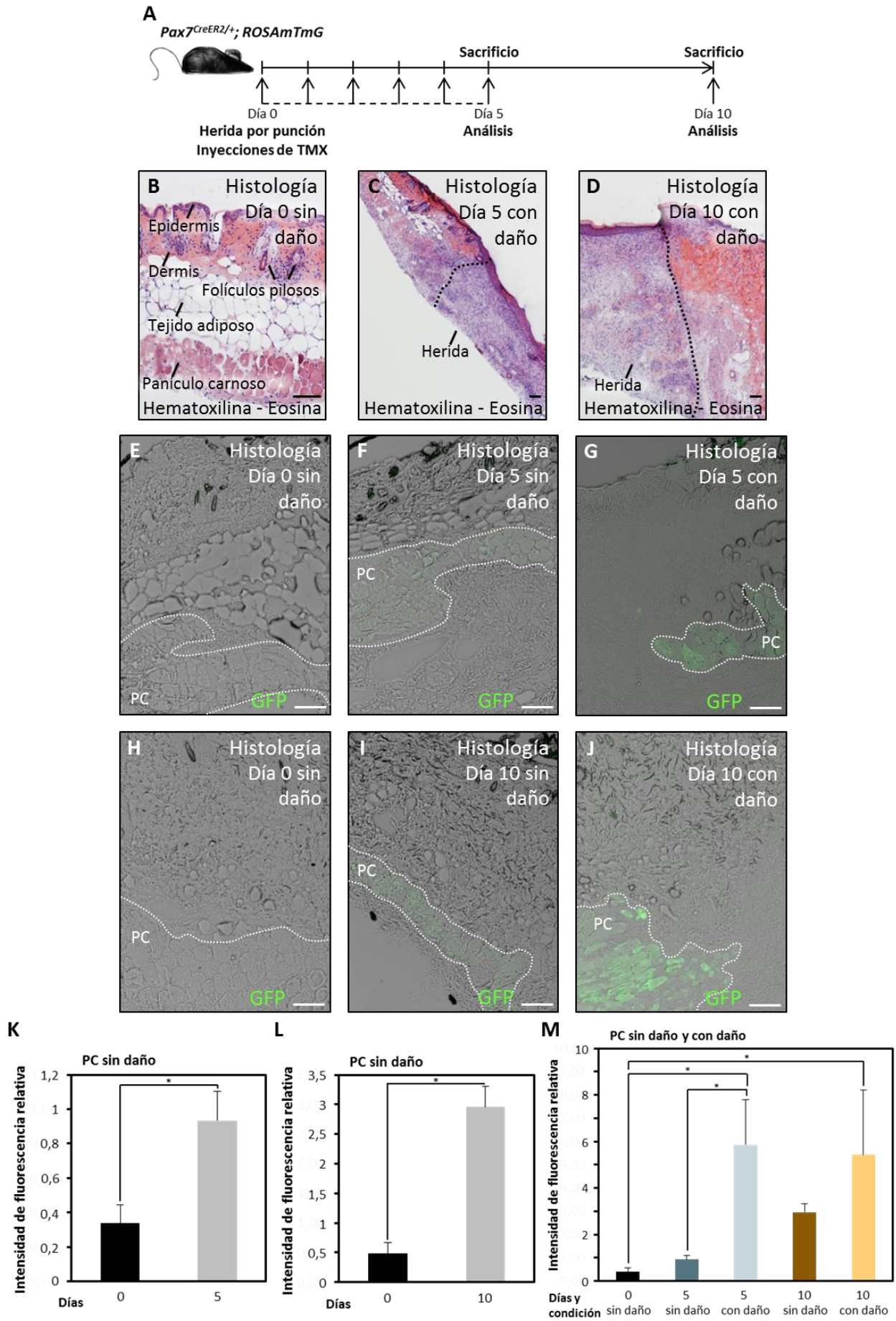


Figura 6.41. Caracterización de la capacidad regenerativa del PC en homeostasis y frente a daño a nivel histológico. **(A)** Esquema del diseño experimental donde los ratones *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG+* fueron inducidos a la par que se realizó la herida por punción para ser analizados a los 5 y 10 días. **(B-D)** Secciones histológicas teñidas con Hematoxilina-Eosina del trozo de tejido eliminado a día 0 **(B)**, de la zona cicatrizando a los 5 días **(C)** y a los 10 días **(D)**. **(E-J)** Observación de la fluorescencia de la proteína reportero EGFP en cortes histológicos mostrando una zona sin daño a día 0 **(E, H)**, una zona sin daño a los días 5 **(F)** y 10 **(I)**, y una zona con daño a los días 5 **(G)** y 10 **(J)**. **(K-M)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) presente en el área del PC delimitada por la línea de puntos. Se muestran las comparativas entre el IFR a día 0 con el IFR de la zona sin daño a los 5 días **(K)** y con el IFR de la zona sin daño a los 10 días **(L)**, y entre el IFR de las zonas sin daño a los días 0, 5 y 10 con el IFR de las zonas con daño a los 5 y 10 días **(M)**. Las barras de las gráficas representan las medianas \pm desviación estándar de los valores de IFR obtenidos de entre 1 a 7 secciones independientes de las muestras analizadas de los 3 ratones. Los asteriscos representan el valor de p según $p < 0,05$ *. Las barras de tamaño en los paneles B, C, D, E, F, G, H, I y J representan 100 μm .

Por otro lado, se ha descrito la contribución directa de las células satélite y de su progenie al tejido de granulación en formación a través de un trazado de linaje constitutivo del gen *Pax7* (Amini-Nik *et al.*, 2011). La observación de una mayor respuesta regenerativa del PC inducida por el daño (**Figura 6.41 M**) nos hizo cuestionar esta implicación de las células satélite del PC y de su descendencia celular en el proceso de la cicatrización de la piel.

Para estudiar este fenómeno, los ratones del trazado de linaje del gen *Pax7* fueron inducidos con TMX un mes antes de causar la herida, para asegurar que el PC y todas las células satélite estuvieran marcadas por la expresión de la proteína reportero EGFP al momento de realizar los análisis. Se analizó un grupo de N = 3 ratones a los 5 días y otro grupo N = 3 ratones a los 10 días (**Figura 6.42 A**). Se realizó la misma comprobación histológica a través de la tinción de Hematoxilina-Eosina del estado de la biopsia realizada (**Figura 6.42 B**) y del aspecto morfológico del tejido dañado, que presentaba inflamación y desestructuración tanto a los 5 días (**Figura 6.42 C**) como a los 10 días (**Figura 6.42 D**). También se verificó el trazado de linaje mediante la observación directa de la fluorescencia de EGFP en la biopsia a día 0 (**Figura 6.42 E, H**) y en el tejido no dañado a los 5 días (**Figura 6.42 F**) y a los 10 días (**Figura 6.42 I**). El PC era completamente fluorescente, fruto de la incorporación de células *Pax7* positivas y de aquellas derivadas de estas debido a la propia renovación del tejido. Sin embargo, en este ensayo a largo plazo no se observó contribución alguna al lecho de la herida por parte de estas células y su progenie en ninguno de los dos puntos de análisis (**Figura 6.42 G, J, K-L**).

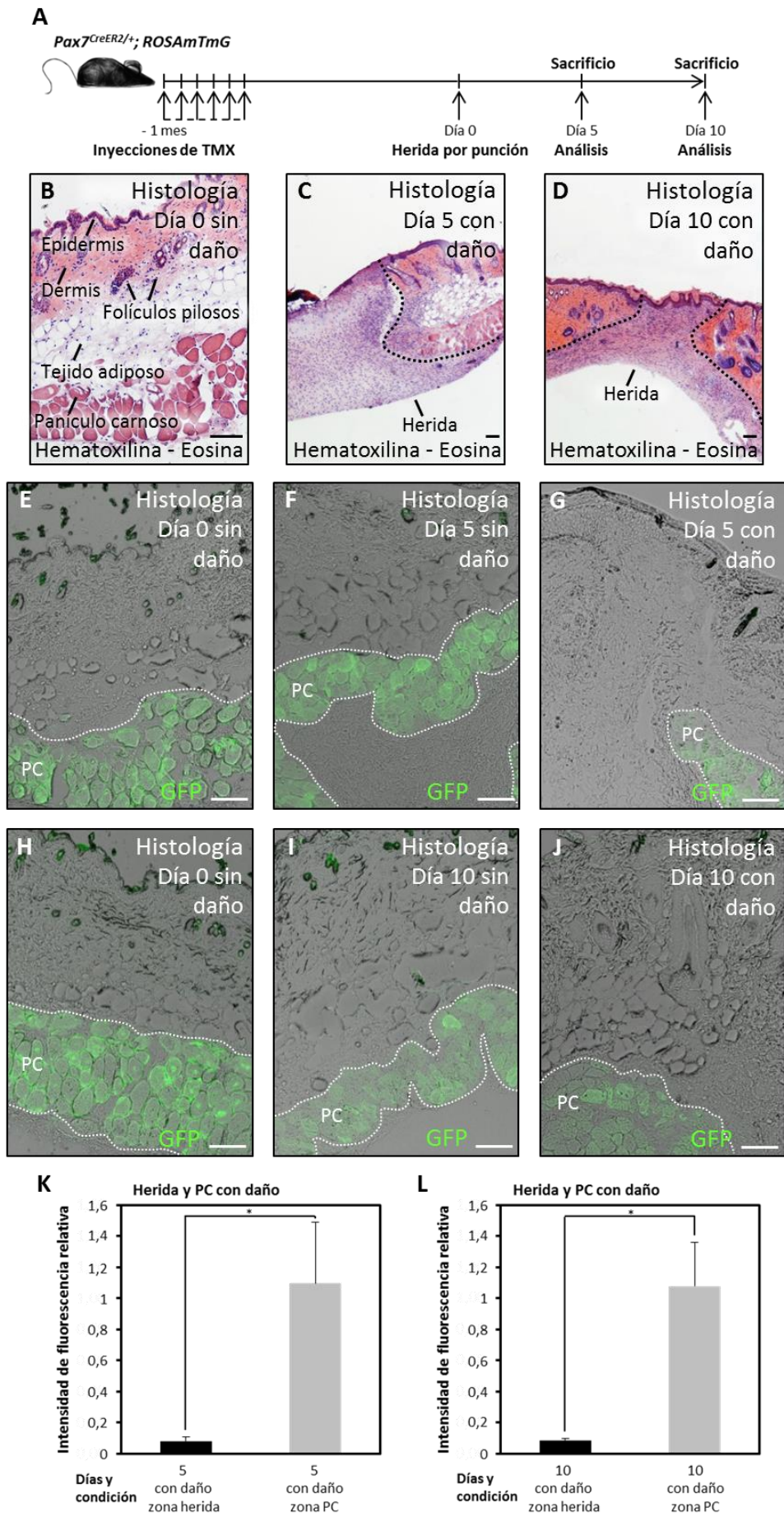


Figura 6.42. Contribución de las células satélite y su progenie al lecho de la herida durante la cicatrización a nivel histológico. **(A)** Esquema del diseño experimental donde los ratones *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG+* fueron inducidos con 1 mes de antelación a la realización de la herida por punción para ser analizados a los 5 y 10 días. **(B-D)** Secciones histológicas teñidas con Hematoxilina-Eosina del trozo de tejido eliminado a día 0 **(B)**, de la zona cicatrizando a los 5 días **(C)** y a los 10 días **(D)**. **(E-J)** Observación de la fluorescencia de la proteína reportero EGFP en cortes histológicos mostrando una zona sin daño a día 0 **(E, H)**, una zona sin daño a los días 5 **(F)** y 10 **(I)**, y una zona con daño a los días 5 **(G)** y 10 **(J)**. **(K-L)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) presente en la zona de la herida y en el área del PC delimitada por la línea de puntos. Se muestran las comparativas entre el IFR de estas dos zonas a los 5 días **(K)** y a los 10 días **(L)**. Las barras de las gráficas representan las medianas \pm desviación estándar de los valores de IFR obtenidos de entre 2 a 7 secciones independientes de las muestras analizadas de los 3 ratones. Los asteriscos representan el valor de p según $p < 0,05$ *. Las barras de tamaño en los paneles B, C, D, E, F, G, H, I y J representan 100 μ m.

Por otro lado, dado que las fibras regenerativas formadas *de novo* pueden ser distinguidas por la expresión de la forma embrionaria de la miosina MYH3 (Schiaffino *et al.*, 2015), se confirmó la existencia de numerosas fibras regenerativas nuevas en el PC en este mismo escenario experimental (**Figura 6.43 A**) a través de la detección de esta proteína por inmunofluorescencia a los 5 días y a los 10 días post-daño, siendo todas ellas a su vez derivadas de precursores que habían expresado el gen *Pax7*, marcadas por la fluorescencia de la proteína reportero EGFP (**Figura 6.43 B-C y D-E respectivamente, señalando con flechas blancas las fibras MYH3- y con puntas de flecha blancas las MYH3+**).

Estos resultados indicaron que las células satélite del PC estaban determinadas a completar la regeneración muscular frente a una herida completa de la piel, pero que al contrario que lo descrito con el trazado de linaje no inducible del gen *Pax7* (Amini-Nik *et al.*, 2011), estas células y su progenie no contribuían al lecho de la herida, por lo que no parecían jugar un papel directo promoviendo la contracción y la cicatrización de la herida, al menos a nivel celular.

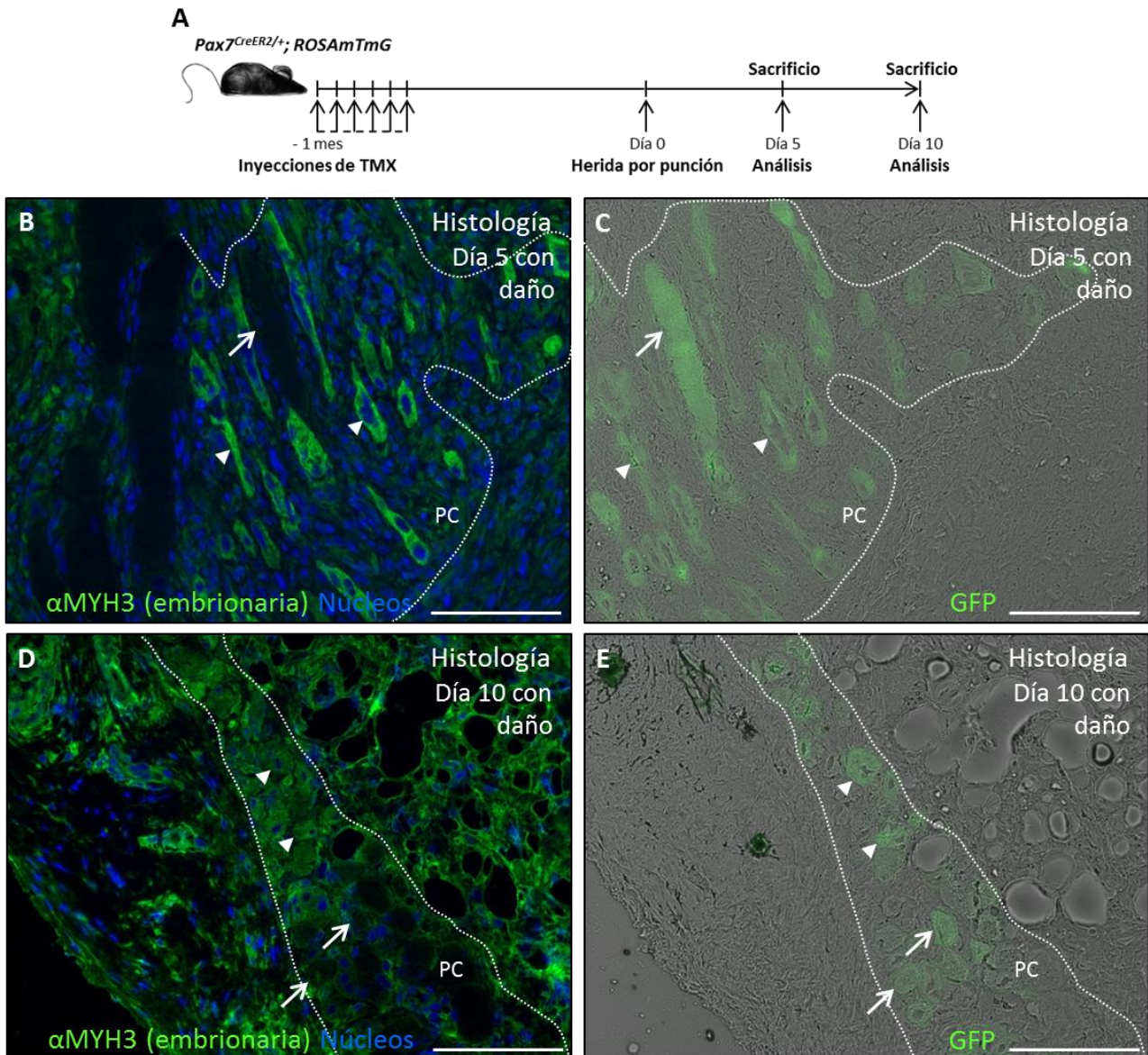


Figura 6.43. Presencia de fibras regenerativas *de novo* en el PC tras la herida. **(A)** Representación del diseño experimental donde los ratones *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG⁺* fueron inducidos 1 mes antes de producir la herida por punción para ser analizados a los 5 y 10 días. **(B-E)** Secciones histológicas de piel con daño a los 5 días **(B-C)** y a los 10 días **(D-E)** analizadas por inmunofluorescencia para la detección de la proteína MYH3 (embrionaria) **(B, D)** y las fotografías correspondientes mostrando la fluorescencia directa de la proteína reportero EGFP **(C, E)**. Se señalan con flechas blancas algunas de las fibras negativas para la expresión de MYH3 (embrionaria) y con puntas de flecha blancas algunas de las que son positivas, siendo todas ellas fluorescentes para EGFP. En los paneles B y D los núcleos fueron teñidos con Hoechst y en estos paneles y en los paneles C y E las barras de tamaño representan 100 μ m.

6.7 Traslación al humano: descripción del músculo cremáster

Una vez definido el proceso de diferenciación miogénica a partir de piel en el modelo de ratón, de haber descrito la población de precursores miogénicos responsable del mismo y de haber caracterizado el tejido muscular de origen, nos propusimos trasladar este procedimiento al ser humano.

A pesar de que muchos autores no lo consideran como vestigio del PC, el músculo cremáster se presentó como una opción adecuada por ser un músculo estriado accesible quirúrgicamente en el contexto de operaciones rutinarias realizadas en varones con patología urogenital (varicocele e hidrocele) que no afectaban de manera significativa al músculo cremáster, al menos a nivel histológico (Tanji 2000).

Se realizó una primera caracterización histológica de las biopsias para comprobar algunos datos publicados y proseguir con otros análisis de interés (**Figura 6.44, 6.45 y 6.46**). Mediante la tinción de las muestras con Hematoxilina-Eosina se observó la morfología de las fibras que presentaban un aspecto similar a las de cualquier otro músculo esquelético sano sin infiltración de tejido inflamatorio, y con presencia de algunas fibras de músculo liso (**Figura 6.44 A, recuadro y B**). Se examinó el carácter regenerativo de este tejido mediante la cuantificación de las fibras con núcleos centrales que representan a las fibras en proceso de regeneración y maduración (**Figura 6.44 C-D, círculos negros**). Aunque con cierta variabilidad entre las muestras, se obtuvo un bajo porcentaje de este tipo de fibras sugiriendo que este tejido no presentaba una tasa de renovación muy alta en condiciones normales (**Figura 6.44 D**).

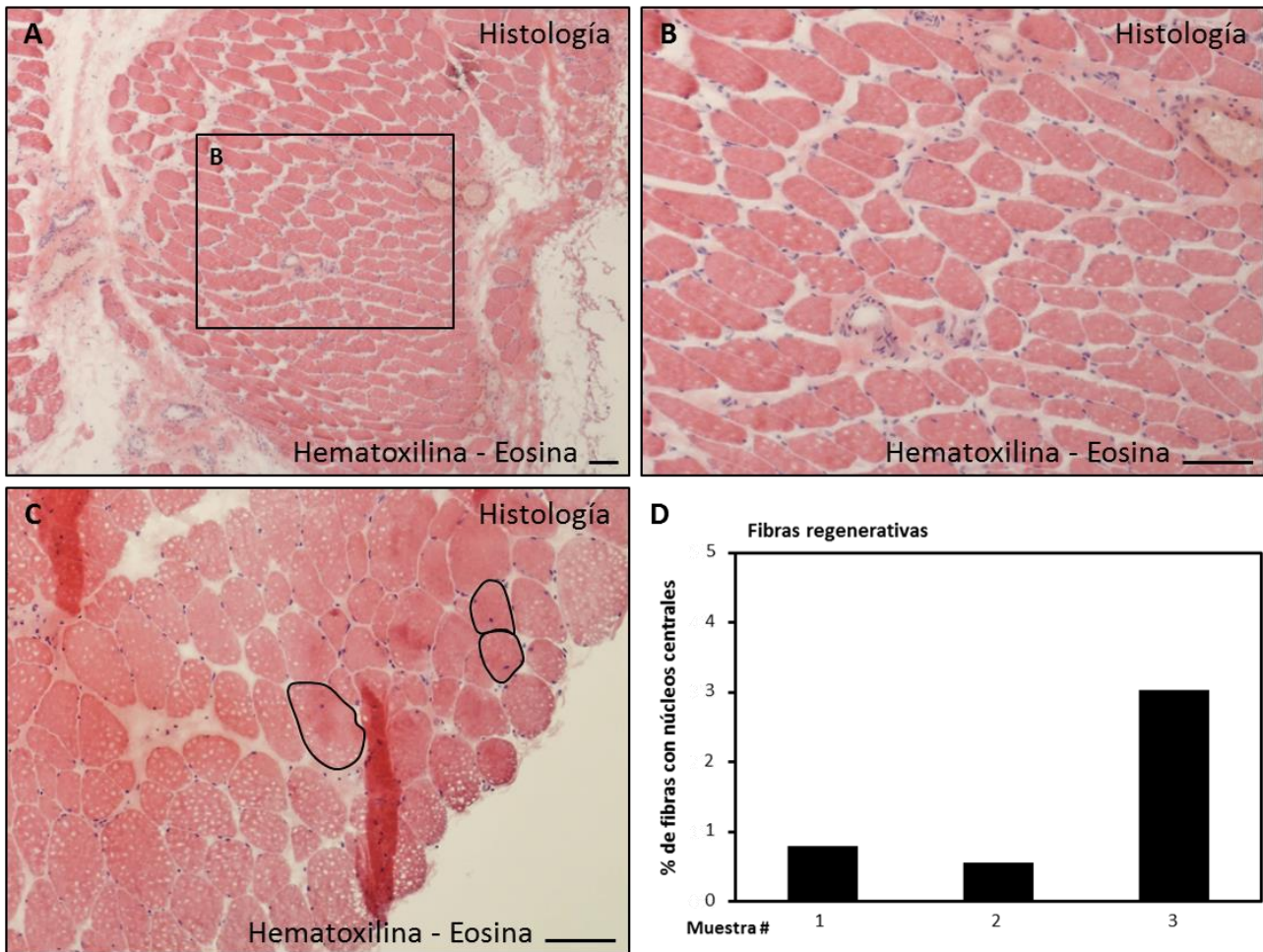


Figura 6.44. Estudio de la morfología y estado regenerativo de las fibras del músculo cremáster. **(A-C)** Cortes transversales del músculo teñido con Hematoxilina-Eosina donde se observa en detalle la morfología de las fibras **(A-B)** y la presencia de fibras con núcleos centrales resaltadas por círculos negros correspondientes a fibras en estado regenerativo **(C)**. **(D)** Gráfica donde se representa el porcentaje de estas fibras regenerativas respecto a las fibras totales realizada en tres biopsias independientes. En los paneles A, B y C las barras de tamaño representan 100 μm .

Se continuó la caracterización de este tejido con un análisis de la expresión proteica por inmunofluorescencia (**Figura 6.45 y 6.46**). Inicialmente se comprobó la expresión de la proteína estructural específica del músculo esquelético MYHC que remarcó claramente las fibras rodeadas de matriz extracelular que contenía la proteína LAMININA (**Figura 6.45 A-B**). En cuanto al tipo de fibras característico de este músculo se corroboró la predominancia de las fibras de tipo I o lentas identificadas por la expresión de la isoforma de MYHC I (fibras lentas), siendo algunas fibras positivas para la isoforma de MYHC II (fibras rápidas) del tipo II o rápidas, y no habiendo mezcla de las dos isoformas en ninguna fibra analizada (**Figura 6.45 C-F**).

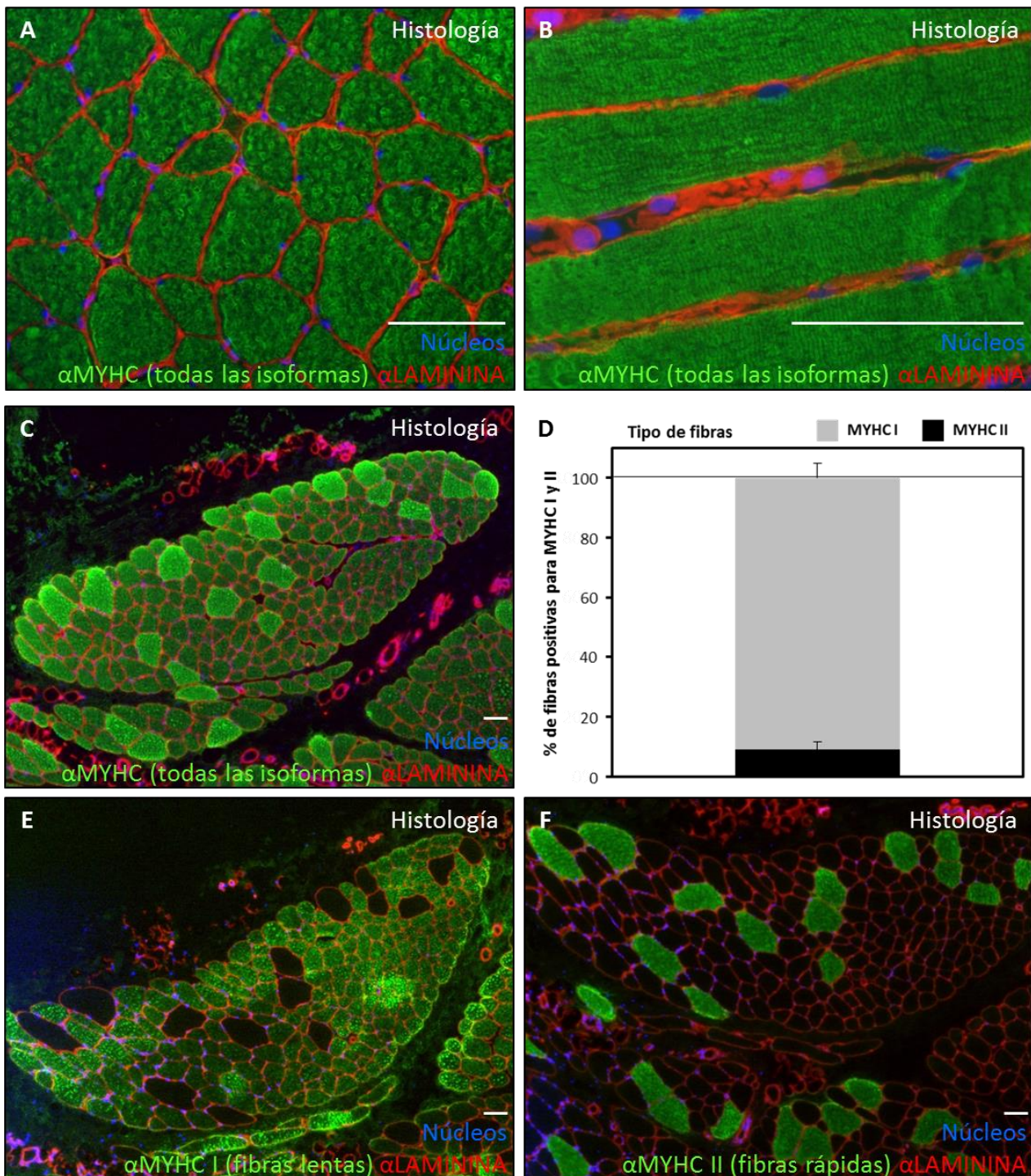


Figura 6.45. Análisis del tipo de fibras del músculo cremáster por inmunofluorescencia. **(A-B)** Detección de la proteína MYHC (todas las isoformas) (verde) junto con la detección de la proteína LAMININA (rojo) en un corte transversal **(A)** y en un corte longitudinal **(B)**. **(C-D)** Detección de la MYHC (todas las isoformas) (verde) **(C)**, de la MYHC I (fibras lentas) (verde) **(E)** y de la MYHC II (fibras rápidas) (verde) **(F)**, todas ellas junto con la detección de la LAMININA (rojo) en el mismo grupo de fibras de cortes contiguos para luego cuantificar el número de fibras de cada tipo, representando los porcentajes correspondientes en una gráfica que muestra la mediana y la desviación estándar de los valores obtenidos de 3 muestras independientes **(D)**. En los paneles A, B, C, E y F los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μm .

Asimismo, se examinó la presencia de fibras de nueva formación identificadas por la expresión de la isoforma embrionaria de MYHC, la MYH3 (embrionaria), generalmente de menor tamaño e igualmente rodeadas de matriz extracelular LAMININA positiva (**Figura 6.46 A, flechas blancas**), pero de baja frecuencia en este caso (**Figura 6.46 B**), en correlación con el número de fibras regenerativas observado anteriormente (**Figura 6.44**). En cuanto a la cantidad de células satélite presentes en este tejido se cuantificó el número de núcleos positivos para el marcador PAX7 que estuvieran localizados en su nicho rodeadas de membrana y de lámina basal LAMININA positiva (**Figura 6.46 C, flecha blanca**), diferenciándolos así del resto de los núcleos que conforman las fibras. Respecto al total de estos núcleos se obtuvo un porcentaje de células satélite del $1,82\% \pm 0,28$ (**Figura 6.46 D**), algo menos que lo establecido en otros músculos (Schmalbruch, 1976, 1977, 1985, 2006).

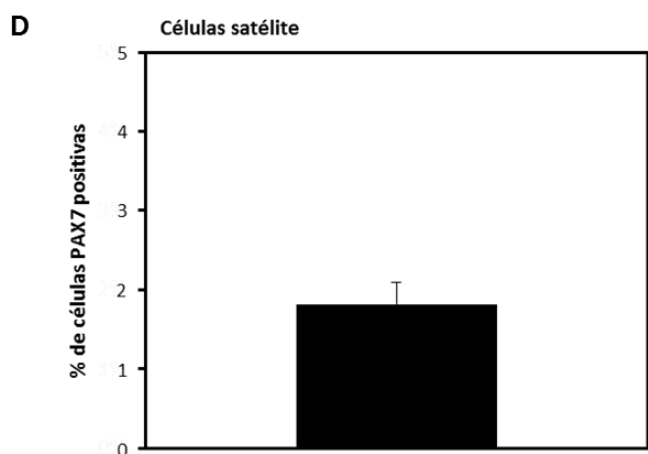
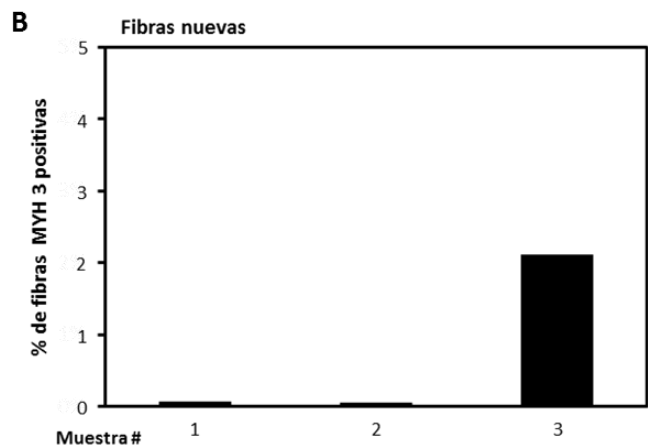
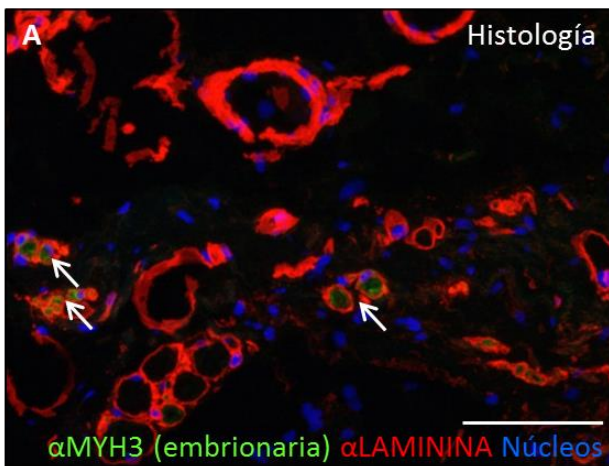


Figura 6.46. Estudio de las células satélite y del nivel de renovación del tejido cremáster por inmunofluorescencia. **(A-B)** Detección de la proteína MYH3 (embrionaria) (verde) junto con la proteína LAMININA (rojo) identificando a fibras nuevas señaladas con flechas blancas **(A)** y gráfica que muestra el porcentaje correspondiente respecto a las fibras totales cuantificado en tres muestras independientes **(B)**. **(C-D)** Identificación de las células satélite por la expresión de PAX7 (verde) y por su localización en su nicho remarcado por la expresión de LAMININA (rojo), indicada una de ellas por una flecha blanca **(C)**, y la representación gráfica de la cuantificación de estas células respecto al total de los núcleos localizados dentro de las fibras donde se muestra la mediana y la desviación estándar de los porcentajes obtenidos de 3 muestras independientes **(D)**. En los paneles A y C los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μm .

6.8 Cultivo y análisis del potencial miogénico de las células derivadas del cremáster

6.8.1 Expansión y formación de miotubos *in vitro* a partir de células derivadas del cremáster

Se evaluó el potencial miogénico *in vitro* de los precursores obtenidos de biopsias de cremáster (**Figura 6.47 A**), analizando tanto el aspecto morfológico de las células (**Figura 6.47**) como la expresión de proteínas y genes miogénicos (**Figura 6.48 y 6.49**) en distintas fases del cultivo celular.

El cultivo en suspensión al término del aislamiento presentaba un aspecto acorde con el de un cultivo de tejido recién disgregado, con algo de mortalidad celular y restos tisulares donde se apreciaban trozos musculares (**Figura 6.47 B, flecha blanca**). Tras 7 días en cultivo en suspensión, las células humanas respondieron de igual forma que las células de ratón, formando esferas de tamaños diferentes (**Figura 6.47 C**). En el cultivo en condiciones adherentes, las células comenzaron a formar miotubos a los 2 días (**Figura 6.47 D**) para terminar generando al cabo de 9 días un cultivo mayoritario de miotubos multinucleados (**Figura 6.47 E-F, flechas blancas**).

Con estos resultados se observó que las células humanas derivadas del cremáster respondían bien al protocolo establecido, formaron esferas y se diferenciaron dando lugar a un cultivo robusto de miotubos.

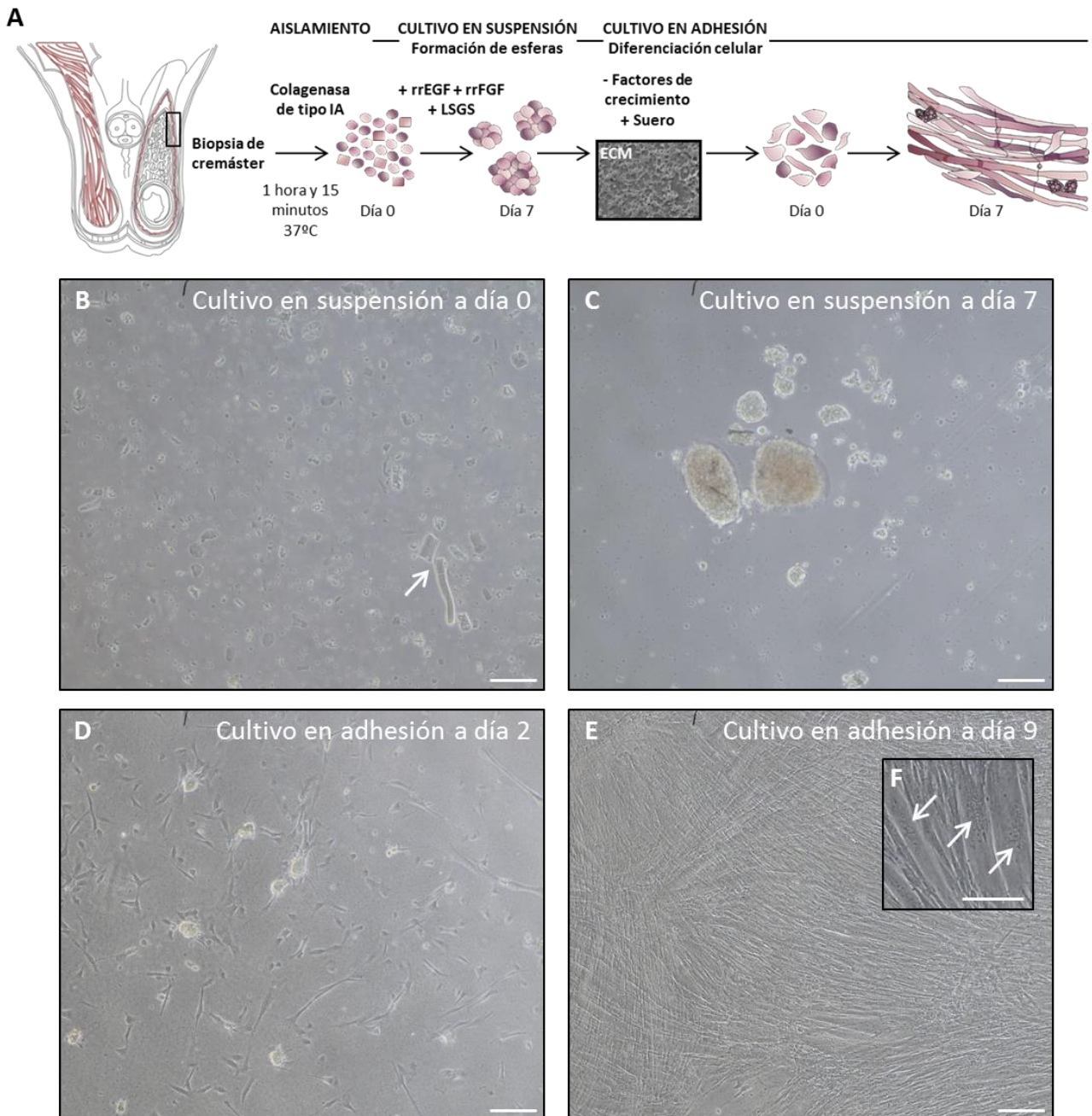


Figura 6.47. Esquema del protocolo de cultivo *in vitro* aplicado y descripción del cultivo de células humanas obtenido en las distintas fases del procedimiento. **(A)** Representación del protocolo de cultivo *in vitro*. **(B-F)** Fotografías de microscopio óptico que muestran el aspecto morfológico del cultivo celular en suspensión a día 0, donde se indican los restos tisulares con una flecha blanca **(B)**, y a día 7 **(C)**; y en adhesión a día 2 **(D)** y a los 9 días señalando los núcleos alineados con flechas blancas **(E-F)**. En los paneles B, C, D, E y F las barras de tamaño representan 100 μm .

En estos cultivos se comprobó la presencia de células miogénicas a través de un análisis de la expresión de proteínas miogénicas por inmunofluorescencia (**Figura 6.48**). A nivel del cultivo en suspensión se detectaron las proteínas miogénicas PAX7 y MIOGENINA en células que formaban parte de las esferas cultivadas durante 7 días (**Figura 6.48 A-B respectivamente**). Asimismo, en el

cultivo formado en condiciones adherentes al cabo de 9 días se detectaron células que expresaban la proteína PAX7 (**Figura 6.48 C**) y miotubos alargados positivos para la proteína estructural MYHC que resaltaba las estriaciones características de este tipo celular (**Figura 6.48 D-F, flechas blancas**).

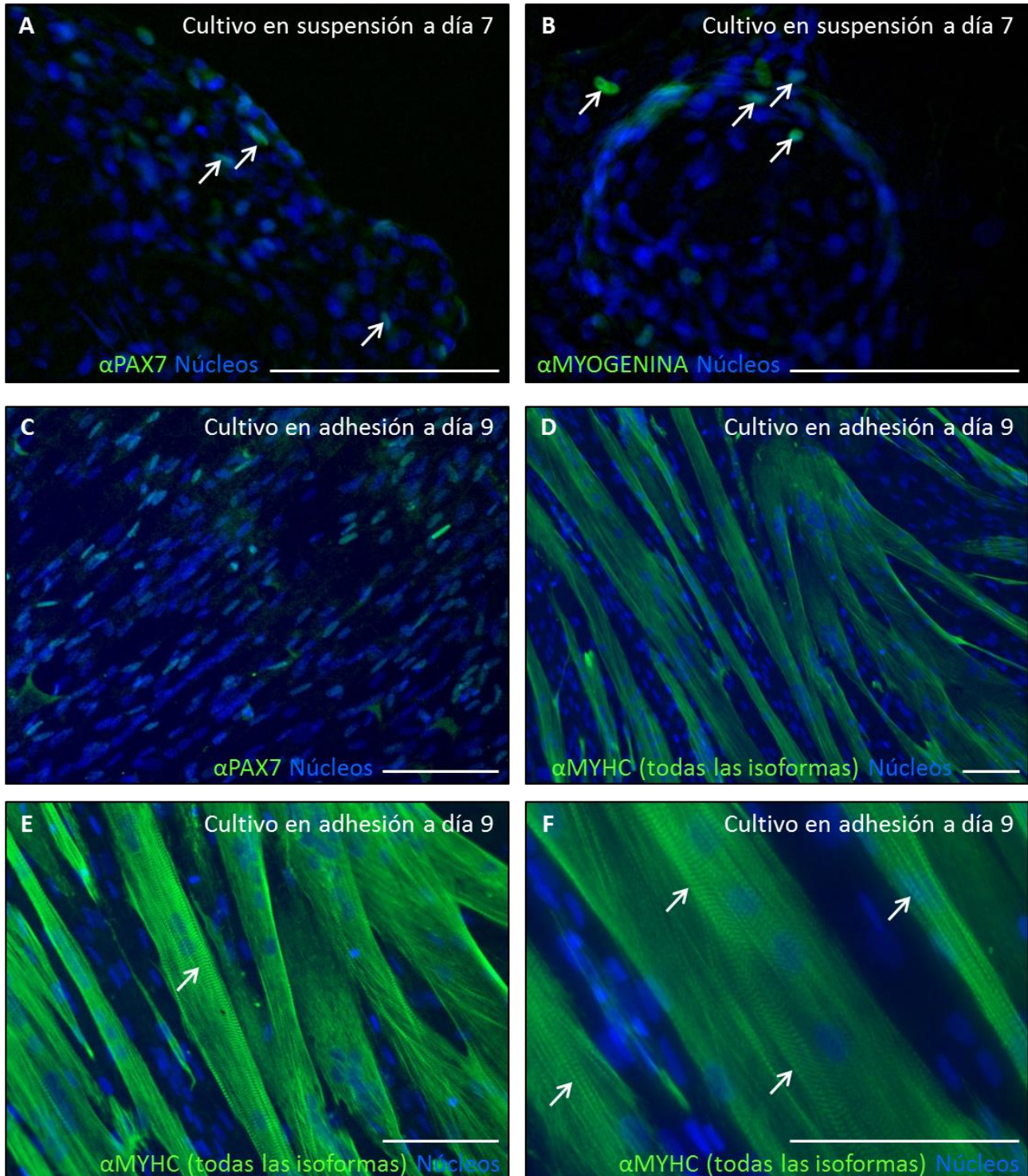


Figura 6.48. Expresión de proteínas miogénicas durante el cultivo de células derivadas de cremáster detectadas por inmunofluorescencia. **(A-B)** Esferas a los 7 días de cultivo en suspensión analizadas para la expresión de las proteínas miogénicas PAX7 (verde) **(A)** y MIOGENINA (verde) **(B)**. **(C-F)** Cultivo en adhesión de 9 días donde se detectan las proteínas PAX7 (verde) **(C)** y MYHC (todas las isoformas), que se muestra en fotografías de distinta magnitud y donde se indican las estriaciones con flechas blancas **(D-F)**. En todos los paneles los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μm .

Seguidamente se analizó la expresión de genes miogénicos mediante RT-qPCR al término del protocolo *in vitro*, en las células cultivadas durante 9 días en condiciones adherentes **(Figura 6.49)**. En este análisis aquellos cultivos no miogénicos derivados de biopsias de tejido no muscular adyacentes al cremáster sirvieron como control negativo. Todos los cultivos obtenidos a partir de muestras de cremáster expresaban los genes miogénicos *Pax7*, *Myf5*, *MyoD1*, *Miogenina*, *MyH3* y *MyH2* **(Figura 6.49 A-F respectivamente)** aunque con cierta variabilidad entre las muestras analizadas.

Con todo ello se confirmó que las células miogénicas humanas obtenidas del músculo cremáster se mantenían durante el cultivo en suspensión, para después diferenciarse y dar lugar a un cultivo miogénico en adhesión de carácter músculo-esquelético.

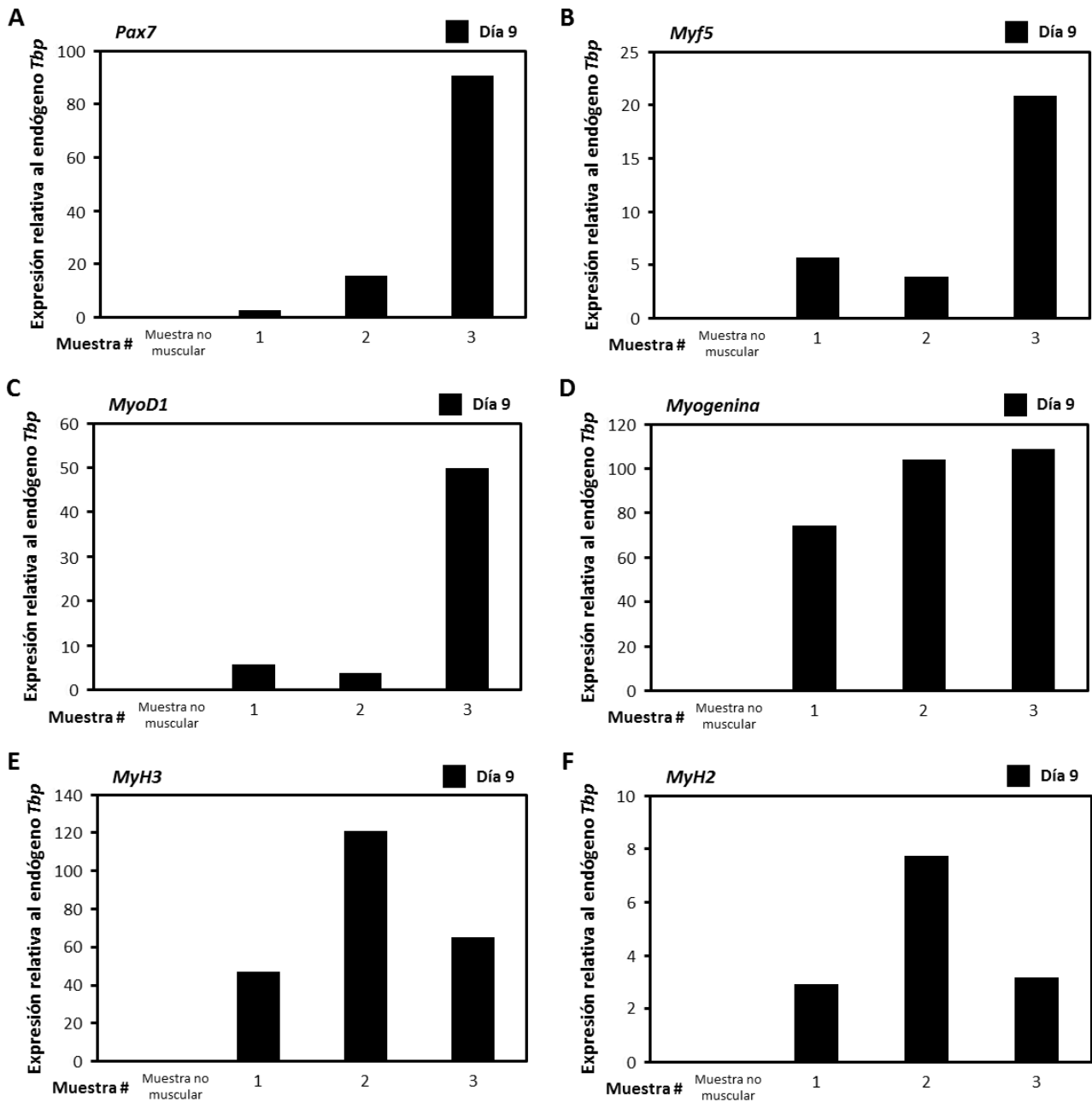


Figura 6.49. Cuantificación de la expresión de determinados genes miogénicos por RT-qPCR en cultivos adherentes de células humanas a los 9 días. Se analizó la expresión de los genes *Pax7* (A), *Myf5* (B), *MyoD1* (C), *Myogenina* (D), *MyH3* (E) y *MyH2* (F). En todos los casos se muestran los valores relativizados a la expresión del gen endógeno *Tbp* obtenidos de muestras provenientes de tres biopsias diferentes de cremáster y de tres biopsias no musculares distintas utilizadas como control negativo, representando estas últimas agrupadas en una sola columna denominada “Muestra no muscular”.

6.8.2 Potencial regenerativo de las células derivadas del cremáster en un modelo de daño muscular *in vivo*

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de utilizar las células derivadas del cremáster en futuros ensayos de terapia celular se examinó por último el potencial regenerativo de estas células en un ensayo *in vivo* de prueba de concepto (**Figura 6.50**).

En este caso se empleó un diseño experimental basado en los descritos por Darabi y colaboradores (Darabi *et al.*, 2008, 2012), en los que en el ratón *NSG* se generaba un daño en el TA de las dos patas posteriores con la inyección de CTX para al día siguiente inyectar las células a estudiar en una de las patas previamente dañadas, omitiendo el paso de la irradiación. Se realizó un análisis histológico de los TA a las 4 semanas de la administración celular (**Figura 6.50 A**). Se trataron un total de 6 ratones y en los TA del grupo experimental se localizó un número muy variable de células humanas, detectadas por su positividad para LAMINA A/C humana por inmunofluorescencia (**Figura 6.50 B-C**). Para estudiar las características funcionales de estas células, primero se analizó por inmunofluorescencia cuantas de las células humanas LAMINA A/C positivas expresaban a su vez el marcador de célula satélite PAX7, resultando en un $1,77\% \pm 0,58$ de las células (**Figura 6.50 D-F**). Después se midió la cantidad de fibras de origen humano que se habían generado durante el transcurso de la regeneración del músculo dañado a través de la detección de la DISTROFINA humana por inmunofluorescencia (**Figura 6.50 G-H**). Se observó que los valores que se obtuvieron correlacionaban aproximadamente con los valores del número de células humanas obtenidos en cada uno de los casos, es decir, cuantas más células había, más fibras se encontraban (**Figura 6.50 C y H**).

Estos resultados sugerían que estas células miogénicas humanas eran capaces de sobrevivir al trasplante y que eran funcionales, contribuyendo a la regeneración muscular.

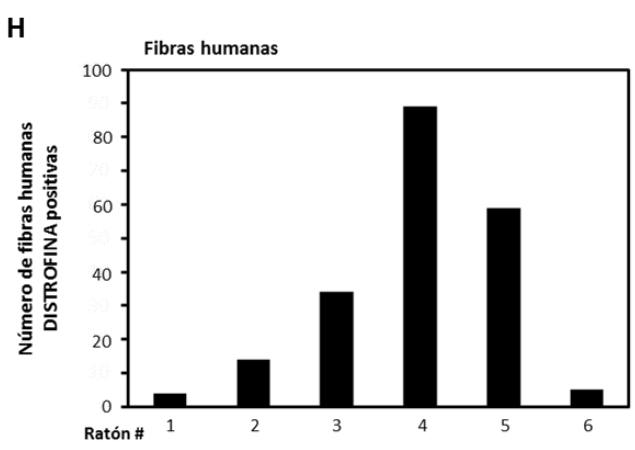
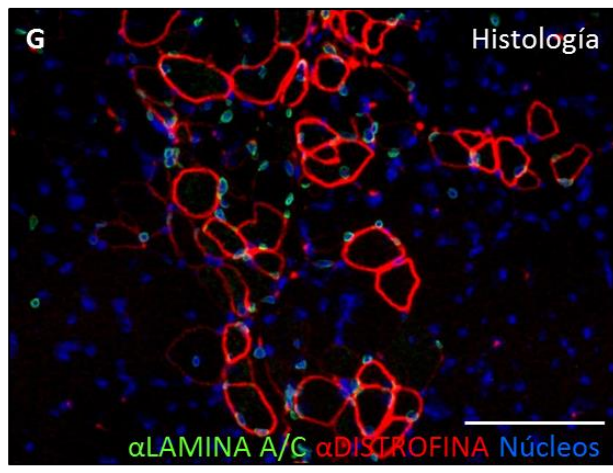
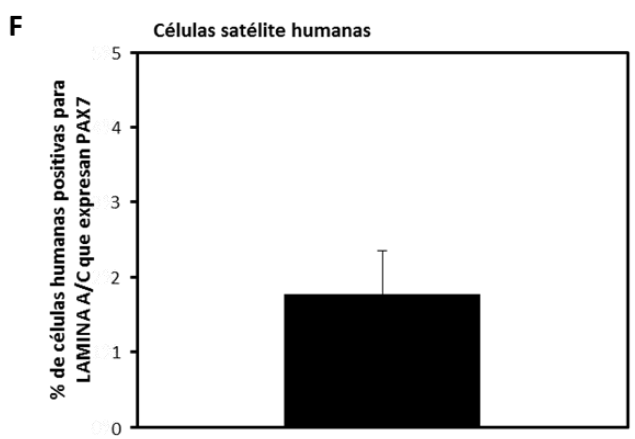
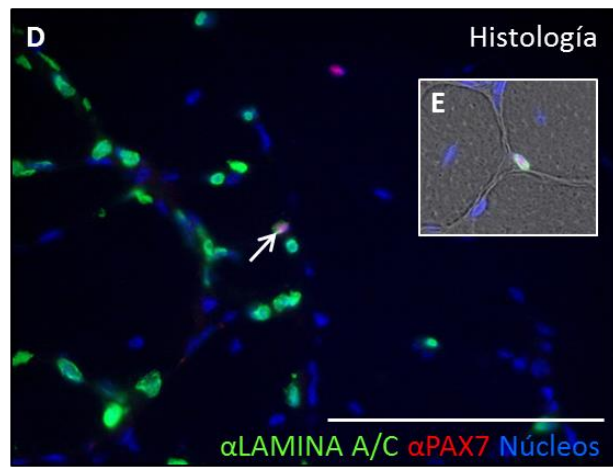
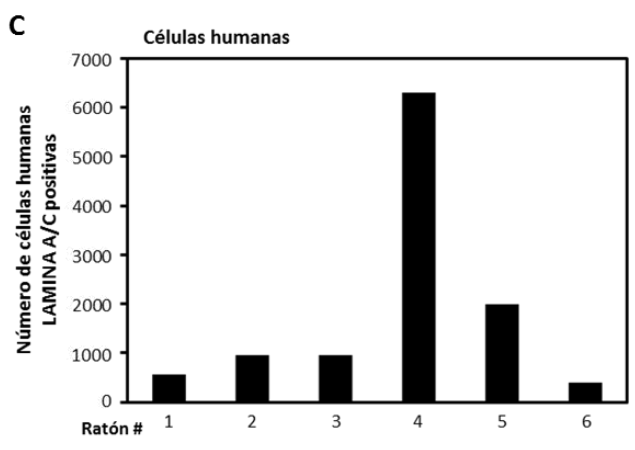
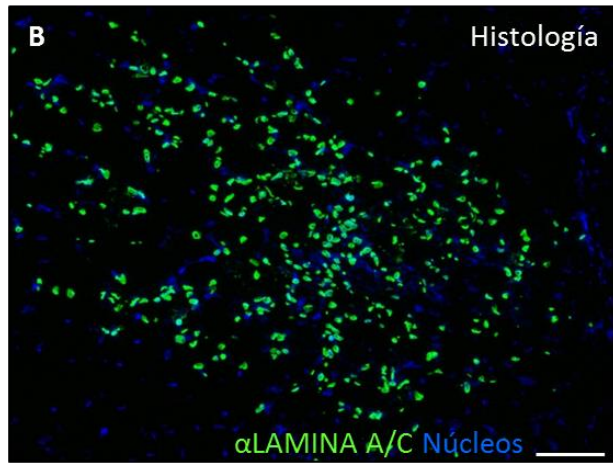
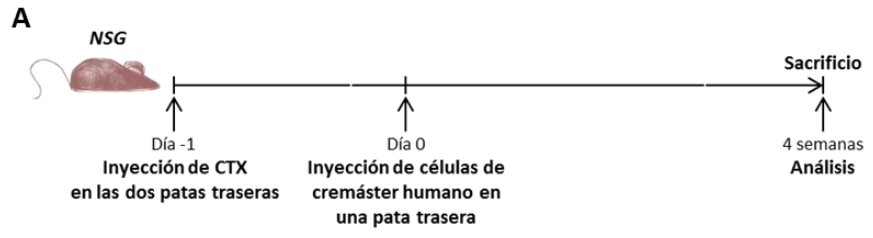


Figura 6.50. Contribución *in vivo* a la regeneración muscular por parte de células humanas derivadas de cremáster cultivadas en suspensión hasta los 7 días. **(A)** Esquema del diseño experimental utilizado donde a los ratones *NSG* se les indujo un daño muscular en las dos patas posteriores con CTX y al día siguiente se les inyectaron las células sólo en una de las patas dañadas para finalizar el experimento al cabo de 4 semanas. **(B, D-E, G)** Análisis histológico por inmunofluorescencia en cortes transversales de los músculos TA del grupo experimental. **(B-C)** Detección de la proteína humana LAMINA A/C (verde) identificando a las células humanas presentes **(B)** y gráfica donde se representa el número de células humanas detectadas en el TA de cada ratón **(C)**. **(D-F)** Detección de la proteína PAX7 (rojo) junto con la proteína humana LAMINA A/C (verde) señalada con una flecha blanca **(D)**, localizando algunas células en el nicho de las células satélite **(E)** y gráfica que muestra la mediana y la desviación estándar del porcentaje de las células humanas que son PAX7 positivas. **(G-H)** Células LAMINA A/C humana (verde) positivas junto con fibras que expresan la proteína DISTROFINA humana (rojo) **(G)** y la gráfica donde se representa la cuantificación de las fibras DISTROFINA positivas generadas en el TA de cada ratón **(H)**. En los paneles B, D, E y G los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul) y en los paneles B, D y G las barras de tamaño representan 100 μm . La barra de tamaño del panel D corresponde también como la barra de tamaño del panel E.

DISCUSIÓN

7 DISCUSIÓN

El presente trabajo se ha centrado en el desarrollo de un sistema de cultivo tridimensional donde poder estudiar la miogénesis dérmica de ratón y en la identificación de la población de precursores miogénicos residente en la piel de ratón que da lugar a músculo estriado contráctil, con vistas a una posible humanización del modelo. Mediante el protocolo empleado se han conseguido expandir los precursores miogénicos *in vitro* y se ha mejorado el método de obtención de miotubos *in vitro* en cuanto a cantidad, madurez y funcionalidad de los mismos a partir de células no modificadas genéticamente derivadas de la piel de ratón. Asimismo, se ha demostrado que las células satélite del PC son la población celular miogénica principal responsable de la formación de músculo esquelético tanto *in vitro* como *in vivo*. Este hecho subraya la importancia de identificar los precursores específicos responsables de un fenómeno dado a fin de no asumir potencialidades equívocas de los diversos precursores residentes en un tejido adulto. Sin embargo, este descubrimiento limitaba la posibilidad de trasladar esta investigación al humano, puesto que el potencial miogénico provenía de una estructura dérmica que solo está presente en humanos de manera vestigial. A pesar de ello, se quiso analizar si un músculo esquelético posible remanente del PC, el cremáster, podría tener unas características regenerativas similares y se ha propuesto como alternativa para la obtención de células madre miogénicas, evaluando su potencial miogénico tanto *in vitro* como *in vivo* y mostrando evidencias preliminares de su aplicabilidad en futuras terapias celulares.

Por otro lado, parte de los experimentos de este trabajo se han enfocado en el estudio de la fisiología del PC, definiendo su implicación durante la cicatrización, confirmando que esta estructura es un destino preferente de las células derivadas de la médula ósea trasplantada (Brazelton, Nystrom and Blau, 2003), así como determinando su origen embrionario. En consecuencia, además de ser útil para el estudio de la miogénesis, el PC permite el estudio de diversos procesos biológicos de interés.

A continuación se discuten más exhaustivamente algunos aspectos de los resultados obtenidos, de las limitaciones metodológicas y de las posibles vías futuras de este trabajo.

7.1 Método de cultivo *in vitro*

7.1.1 La variabilidad intrínseca del sistema

Teniendo en cuenta que el protocolo de cultivo empleado se divide en distintas fases en un proceso secuencial con muchas variables, es difícil saber qué parte en concreto es imprescindible o aporta una diferencia sustancial promoviendo la miogénesis, o si es el conjunto de los elementos utilizados lo que favorece la generación de miotubos estriados. Por ejemplo, los precursores miogénicos se extraen y sobreviven al proceso de aislamiento y luego se mantienen y llegan a proliferar en la primera fase de cultivo en suspensión, pero no se controla el número de células precursoras miogénicas de partida, ya que no se realiza una selección celular previa. Los factores de crecimiento utilizados en esta fase promueven la expansión de los precursores miogénicos y su determinación hacia este linaje, pero también influyen en otros tipos celulares, por lo que se da una proliferación en paralelo de otras poblaciones celulares, estableciendo un escenario de interacciones celulares múltiples que no evoluciona de manera uniforme (Carpenter and Cohen, 1979; Navre and Ringold, 1989; Serrero and Mills, 1991; Bikfalvi *et al.*, 1997; Yamada, Ikeuchi and Hatanaka, 1997). Esta complejidad inherente a las condiciones de cultivo utilizadas complica la monitorización de las señales que intervienen para identificar cuáles pueden ser más ventajosas, y puede explicar la variabilidad observada entre los experimentos realizados con diferentes muestras. No obstante, esta heterogeneidad celular en el cultivo en suspensión, aunque añade complejidad, refleja en sí misma mucho mejor la realidad tisular *in vivo* que los cultivos puros, más simples de monitorizar, pero cuyo comportamiento no recapitula lo observado *in vivo*. Los progenitores miogénicos se encontrarían rodeados de estímulos diversos y de interacciones provenientes de otras células diferentes, lo que generaría un ambiente más natural que el propio de un cultivo purificado (Rossi *et al.*, 2005). Lo mismo ocurre al cultivar las esferas en condiciones adherentes, ya que distintas poblaciones celulares responden al cambio de condiciones de cultivo y se obtiene la diferenciación de distintos linajes celulares. Al ser un proceso indeterminado que sucede por sí solo, esto deriva en diferenciaciones variables e inconstantes que directamente influyen en la reproducibilidad de los resultados. Sin embargo, como en la fase anterior, la presencia de otras poblaciones celulares podría promover la miogénesis. Las células miogénicas podrían encontrar soporte en estas poblaciones celulares de manera similar a como sucede en el músculo esquelético durante su formación o regeneración *in vivo*.

Por todo ello, comprender y ordenar esta heterogeneidad celular en cultivos tridimensionales permitiría formular sistemas de cultivo más estandarizados y más adecuados para ensayos de terapias o estudios de otros aspectos de la miogénesis que los sistemas más sencillos utilizados actualmente (Pampaloni, Reynaud and Stelzer, 2007; Edmondson *et al.*, 2014; Shamir and Ewald, 2014; Bursac, Juhas and Rando, 2015; Knight and Przyborski, 2015). En este sentido, sería interesante identificar la tipología de las células presentes que acompañan a los precursores miogénicos identificados en este trabajo. El reto para el futuro sería conseguir unas condiciones de cultivo que permitan una mayor integración de las distintas poblaciones y un desarrollo simultáneo de procesos de diferenciación de diferentes tipos celulares para tratar de elaborar un tejido artificial funcional (Achilli, Meyer and Morgan, 2012; Fennema *et al.*, 2013; Shamir and Ewald, 2014; Bursac, Juhas and Rando, 2015; Shadrin, Khodabukus and Bursac, 2016).

7.1.2 El equilibrio dinámico entre miogénesis y adipogénesis en el cultivo en adhesión

En la mayoría de las patologías musculares, los músculos afectados evolucionan a la atrofia, a la degeneración de las fibras musculares y a una infiltración grasa que sustituye y ocupa el espacio de las fibras (Marcus *et al.*, 2010; Dubowitz, Oldfors and Sewry, 2013; Biltz and Meyer, 2017). En este sentido, se desconoce en gran medida si el proceso parte de precursores adipogénicos presentes en el músculo o de una conversión de las fibras o de las células satélite en células adiposas.

Con el fin de encontrar posibles dianas terapéuticas, durante muchos años se ha tratado de averiguar la causa de dicha degeneración adiposa, la dinámica del proceso, las condiciones pro-adipogénicas y el origen celular de la grasa (Addison *et al.*, 2014; Sánchez-Gurmaches and Guertin, 2014a, 2014b; Uezumi, Ikemoto-Uezumi and Tsuchida, 2014; Hamrick, McGee-Lawrence and Frechette, 2016). En este contexto, se han descrito precursores o células adipogénicas *per se* en el tejido adulto muscular, como los precursores mesenquimales, los FAPs, las PICs y los pericitos de tipo I (Joe *et al.*, 2010; Uezumi *et al.*, 2010; Birbrair *et al.*, 2013; Pannerec *et al.*, 2013; Uezumi, Ikemoto-Uezumi and Tsuchida, 2014). Cabe señalar que se desconoce la relación entre estos precursores, si son subpoblaciones de células mesenquimales o si son la misma población celular. También ha habido interés en saber si la propia célula satélite cumple con algún papel en la acumulación de la grasa en un contexto patológico. Al igual que con otras células propuestas para

terapias celulares, es imprescindible saber si estas albergan un potencial adipogénico y conocer bajo qué condiciones podrían adoptar distintas potencialidades.

Los estudios que se han llevado a cabo en torno al origen embrionario de la grasa han demostrado que la grasa parda deriva de precursores dermomiótomas que expresan el gen *Pax7* (Lepper and Fan, 2010), que una parte de la grasa parda deriva de precursores que expresan el gen *Myf5*, y que la grasa blanca subcutánea deriva de los linajes del gen *Myf5* y del gen *Pax3*, pero al contrario, ningún adipocito es trazado a través del linaje del gen *MyoD1* (Sánchez-Gurmaches and Guertin, 2014b). Los resultados obtenidos con este último trazado de linaje descartaron la potencialidad adipogénica de las células satélite, porque a diferencia de los otros tres trazados, el gen *MyoD* no se expresa de manera temprana durante el desarrollo en estructuras o precursores del que derivan distintos tejidos, por lo que es un trazado más definido y puro (Starkey *et al.*, 2011; Sánchez-Gurmaches and Guertin, 2014a). En ese mismo trabajo de Starkey y colaboradores se mostraron evidencias a través de cultivos de fibras aisladas y de cultivos clonales de células satélite, de que estas no eran capaces de diferenciarse a adipocitos de manera espontánea, y concluían que los resultados obtenidos anteriormente por otros grupos sobre fenotipos no miogénicos de las células satélite a través de fibras aisladas de ratones WT, eran debidos a la co-purificación de progenitores intersticiales no miogénicos (Starkey *et al.*, 2011). Esta reflexión destaca la necesidad de realizar experimentos basados en trazados de linaje apropiados de la población de interés y en técnicas de cultivo adecuadas de manera conjunta, para evitar asunciones equivocadas o generalistas (Teboul *et al.*, 1995; Asakura, Rudnicki and Komaki, 2001; Shefer, Wleklinski-Lee and Yablonka-Reuveni, 2004; Starkey *et al.*, 2011). No obstante, en un trabajo más reciente, mediante el trazado inducible de *Pax7* con el que se aseguraban trazar sólo las células satélite adultas y con el uso de la técnica de las fibras aisladas como la más idónea para el estudio de las células satélite propiamente dichas, observaron que estas eran capaces de generar adipocitos en condiciones pro-adipogénicas, aunque en un bajo porcentaje (Yin *et al.*, 2013). En el mismo trabajo se describió que el mecanismo regulador clave que causa el cambio en la determinación celular sucede a través del microARN miogénico miARN-133, que reprime la expresión de *Prdm16*, un factor de transcripción crítico para la determinación del linaje adipogénico pardo (Seale *et al.*, 2007). La supresión de la expresión del miARN-133 y de la consecuente expresión de *Prdm16*, resulta en la generación de adipocitos pardos derivados de las células satélite (Yin *et al.*, 2013). Pese a ello, aún queda por confirmar si este mecanismo sucede en un contexto fisiológico o patofisiológico sin inducción

alguna. Con todo, aunque se puede considerar que las células satélite están determinadas a un linaje miogénico y que no presentan potencialidades diferentes, sigue habiendo quien defiende su metaplasia hacia el linaje adipogénico. Los resultados obtenidos en este trabajo no resuelven de manera definitiva esta cuestión, porque si bien los cultivos experimentan una senescencia y una degeneración adiposa, no podemos confirmar que ello derive de las células satélite porque en la población de partida podría haber precursores adipogénicos. No obstante, la coexistencia de las poblaciones miogénica y adipogénica observada en el cultivo descrito en este trabajo sitúa a este sistema como un posible modelo de cultivo para proseguir estos estudios.

En cuanto a la evolución y a las interacciones que se establecen entre la población miogénica y adipogénica durante el cultivo descrito en esta tesis se observa un aumento de la población adipogénica según avanza el tiempo de cultivo, concomitante con la degeneración de los miotubos, hecho que se podría considerar en semejanza a la aparición de la grasa *in vivo* con el paso del tiempo (sarcopenia) o en determinadas patologías distróficas. No obstante, en los resultados obtenidos tras reanalizar los datos referentes a la expresión cuantitativa de los genes miogénicos y adipogénicos en los cultivos adherentes a lo largo del tiempo (**Figura 6.21 C**) no se observa una clara disminución de la expresión de los genes miogénicos con un incremento simultáneo de los genes adipogénicos a más tiempo de cultivo, sino que la expresión de estos genes es muy variable a lo largo del tiempo y también entre las diferentes muestras analizadas. Tampoco la evolución de la expresión de los genes adipogénicos se incrementa con el paso del tiempo, a veces los genes adipogénicos se encuentran altamente expresados en fases iniciales del cultivo aunque a nivel celular no se haya observado una presencia masiva de adipocitos a esos mismos días de cultivo. Los resultados de expresión génica obtenidos no corresponden con el fenotipo observado, por lo que se cree que debe de haber cambios en la regulación del proceso de traducción y síntesis proteica responsables de la evolución fenotípica del cultivo. Durante el proceso de la determinación celular, los genes específicos de linajes diferentes se excluyen mutuamente, por lo que rara vez se encuentra un tipo celular que expresa a niveles significativos genes determinantes para linajes diferentes, y menos en condiciones que favorecen la diferenciación celular (Shefer, Wleklinski-Lee and Yablonka-Reuveni, 2004). Por ello, se considera que los resultados de la expresión génica por RT-qPCR obtenidos hacen referencia a poblaciones celulares diferentes y no a unas mismas células que expresan todos estos genes al mismo tiempo. En consecuencia, podría ser que las diferencias en la expresión génica fueran reflejo de una

competición espacial entre estas dos poblaciones celulares, que no es tanto debida a una evolución temporal del cultivo sino que sucede de manera continua.

7.1.3 Origen del impulso de la contracción en el cultivo en adhesión

Las contracciones de los miotubos observadas en el cultivo *in vitro* son una muestra clara del nivel de madurez de la maquinaria de contracción y de la funcionalidad conseguida. A pesar de ser un dato interesante y que resulta impactante frente a la pobreza funcional de modelos previos, el mecanismo de la contracción y la procedencia del impulso inicial no ha sido abordada en esta tesis y quedan como cuestiones a resolver en futuros trabajos.

Como hipótesis de partida se puede contemplar la opción de que estos miotubos pulsen de manera espontánea sin intervención neuronal. En este sentido, se conoce que durante la miogénesis el agrupamiento de los receptores de acetilcolina se produce previo al contacto con la neurona (Bernareggi *et al.*, 2012). De modo que la detección de estos cúmulos de receptores no implica necesariamente la presencia de una neurona. Además, es posible que otros tipos celulares presentes en el cultivo sean responsables de la síntesis de ACh, estableciendo así un circuito de señalización no neuronal (Wessler and Kirkpatrick, 2009; Beckmann and Lips, 2013). Alternativamente, existe la posibilidad de que estas contracciones fueran debidas a la interacción con alguna neurona funcional generada simultáneamente en el cultivo *in vitro*. Además de los indicios presentados sobre la presencia de células con morfología neuronal, de receptores de acetilcolina y de aparentes conexiones entre células no miogénicas y miotubos (**Figura 6.12**), hay otros factores que podrían apoyar esta hipótesis. La piel, como material de partida utilizado, es un órgano altamente innervado donde nuestro grupo ha descrito células gliales que presentan cierta capacidad de diferenciación neuronal (Etxaniz *et al.*, 2014; Iribar *et al.*, 2017). Asimismo, el propio medio de cultivo utilizado es adecuado para el cultivo de células neuronales postnatales y adultas y los factores de crecimiento añadidos durante el cultivo en suspensión promueven la supervivencia y proliferación de las células madre o precursoras neuronales (Murphy, Drago and Bartlett, 1990; Reynolds and Weiss, 1992; Yamada, Ikeuchi and Hatanaka, 1997). Adicionalmente, la ECM utilizada como soporte fue diseñada y experimentada con éxito para el cultivo neuronal y se sabe que estimula su diferenciación (García-Parra *et al.*, 2012; García-Parra *et al.*, 2013), además de que en conjunto, un protocolo similar al descrito se había empleado anteriormente en este laboratorio para el cultivo y diferenciación neuronal (García-Parra *et al.*, 2012; García-Parra *et al.*, 2013). De

modo que no se puede descartar que sea posible que se hayan obtenido neuronas funcionales *in vitro* y que se hayan podido formar uniones neuromusculares, aunque los 7 días de cultivo de diferenciación pueden ser un plazo excesivamente corto para ello.

Queda pendiente caracterizar el cultivo en mayor profundidad centrándose en realizar experimentos enfocados en este tema, y es evidente que se podrían añadir ciertos cambios pro-neurogénicos para favorecer su maduración, para que establecieran una red interconectada entre ellas y para que fueran funcionales. En caso de llegar a este punto, este protocolo se presentaría como un sistema celular sencillo para asentar la interacción funcional entre células músculo-esqueléticas y neuronas. La continuación de los estudios en esta línea generando un modelo con células humanas que fuese una base firme para un organoide mioneural (Puttonen *et al.*, 2015; Rao *et al.*, 2018), podría ser muy útil para el estudio de enfermedades musculares (distrofias musculares), de la placa motora (miastenia gravis) y de la neurona motora (esclerosis lateral amiotrófica). En este sentido, el propio PC se ha presentado recientemente como un sistema ideal para el estudio de esta última enfermedad debido a su accesibilidad, a su extensión, a la posibilidad de estudiar largas motoneuronas en localizaciones diferentes, y por el hecho de que en el modelo animal de la patología, el ratón SOD1, la degeneración axonal se detecta antes en los axones más largos del nervio torácico lateral que inervan al PC que en el nervio ciático (Tallon *et al.*, 2016).

7.2 Identificación de los precursores miogénicos de la piel de ratón

7.2.1 Trazado de linaje de *Myf5^{CreSOR}* versus *B195AP^{Cre}*

Para identificar el origen de los precursores miogénicos se trató de probar si había células miogénicas derivadas del dermomiótomo dentro de las células aisladas de la piel. Para ello se utilizó la expresión del gen *Myf5* como conductor de su trazado de linaje. Inicialmente, se empleó la línea transgénica *Myf5^{CreSOR}* (Tallquist and Weismann, 2000), un modelo de ratón utilizado por varios grupos para estudiar la función de este gen y la participación de las células marcadas por su expresión durante el desarrollo miogénico (Kuang *et al.*, 2007; Günther *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha descrito que el trazado que se realiza con este ratón no está delimitado únicamente al linaje miogénico, sino que es posible que este gen se exprese de manera no específica en otros tejidos y que también se exprese a destiempo durante el desarrollo (Matthaei, 2007). Por un lado, se

sospecha que la eliminación de parte de la región no traducida 5' del gen *Myf5* al integrar la recombinasa Cre en su locus afectaría a su compleja regulación genética. Por otro lado, hay datos que sugieren que el promotor del gen *Myf5* podría tener una actividad transitoria en el mesodermo paraxial cerca del día 8 embrionario (E8), hecho que explicaría la presencia de células derivadas de dicha progenie (Gensch *et al.*, 2008). Por todo ello, si bien esta cepa de ratón ayudó a probar la implicación del linaje miogénico en el desarrollo de miotubos estriados *in vitro*, fue necesario contrastar los resultados con el uso de otra cepa de ratón que trazaba bajo la expresión del mismo gen *Myf5*, pero con mayor especificidad, la línea transgénica *B195AP^{Cre}* (descrita en esta tesis doctoral). Esta diferencia entre ambas cepas se debe principalmente a que el constructo utilizado para generar la segunda se basa en el cromosoma artificial de bacteria BAC195, que contiene todos los elementos reguladores descritos para este gen, y a que la recombinasa Cre se encuentra integrada en el codón de inicio ATG del gen *Myf5*, sin eliminar ninguna secuencia (Carvajal, Cox, Summerbell and Rigby, 2001; Carvajal, Keith and Rigby, 2008). Gracias a estos cambios se obtiene un trazado del gen *Myf5* más definido y más limitado a los linajes derivados del dermomiótomo, tal y como se puede observar en los resultados de esta tesis.

7.2.2 Valoración de la capacidad miogénica de las fracciones negativas de los trazados de linaje

Las estrategias basadas en los ratones transgénicos han proporcionado una poderosa herramienta para investigar la función génica *in vivo* y para estudiar la implicación de poblaciones celulares en distintos procesos biológicos importantes. Sin embargo, como todas las aproximaciones experimentales, la transgénesis presenta algunas limitaciones a tener en cuenta al analizar los datos obtenidos. Las líneas ideales son aquellas que combinan una especificidad exquisita con un alto nivel de expresión, dando una lectura precisa de la actividad de la recombinasa Cre mediante la activación del gen reportero que se expresa de forma ubicua (Rossant and McMahon, 1999). En algunas cepas, la Cre muestra una actividad generalizada cuando el alelo que lo contiene se hereda maternalmente, dando una expresión o una señal difusa y no específica en crías no transgénicas, fenómeno que no se observó en las líneas transgénicas utilizadas en este trabajo (**Figura 10.5**) (Matthaei, 2007; Heffner *et al.*, 2012). Es importante señalar que el locus específico del linaje es transcripcionalmente más activo y puede haber diferencias en los niveles de expresión del linaje específico frente a la expresión del gen reportero ubicuo, y también entre diferentes promotores de los genes reporteros. Por ejemplo, el promotor CAG produce un mayor

nivel de expresión que el promotor endógeno ROSA26 que se utilizó en los experimentos de este trabajo (Chen *et al.*, 2011; Sambasivan *et al.*, 2013). Además, solamente las células que han alcanzado un umbral apropiado de la expresión de la proteína Cre pueden activar la expresión del reportero (Ma, Zhou and Pu, 2008). Estas limitaciones podrían explicar la aparición de unos pocos miotubos en la fracción negativa del trazado de linaje del *B195AP^{Cre}; R26YFP* (Figura 6.33 D-E), aunque también podrían ser generadas por células no miogénicas inducidas a esa diferenciación por la señalización del entorno (Sambasivan *et al.*, 2011; Sirabella, Angelis and Berghella, 2013).

En la misma línea, la tecnología de los ratones transgénicos inducibles permite tener el control espacial y temporal del sistema. Más allá de los ajustes necesarios relacionados con la dosis del fármaco inductor, los métodos de aplicación y el tiempo de tratamiento, la eficacia de la recombinación de la proteína de fusión puede variar en diferentes áreas del tejido, resultando en el mosaicismo genético. Además, el sistema puede tener una actividad débil no deseada independiente de la presencia de la sustancia inductora (Günschmann *et al.*, 2014). Estos inconvenientes podrían explicar la variabilidad en el porcentaje de células derivadas del trazado de linaje inducible del *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG* (Figura 6.31 D) y la diferenciación miogénica minoritaria que se observó en la fracción negativa de este mismo trazado (Figura 6.33 G-H), aunque esta diferenciación podría ser debida a la inducción miogénica de alguna población celular no miogénica causada por el contacto con las células satélite o su progenie o por las señales del cultivo (Sambasivan *et al.*, 2011; Sirabella, Angelis and Berghella, 2013).

7.2.3 Expresión de marcadores de superficie por las poblaciones celulares de interés

El aislamiento de las poblaciones celulares es una herramienta poderosa para investigar su biología y evitar la contaminación por otros tipos de células que podrían afectar a los resultados. Por lo tanto, establecer marcadores celulares específicos para aislar la población de los precursores miogénicos de la piel resultaba de gran interés para su caracterización. Por el análisis realizado de las células cultivadas en suspensión se creía que lo más probable era que los precursores miogénicos conformaran una población heterogénea de células en estados de diferenciación diferente. Sin embargo, de cara a la posibilidad de utilizarlas en futuras terapias celulares, las más útiles serían aquellas que mantuvieran características más parecidas a las células madre y estuvieran en un estado más indiferenciado. A lo largo de estos años han sido descritos muchos

marcadores de superficie que definen a las células satélite, tanto quiescentes como activadas, y las células derivadas de ellas, pero, se desconocía la expresión de marcadores de superficie de las células miogénicas derivadas de la piel en esferas. Por ello, sin ir directamente a aislar la población de interés con los marcadores conocidos disponibles, se realizó un cribado para analizar una gran cantidad de marcadores de superficie al mismo tiempo en las fracciones celulares cultivadas en suspensión de los trazados de linaje *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* y *Cspg4^{Cre}; R26YFP*. Sorprendentemente no se desmarcaron marcadores de expresión relacionados con precursores miogénicos en la fracción positiva del linaje del *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* en comparación con las otras fracciones consideradas como no miogénicas (**Figura 6.35 B**). El amplio trazado de la cepa *Myf5^{CreSOR}* y la posibilidad de que los marcadores de expresión miogénicos quedaran diluidos entre el resto por referirse a una población minoritaria en esa fracción pueden explicar este inesperado resultado. Retrospectivamente pensamos que tal vez hubiera sido más adecuado utilizar un trazado que delimitara mejor la población miogénica como el *B195AP^{Cre}* o el *Pax7^{CreER2/+}*, cepas de las que no se disponía en el momento de realizar este experimento.

Aun así, y teniendo en cuenta estas limitaciones, se seleccionó el marcador SYNDECAN-4 para los experimentos de separación celular. El SYNDECAN-4 es una proteína transmembrana descrita como marcador de células satélite (Cornelison and Filla, 2001; Cornelison *et al.*, 2004; Fukada *et al.*, 2013) y usado como marcador positivo para aislarlas (Tanaka *et al.*, 2009). Sin embargo, tampoco en estos experimentos se obtuvieron resultados satisfactorios ya que se observó una pequeña formación de miotubos en las fracciones negativas para la expresión de SYNDECAN-4 (**Figura 6.36 D y H**). Aunque se ha descrito el aislamiento de células miogénicas utilizando un solo marcador, la α 7-integrina (Blanco-Bose *et al.*, 2001), la mayoría de los grupos utilizan una combinación de marcadores negativos, en general los mismos, y de marcadores positivos que difieren dependiendo del laboratorio (Fukada *et al.*, 2013). Probablemente al basar el aislamiento de la población de interés en un único marcador de expresión no se englobara a toda la población o puede ser que tras varios días de cultivo no todas las células precursoras miogénicas expresasen SYNDECAN-4 (Cornelison and Filla, 2001), o al menos, que no todas lo expresasen al mismo tiempo. Para estar seguro de aislar específicamente a la población de interés es deseable utilizar una combinación de diferentes marcadores negativos y positivos (Danoviz and Yablonka-Reuveni, 2012; Gromova, Tierney and Sacco, 2015; Maesner, Almada and Wagers, 2016). Por otro lado, siempre queda la

posibilidad de que la fracción negativa involucre a una población celular no miogénica que puede diferenciarse en miotubos (Sirabella, Angelis and Berghella, 2013).

7.2.4 Agrupamiento de las poblaciones celulares en base al transcriptoma

El marcador de SYNDECAN-4 se prosiguió utilizando para la separación celular en otros trazados de linaje con la esperanza de que acertando en el trazado específico adecuado se conseguiría identificar a la población miogénica, o al menos definir en cuál de las fracciones se encontraba. En estas poblaciones separadas se analizó todo el RNA mensajero transcrito de forma global para compararlo con los datos transcriptómicos publicados por otros trabajos.

Después del análisis de PCA, las poblaciones consideradas miogénicas no se agrupaban conjuntamente, sino que formaban parte de una imagen más dispar de lo que se esperaría en un principio. Ninguna de las poblaciones celulares separada, incluida la del trazado de linaje del gen Pax7, se agrupaba junto con las células satélite y muchas se relacionaban con poblaciones no miogénicas *per se* (**Figura 6.37 A**). Hay que tener en cuenta que los datos que se compararon se obtuvieron de poblaciones celulares de diversa índole, que se encontraban en distintas condiciones experimentales y que provenían de cepas de ratones diferentes (**Tabla 10.4**). Como ejemplo, teniendo en cuenta una de las variables que influyen en el estado celular y que mayor relevancia tiene en los resultados ulteriores, las condiciones de cultivo, las poblaciones celulares utilizadas en este trabajo se encontraban en condiciones de cultivo no adherentes a día 7, mientras que muchas de las poblaciones celulares de las bases de datos eran células directamente obtenidas mediante separación por citometría a partir de un tejido base. Con todo, esta comparativa y estos datos fueron válidos como guía para entender la naturaleza de las poblaciones celulares analizadas.

En cuanto al agrupamiento jerárquico que resultó de la comparación de las muestras obtenidas en este laboratorio (**Figura 6.37 B**), el agrupamiento cercano de las fracciones SYNDECAN-4 negativas y SYNDECAN-4 positivas dejó entrever no sólo que probablemente no se estuviera separando la población miogénica en base a este marcador, sino que probablemente tampoco se expresaba de manera específica en la población miogénica (Elenius and Jalkanen, 1994). Por tanto, parece ser que ni en la fracción SYNDECAN-4 positiva hay sólo células miogénicas, ni en la fracción SYNDECAN-4 negativa hay sólo células no miogénicas, intuyéndose a partir de los resultados obtenidos que en ambas fracciones hay una mezcla de poblaciones celulares. Por otro

lado, la población *B195AP^{Cre}; R26YFP+ SYNDECAN-4-*, aunque se agrupaba de manera separada de aquellas asociadas bajo las líneas rojas, remarcando una mayor diferencia respecto a ellas, más tarde se analizó conjuntamente dentro del grupo denominado “Poblaciones miogénicas seleccionadas” para los análisis posteriores. Esta diferencia se tuvo en cuenta a la hora de realizar el experimento *in vivo*, donde se utilizó este trazado de linaje como uno que definía mejor la población miogénica de interés.

Por último, el análisis transcriptómico fue útil para comprobar que los genes miogénicos transcritos se encontraban en las fracciones y bajo los linajes esperados, descartando la contribución del linaje de *Cspg4^{Cre}; R26YFP* positivo, población que sirvió como control negativo de expresión de genes miogénicos, y corroborando así los datos obtenidos a nivel de cultivo celular.

Estos resultados dejaron un escenario algo confuso, que al fin quedó aclarado a través del experimento de la eliminación de la población celular que expresaba el gen *Pax7*, implicando directamente a la población de las células satélite en la miogénesis observada *in vitro* (**Figura 6.38**).

7.2.5 Participación de otras poblaciones celulares de la piel en la miogénesis *in vitro*

En relación al proceso de la regeneración muscular, hay claras evidencias en la literatura así como en este propio trabajo, por las que se asume que ninguna otra célula por sí sola más que la célula satélite es capaz de regenerar el músculo esquelético en el adulto. La potencial capacidad miogénica de otras células depende de la presencia de las células satélite y se reduce a las respuestas generadas por las instrucciones recibidas por estas (**Figura 6.38**) (Lepper, Partridge and Fan, 2011; Murphy *et al.*, 2011; Sambasivan *et al.*, 2011). No obstante, la contribución de otras poblaciones celulares a la regeneración muscular tendría implicaciones terapéuticas directas, por lo que en los últimos años se han realizado muchos esfuerzos en estudiar este proceso en profundidad (Negróni *et al.*, 2015).

En este sentido, se han publicado diversos trabajos sobre la generación muscular a partir de células residentes de la piel. En estos trabajos, sin embargo, se muestran varios conceptos que pueden inducir a confusión. La conversión miogénica de los fibroblastos sólo se ha observado en células embrionarias o neonatales, por lo que este cambio de linaje puede deberse a la mayor plasticidad de estas células en comparación con aquellas obtenidas de tejidos adultos (Lanza,

Langer and Vacanti, 2011). Además, en ninguno de los trabajos que refieren esta conversión se ha realizado una caracterización exhaustiva de los fibroblastos, de modo que se desconoce la naturaleza real de estas células. Aunque en algunos trabajos se realiza un raspado de la piel para eliminar los posibles tejidos musculares adyacentes a la hipodermis (Relvas *et al.*, 1997; Goldring, Jones and Watt, 2000; Goldring *et al.*, 2002), en nuestra experiencia es prácticamente imposible eliminar el PC en su totalidad mediante este método. Por otro lado, los fibroblastos obtenidos de músculo esquelético no presentan las mismas capacidades miogénicas que los obtenidos de piel en los mismos experimentos. Esto puede ser debido al método de aislamiento empleado, que es distinto en los dos casos. Mediante la técnica del explante utilizada con las muestras de piel es posible que también migren otras poblaciones celulares con posible potencial miogénico y que a través del procedimiento de la adhesión diferencial empleado en el caso de las muestras musculares se obtenga un cultivo más puro de fibroblastos. Los fibroblastos de piel no son capaces de formar miotubos por sí solos ni con medio inductivo o condicionado. En muchos casos donde se señala la conversión miogénica de estas células *in vitro* se obtienen cultivos pobres que no presentan una morfología muscular y que tampoco se han caracterizado en profundidad mediante los diversos marcadores miogénicos. En general, los resultados obtenidos, de atribuirlos a fibroblastos puros, denotan en realidad claros eventos de fusión más que una conversión miogénica eficiente.

La población celular específica de la dermis CD34+ Sca-1+, llamada *side population* y descrita como una población celular distinta a las células satélite con capacidades miogénicas (Montanaro *et al.*, 2003), podría no ser una población celular independiente debido a que es posible que no se haya eliminado todo el PC mediante el raspado. Esta *side population* podría ser una subpoblación de las propias células satélite, tal y como se describieron en el músculo años más tarde (Tanaka *et al.*, 2009), y en ese caso no se estaría hablando de una contribución miogénica alternativa, sino que se estaría remarcando la heterogeneidad celular que existe dentro de la población de las células satélite.

La contribución miogénica de las células de la papila dérmica queda devaluada por la falta de un ensayo en monocultivo en el que se aprecie este potencial miogénico de manera fiable (Rufaut *et al.*, 2006). También se había definido la población miogénica de la piel como la Sca-1 negativa específica de la dermis, ya que en estos experimentos se eliminaba el PC previamente mediante un raspado (Wakabayashi *et al.*, 2010). Sin embargo, como ha quedado dicho, en nuestra

experiencia es casi imposible asegurar que mediante un raspado mecánico se pueda retirar totalmente la capa de panículo carnoso y discriminar así la participación de las células derivadas de este tejido. Para esta situación, un método enzimático podría ser una alternativa más segura y fiable.

En el caso de las células de piel humana, los datos reportados muestran una miogénesis muy poco eficiente, no llegándose a observar miotubos multinucleados, de modo que sería necesario profundizar en el tema realizando más experimentos para determinar si existe realmente alguna población miogénica en la piel humana (Somuncu *et al.*, 2016).

Asimismo, en los resultados presentados en este trabajo no se observó una contribución a la generación del propio PC y tampoco a la miogénesis *in vitro* por parte de las células del linaje del gen *Cspg4*, marcador ampliamente utilizado para definir los pericitos (Ozdem and Grako, 2001; Zhu, Bergles and Nishiyama, 2008; Armulik, Genové and Betsholtz, 2011), a los cuales se les atribuye una gran plasticidad y una participación en la miogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* (Dellavalle *et al.*, 2011; Kostallari *et al.*, 2015), aunque su plasticidad *in vivo* se considere ahora con ciertas reservas por los datos recientemente publicados (Guimarães-Camboa *et al.*, 2017). Es posible que esta aparente contradicción entre los datos *in vitro* publicados y los observados en este trabajo se deba al método de aislamiento y las condiciones de cultivo utilizadas. Podría ser que en nuestro sistema de cultivo los pericitos se diferenciase siguiendo su propia naturaleza. También puede ser que los pericitos de la piel sean diferentes a los pericitos aislados de los músculos y no tengan o no adquieran un potencial miogénico.

Por otro lado, habría una posibilidad de que células de la piel que tuvieran una baja expresión del gen *Pax3*, como los SKPs (Toma *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2004), pudieran contribuir ligeramente a la formación de miotubos *in vitro* (**Figura 6.34**) (Qiu *et al.*, 2010), ya que se espera que las células derivadas de las células satélite se agrupen en la fracción *Pax3* negativa (**Figura 6.26 D**). En este sentido, hay que tener en cuenta que los SKPs son una población celular heterogénea e indefinida y que se desconoce cuál es la naturaleza de la población celular que expresa *Pax3*. En la piel también las células de Schwann y las células madre del folículo piloso exhiben una leve expresión de *Pax3* (Djian-Zaouche *et al.*, 2012), pero no está descrito que presenten un potencial miogénico. Por lo tanto, es necesario realizar más experimentos para llegar

a concretar la identidad de esta población celular que presenta una baja expresión del gen *Pax3* y que conserva cierto potencial miogénico.

Además de estas células, también podría haber en el PC células residentes descritas en otros músculos esqueléticos a las que se les atribuye un potencial miogénico *in vitro* y en ensayos *in vivo*, tales como las PICs, la *side population*, las CD45+ y las CD133+ (Gussoni *et al.*, 1999; Asakura *et al.*, 2002; Polesskaya, Seale and Rudnicki, 2003; Benchaouir *et al.*, 2007; Torrente *et al.*, 2007; Mitchell *et al.*, 2010; Pannerec *et al.*, 2013). Del mismo modo, se pueden encontrar en la piel y en los músculos esqueléticos precursores mesenquimales, un grupo heterogéneo de células madre que estimulan la regeneración del tejido de manera paracrina (Kalinina *et al.*, 2011; Klimczak and Kozłowska, 2016). Es posible que una subpoblación contribuya a la regeneración muscular adulta, tal y como sugieren los recientes resultados sobre los progenitores del linaje del gen *Twist2* (Liu *et al.*, 2017). De ser así, habría que evaluar la contribución de estas poblaciones celulares a la miogénesis dérmica tanto *in vitro* como *in vivo*, idealmente mediante trazados de linaje inducibles y a través de ensayos de depleción celular, además de por los clásicos experimentos de trasplante celular, para así poder determinar si realmente las células satélite son sustituibles en un contexto terapéutico.

Por último, hace años se demostró que las células progenitoras de la médula ósea pueden llegar a través de la circulación periférica a un músculo dañado para participar en su reparación (Ferrari *et al.*, 1998). Sin embargo, la capacidad de reparación de estas células resultó ser muy escasa (Gussoni *et al.*, 1999; Ferrari, Stornaiuolo and Mavalio, 2001; Ferrari and Mavilio, 2002; LaBarge and Blau, 2002; Camargo *et al.*, 2003; Corbel *et al.*, 2003; Sherwood *et al.*, 2004; Price, Kuroda and Rudnicki, 2007; Sienkiewicz *et al.*, 2015). En este sentido, la alta frecuencia de incorporación de las células derivadas de la médula ósea en el PC en ausencia de daño resulta intrigante (Brazelton, Nystrom and Blau, 2003) (**Figura 6.40 B**). No está clara la relevancia fisiológica de este fenómeno y se desconocen las razones por las que se da esta incorporación tan llamativa, pero probablemente se deba a la naturaleza del propio músculo PC, ya que la frecuencia es bajísima en el resto de los músculos analizados (Brazelton, Nystrom and Blau, 2003). En este punto se podría hipotetizar que pudieran estar sucediendo dos cosas no excluyentes: por un lado, que se diera un reclutamiento de las células similar en todos los músculos, pero que las células se insertaran en mayor medida en el PC mediante eventos de fusión por su alta tasa de renovación (Brazelton, Nystrom and Blau, 2003), o bien que el PC emitiera una señalización específica o más potente para

el reclutamiento de estas células. Si el fenómeno subyacente a este reclutamiento tuviese como causa el mayor potencial regenerativo del PC, esto significaría que estas células no serían muy útiles a la hora de reparar el músculo esquelético, pero si la causa fuese una señalización especial del PC, conocer sus características podría utilizarse para diseños terapéuticos diversos. Por otro lado, hay que resaltar que las células derivadas de la médula ósea, además de incorporarse a las fibras, fueron capaces de posicionarse en el nicho de las células satélite, pero sin embargo, no contribuyeron a la miogénesis *in vitro*, por lo que postulamos que no adquieren una competencia miogénica completa (**Figura 6.40 E-G**). No obstante, no se puede descartar que tal vez estas células no sobrevivieran al cultivo *in vitro* con el protocolo utilizado. Cabe la posibilidad de que el hecho de que no se haya visto contribución miogénica por parte de estas células *in vitro* sea por una razón puramente técnica. Para tener la certeza de que las células derivadas de la médula ósea posicionadas en el nicho de las células satélite no son capaces de generar miotubos *in vitro* se debería de probar un protocolo adecuado para el cultivo de estas células. También se podría generar un daño en el músculo del ratón trasplantado para activarlas y medir su capacidad regenerativa *in vivo* (LaBarge and Blau, 2002). En todo caso, los experimentos realizados en este trabajo evidencian que el PC es un músculo clave para estudiar la movilización de las células derivadas de la médula ósea al músculo esquelético en condiciones fisiológicas.

7.3 Papel fisiológico del PC

7.3.1 Posibles diferencias en la capacidad regenerativa de las células satélite de distintos músculos

En este trabajo se ha identificado una nueva población de células satélite no descrita hasta ahora, localizada en el PC. La alta capacidad regenerativa del PC y el hecho de que sea un destino preferente de las células trasplantadas sugieren que tal vez esta estructura tenga alguna particularidad en su proceso de miogénesis que la diferencie de otros músculos esqueléticos. Esto podría sugerir a su vez, que la capacidad regenerativa de cada músculo puede ser diferente. De hecho, en muchas patologías musculares no todos los músculos esqueléticos se ven afectados por igual, o sólo unos se deterioran mientras que otros se mantienen intactos (Randolph and Pavlath, 2015). De la misma manera, podría ser que las células satélite del PC presentaran características distintivas. En este sentido, podría ser relevante realizar un estudio comparativo entre distintas

poblaciones de células satélite obtenidas de diferentes músculos para determinar las posibles especificidades que pudieran presentar (Charville *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015). Sería interesante proseguir este estudio comparativo en escenarios patológicos para medir las respuestas de estas células satélite y para saber si todas ellas se encuentran afectadas de la misma manera. Tal vez podrían presentar diferentes capacidades proliferativas y regenerativas, así como distintos patrones de expresión de genes relacionados con estados patológicos, envejecimiento y senescencia (Cosgrove *et al.*, 2014; Sousa-Victor *et al.*, 2014). Estas posibles diferencias podrían contribuir a entender la implicación y la evolución de estas poblaciones celulares durante diversos procesos patológicos, para identificar defectos moleculares e incluso para plantear nuevas dianas terapéuticas.

7.3.2 Definiendo el papel del PC durante la cicatrización

El cierre de una herida cutánea es un proceso que implica distintos procesos como la formación de tejido de granulación, la reepitelización y la contracción de los bordes (Watts, 1960). La importancia de cada uno de estos procesos difiere dependiendo del tejido involucrado (Berry *et al.*, 1998). Así, en las pieles que se encuentran estrechamente unidas a los tejidos subcutáneos como en la del ser humano o en el de las orejas de algunos roedores, el proceso de cicatrización principalmente se da a través de la reepitelización y formación de tejido de granulación con la necesidad de crear una nueva epidermis, lo que implica más tiempo para cerrar la herida (Wong *et al.*, 2011; Davidson, Yu and Opalenik, 2013; Abdullahi, Amini-Nik and Jeschke, 2014). En estos casos, generalmente los márgenes de la herida permanecen separados y aunque hay ciertas fuerzas de contracción, estas no son efectivas porque esta piel no presenta los requisitos anatómicos necesarios para reparar la herida a través del proceso de la contracción y al final pueden conducir a constricción, distorsión e inmovilización de la zona (Billingham and Medawar, 1955; Davidson, Yu and Opalenik, 2013). En estas situaciones la brecha residual que no llega a cerrarse por completo se ocupa por tejido cicatricial fibroso (Billingham and Medawar, 1955; Davidson, Yu and Opalenik, 2013). En cambio, en aquellos mamíferos donde la piel contiene PC y se encuentra unida de manera muy laxa a los tejidos subcutáneos, la cicatrización se produce principalmente a través de la contracción de la herida, un proceso extremadamente eficiente y rápido (Gottrup, Ågren and Karlsmark, 2000; Dahiya, 2009; Pavletic, 2011; Abdullahi, Amini-Nik and Jeschke, 2014). Esta diferencia anatómica y estructural que resulta de la presencia del PC y de la holgura de la piel es

clave para proveer de esa ventaja que supone poder acercar los márgenes de la herida lo máximo posible a la hora de hacer frente a lesiones cutáneas. La relevancia de estas dos estructuras anatómicas se ha comprobado a través de diversos ensayos y parece ser que sus implicaciones son puramente físicas: las tensiones generadas en la herida sólo son efectivas cuando se reduce la resistencia a través de la fijación de los márgenes de la herida y cuando la piel da de sí (Billingham and Medawar, 1955; Billingham and Russell, 1956; Zhou, Matsui and Ono, 2000; Aksoy *et al.*, 2009). De modo que en una herida superficial donde no se ve afectada la integridad del PC, este actúa como la base fija a través de la cual se mueve la piel; en cambio, en aquellas heridas profundas donde el PC también ha sido seccionado, al principio los márgenes de la herida tienden a separarse por la retracción de las fibras del PC, lo que produce un retraso en el cierre, pero sólo hasta que los márgenes del PC se vuelven a fijar, momento en el cual las fuerzas surten efecto y la herida cierra con normalidad (Billingham and Medawar, 1955; Billingham and Russell, 1956). En estos animales, cuando el PC es eliminado se genera una superficie de piel que responde peor a heridas secundarias, muestran un retraso mucho mayor del cierre de la herida y más tejido cicatricial, debido a que carecen de anclaje que facilite la contracción y ayude a superar las resistencias del tejido (Zhou, Matsui and Ono, 2000; Aksoy *et al.*, 2009).

Durante la reparación de la piel es importante que se mantenga un correcto balance entre una contracción insuficiente y una contracción desmesurada, que llevarían a heridas abiertas o a contracturas respectivamente, por lo que resulta esencial entender qué células causan la contracción de la herida y a través de qué mecanismos. A lo largo de estos años, muchas observaciones han indicado que la contracción de la herida es debido a la contracción activa del tejido de granulación, y concretamente, que los miofibroblastos son los responsables de este fenómeno (Carrel, 1921; Gabbiani, Ryan and Majno, 1971). Estas células son consideradas como células contráctiles no musculares que contienen fibras de α -SMA, fibras de estrés, otras proteínas contráctiles y complejos de adhesión especializados (fibronexos) (Tomasek *et al.*, 2002; Chitturi *et al.*, 2015). Aunque se ha descrito que los miofibroblastos pueden generarse de diversas células como las mesenquimales, células epiteliales, fibrocitos o pericitos, en el caso de la piel es generalmente aceptado que provienen de fibroblastos que se movilizan de las zonas no dañadas hacia el centro de la herida en respuesta a una lesión (Tomasek *et al.*, 2002; Darby *et al.*, 2014; Chitturi *et al.*, 2015; Bochaton-Piallat, Gabbiani and Hinz, 2016). A pesar de ello, los resultados presentados por Amini-Nik y colaboradores sugerían que un 23% de las células del lecho de la

herida, algunas de las cuales expresaban α -SMA, provenían del linaje de origen del gen *Pax7*, es decir, de las células satélite del PC (Amini-Nik *et al.*, 2011). Este dato señalaba una contribución relevante del PC al proceso de la cicatrización al margen de su función como soporte del movimiento de la piel. Sin embargo, teniendo en cuenta que durante la maduración de los somitas se expresa el gen *Pax7*, que este gen no es específico del músculo y que a partir del dermomiótomo se desarrolla la dermis dorsal (Buckingham and Relaix, 2007; Buckingham and Rigby, 2014), estas células trazadas desde el origen podrían ser otras células que no las células satélite del PC. En nuestro estudio se empleó un trazado de linaje del gen *Pax7* inducible que fue activado en el ratón adulto para asegurar únicamente el trazado de las células satélite del PC y demostramos que su progenie no contribuía al lecho de la herida (**Figura 6.40 B**). Por lo tanto, se determinó que el PC no contribuía a la contracción de la herida a nivel celular, pero queda por caracterizar qué células son aquellas que están presentes en el lecho de la herida trazadas por el linaje del gen *Pax7* (y que no son células satélite del PC) (Amini-Nik *et al.*, 2011).

7.4 Posibles extrapolaciones al ser humano

7.4.1 El músculo cremáster como posible remanente del PC y su aplicabilidad clínica

A la hora de determinar un posible remanente del PC en la piel humana como fuente de precursores miogénicos, tropezamos con la limitación de que esta estructura es vestigial en el ser humano. La mayoría de los músculos humanos que en la literatura se han relacionado con el PC (**Figura 6.42**) se encuentran en localizaciones anatómicas delicadas o poco accesibles. Por ello, se planteó la posibilidad de trabajar a partir de muestras musculares de cadáveres (Latil *et al.*, 2012). Sin embargo, dada las dificultades que podría suponer esta vía, decidimos valorar si algún otro músculo que fuera accesible a través de un procedimiento quirúrgico rutinario podría presentar similitudes o características interesantes relacionadas con el PC.

Para seleccionar el músculo, partimos del hecho de que en algunos animales las fibras del PC se pueden extender hasta el aparato reproductor (Langworthy, 1924, 1925), y de hecho hay referencias bibliográficas que relacionan el músculo dartos del escroto con el PC (Greenwood, 2010; Singh, 2014). Pese a ello, desechamos el músculo dartos porque se trataba de un músculo liso, mientras que el PC es un músculo estriado. Como alternativa tomamos un músculo estriado

también localizado en el escroto, el músculo cremáster. Su localización es algo más interna que el dartos, pero tanto el cremáster como el PC se contraen como reflejo a diversos estímulos de la piel. Además, este músculo es accesible a través de una pequeña incisión inguinal y se pueden obtener biopsias de manera sencilla en el contexto de operaciones quirúrgicas urogenitales rutinarias. Por todo ello, consideramos el cremáster como un músculo adecuado para el estudio de la miogénesis humana y para analizar si ofrecía alguna propiedad interesante con respecto al músculo esquelético.

Mediante la aplicación del protocolo diseñado se consiguió mantener y expandir las células precursoras miogénicas humanas *in vitro* (**Figura 6.47 B-C y 6.48 A-B**), un dato positivo dada la limitada proliferación que presentan las células madre adultas humanas en estas condiciones (Negroni, Butler-Browne and Mouly, 2006; Lin, Otsu and Nakauchi, 2013). Asimismo, se muestra la capacidad regenerativa de estas células *in vivo* (**Figura 6.50**), aunque faltaría comprobar su eficiencia regenerativa frente a otras poblaciones miogénicas y en un modelo de enfermedad. Más allá de su uso como una herramienta de estudio *in vitro*, el cremáster y los precursores miogénicos derivados del mismo podrían utilizarse como una nueva población celular en terapias celulares para tratar diversas patologías musculares. En este trabajo se presentan unas primeras pruebas de concepto que apoyan la utilidad de estas células para este fin. A partir de nuestros datos habría que optimizar el protocolo de cultivo para conseguir un número de células suficiente para las posibles aproximaciones terapéuticas y analizar la migración, la evasión de la respuesta inmune, la eficiencia y la capacidad miogénica a largo plazo de estos precursores miogénicos de cara a un ensayo clínico en humanos (Price, Kuroda and Rudnicki, 2007; Negroni *et al.*, 2015).

Por un lado, para evaluar su aplicabilidad en trasplantes autólogos se deberá comprobar el grado de afectación de este músculo en las diversas patologías musculares a tratar. En esta línea, el mayor inconveniente de llevar el músculo cremáster a un marco terapéutico sería que este músculo como tal no se encuentra en mujeres. El tejido análogo o relacionado con el cremáster en el cuerpo femenino se conoce como el ligamento redondo del útero, un ligamento que se compone de fibras musculares lisas y estriadas y que se extiende desde el lateral del útero hacia el anillo inguinal profundo, a veces hasta insertarse en el tejido adiposo y la piel de los labios superiores (Sappey, 1838; Standring, 2016). El tendón redondo se incluye como uno de los ligamentos de apoyo que ayuda a retener el útero, la vejiga y el recto en su correcta posición (Sloane, 2002; Fitzgerald and

Segal, 2015). Esto implicaría un abordaje más complejo, tal vez imposible, en el caso de querer diseñar una terapia celular autóloga basada en este músculo en mujeres.

Por otro lado, podría ser que las células obtenidas a partir del cremáster presentaran ventajas asociadas a su localización anatómica de manera que exhibieran ventajas funcionales, adaptativas o de supervivencia al aplicarlas a regiones similares o relacionadas con el tejido de origen. Por tanto, siendo el cremáster un músculo localizado en el aparato reproductor masculino, las células derivadas de este músculo podrían ser unas buenas candidatas para el tratamiento de algunas afecciones urogenitales como la disfunción del esfínter urinario tras prostatectomía radical. Con este objetivo se podría tratar de ajustar el protocolo para poder realizar la toma y el tratamiento en una misma intervención tomando como ejemplo procedimientos reportados recientemente (Yiou *et al.*, 2013; Gräs, Klarskov and Lose, 2014).

Por último, en relación a la toma de las biopsias de cremáster obtenidas de sujetos sanos (en relación a patologías musculares u otras patologías urogenitales) consideradas residuales o desechos quirúrgicos, podrían ser almacenadas en un banco de tejidos para su posterior uso en estudios básicos o terapéuticos. Además, en muchos casos, estas muestras se obtienen de sujetos jóvenes adultos, condición favorable ya que se sabe que los tejidos musculares obtenidos de donantes viejos presentan menos células satélite asociadas, y estas a su vez, muestran una capacidad regenerativa disminuida que comprometen su utilidad (Negroni, Butler-Browne and Mouly, 2006; Negroni *et al.*, 2015). Esta alternativa supondría una interesante explotación de estas muestras.

CONCLUSIONES

8 CONCLUSIONES

- 1• Se ha desarrollado y caracterizado un modelo de cultivo tridimensional de diferenciación músculo-esquelética a partir de células precursoras aisladas de piel de ratón, que evoluciona en el tiempo hacia una mayor diferenciación adipogénica.
- 2• Se ha determinado que la célula precursora miogénica principal aislada de la piel de ratón es la célula satélite del panículo carnoso.
- 3• Se ha definido que el panículo carnoso de ratón procede de precursores embrionarios que expresaron los factores reguladores miogénicos *Myf5*, *Pax3* y *Pax7*.
- 4• Se ha establecido que en respuesta a heridas cutáneas de grosor completo, la progenie de las células trazadas por el gen *Pax7* en el estadio adulto no contribuye al lecho de la herida.
- 5• Tras el trasplante de médula ósea, los resultados obtenidos sugieren que células provenientes del donante recolonizan el nicho de la célula satélite del panículo carnoso. Por ello, proponemos el panículo carnoso como sistema modelo para estudiar el significado fisiológico de este fenómeno.
- 6• Las condiciones de aislamiento y cultivo celular desarrolladas en este trabajo son aplicables a biopsias de músculo cremáster humano.
- 7• Los precursores miogénicos obtenidos del músculo cremáster humano son capaces de recolonizar el nicho de la célula satélite en experimentos de regeneración muscular *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

9 BIBLIOGRAFÍA

- Abdullahi, A., Amini-Nik, S. and Jeschke, M. G. (2014) 'Animal models in burn research', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(17), pp. 3241–3255. doi: 10.1007/s00018-014-1612-5.
- Abmayr, S. M. and Pavlath, G. K. (2012) 'Myoblast fusion: lessons from flies and mice', *Development*, 139(4), pp. 641–656. doi: 10.1242/dev.068353.
- Achilli, T.-M., Meyer, J. and Morgan, J. R. (2012) 'Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids', *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(10), pp. 1347–1360. doi: 10.1517/14712598.2012.707181.
- Adams, B. and Beam, K. (1990) 'Muscular dysgenesis in mice: a model system for studying excitation-contraction coupling', *FASEB journal*, 4(10), pp. 2809–2816.
- Addison, O., Marcus, R. L., Lastayo, P. C. and Ryan, A. S. (2014) 'Intermuscular fat: A review of the consequences and causes', *International Journal of Endocrinology*, 2014, pp. 34–36. doi: 10.1155/2014/309570.
- Aksoy, B., Aksoy, H. M., Civaş, E., Üstün, H. and Atakan, N. (2009) 'A new experimental delayed wound healing model in rabbits', *European Journal of Dermatology*, 19(6), pp. 565–569. doi: 10.1684/ejd.2009.0788.
- Alderton, J. M. and Steinhardt, R. A. (2000) 'Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes', *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), pp. 9452–9460. doi: 10.1074/jbc.275.13.9452.
- Alessandri, G., Pagano, S., Bez, A. and Benetti, A. (2004) 'Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages', *Lancet*, 364.
- Amini-Nik, S., Glancy, D., Boimer, C., Whetstone, H., Keller, C. and Alman, B. A. (2011) 'Pax7 expressing cells contribute to dermal Wound repair, regulating scar size through a β -catenin mediated process', *Stem Cells*, 29(9), pp. 1371–1379. doi: 10.1002/stem.688.
- Ampofo, E., Schmitt, B. M., Menger, M. D. and Laschke, M. W. (2017) 'The regulatory mechanisms of NG2/CSPG4 expression', *Cellular & Molecular Biology Letters*. Cellular & Molecular Biology Letters, 22(1), p. 4. doi: 10.1186/s11658-017-0035-3.
- Anastasi, S., Giordano, S., Sthandier, O., Gambarotta, G., Maione, R., Comoglio, P., Amati, P., Bolognetti, I. P. C., Cellulari, B., Genetica, S., La, R. and Torino, U. (1997) 'A Natural Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Autocrine Loop in Myoblast Cells and the Effect of the Constitutive', 137(5), pp. 1057–1068.
- Angelini, C., Di Mauro, S. and Margreth, A. (1968) 'Relationship of serum enzyme changes to muscle damage in vitamin E deficiency of the rabbit.', *Sperimentale*, 118, pp. 349–369.
- Armulik, A., Genové, G. and Betsholtz, C. (2011) 'Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises.', *Developmental cell*, 21(2), pp. 193–215. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
- Asakura, A., Rudnicki, M. A. and Komaki, M. (2001) 'Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation', *Differentiation*, 68(4–5), pp. 245–253. doi: 10.1046/j.1432-0436.2001.680412.x.
- Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A. and Rudnicki, M. A. (2002) 'Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle', *Journal of Cell Biology*, 159(1), pp. 123–134. doi: 10.1083/jcb.200202092.
- Ashwell, K. (2013) *Neurobiology of Monotremes: Brain Evolution in Our Distant Mammalian Cousins*. Edited by Csiro Publishing.
- Awiss, K. J., Gough, J. E. and Downes, S. (2010) 'Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration', *European Cells and Materials*, 19, pp. 193–204. doi: vol019a19 [pii].

- Bach, A. D., Beier, J. P., Stern-Staeter, J. and Horch, R. E. (2014) 'Skeletal muscle tissue engineering', *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*, 8(4), pp. 524–540. doi: 10.1533/9780857097163.3.524.
- Barrett, J. N., Barrett, E. F. and Dribin, L. B. (1981) 'Calcium-dependent slow potassium conductance in rat skeletal myotubes', *Developmental Biology*, 82(2), pp. 258–266. doi: 10.1016/0012-1606(81)90450-4.
- Beckmann, J. and Lips, K. S. (2013) 'The non-neuronal cholinergic system in health and disease', *Pharmacology*, 92(5–6), pp. 286–302. doi: 10.1159/000355835.
- Benchouir, R., Meregalli, M., Farini, A., D'Antona, G., Belicchi, M., Goyenvalle, A., Battistelli, M., Bresolin, N., Bottinelli, R., Garcia, L. and Torrente, Y. (2007) 'Restoration of Human Dystrophin Following Transplantation of Exon-Skipping-Engineered DMD Patient Stem Cells into Dystrophic Mice', *Cell Stem Cell*, 1(6), pp. 646–657. doi: 10.1016/j.stem.2007.09.016.
- Bencze, M., Negroni, E., Vallese, D., Yacoubyousssef, H., Chaouch, S., Wolff, A., Aamiri, A., Di Santo, J. P., Chazaud, B., Butler-Browne, G., Savino, W., Mouly, V. and Riederer, I. (2012) 'Proinflammatory macrophages enhance the regenerative capacity of human myoblasts by modifying their kinetics of proliferation and differentiation', *Molecular Therapy*, 20(11), pp. 2168–2179. doi: 10.1038/mt.2012.189.
- Bergman, R. A. (1988) *Compendium of Human Anatomic Variation: Text, Atlas, and World Literature*. Edited by U. & Schwarzenberg.
- Bergman, R. A. (2017) *Anatomy Atlases*. Edited by A. anatomy difital Library.
- Bernareggi, A., Luin, E., Formaggio, E., Fumagalli, G. and Lorenzon, P. (2012) 'Novel role for prepatterned nicotinic acetylcholine receptors during myogenesis', *Muscle and Nerve*, 46(1), pp. 112–121. doi: 10.1002/mus.23284.
- Berry, D. P., Harding, K. G., Stanton, M. R., Jasani, B. and Ehrlich, P. H. (1998) 'Huma wound contraction. Collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts.pdf', *Plastic and Reconstructive Surgery*, 102(July).
- Besana-Ciani, I. and Greenall, M. (2005) 'Langer's axillary arch: Anatomy, embryological features and surgical implications', *Surgeon*. Royal College of Surgeons of Edinburgh and Royal College of Surgeons in Ireland, 3(5), pp. 325–327. doi: 10.1016/S1479-666X(05)80111-8.
- Biancalana, V. and Laporte, J. (2015) 'Diagnostic use of Massively Parallel Sequencing in Neuromuscular Diseases: Towards an Integrated Diagnosis', *Journal of Neuromuscular Diseases*, 2(3), pp. 193–203. doi: 10.3233/JND-150092.
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Rifkin, D. B., Biology, C., Sackler, B. and Hematopoiesis, E. (1997) 'Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2', 18(1), pp. 26–45. doi: 10.1210/er.18.1.26.
- Billingham, R. E. and Medawar, P. B. (1955) 'Contracture and intussusceptive growth in the healing of extensive wounds in mammalian skin', *Journal of anatomy*, 89(Pt 1), pp. 114–123.
- Billingham, R. E. and Russell, P. S. (1956) 'Studies on Wound Healing, with Special Reference to the Phenomenon of Contracture in Experimental Wounds in Rabbits' Skin *', *Annals of surgery*, 144(6), pp. 961–981. doi: 10.1097/0000658-195612000-00005.
- Biltz, N. K. and Meyer, G. A. (2017) 'A novel method for the quantification of fatty infiltration in skeletal muscle', *Skeletal Muscle*. *Skeletal Muscle*, 7(1), p. 1. doi: 10.1186/s13395-016-0118-2.
- Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.-M., Messi, M. L., Mintz, A. and Delbono, O. (2013) 'Type-1 pericytes participate in fibrous tissue deposition in aged skeletal muscle.', *American journal of physiology. Cell physiology*, 305(11), pp. C1098–113. doi: 10.1152/ajpcell.00171.2013.
- Blanco-Bose, W. E., Yao, C. C., Kramer, R. H. and Blau, H. M. (2001) 'Purification of mouse primary myoblasts based on alpha 7 integrin expression.', *Experimental cell research*, 265(2), pp. 212–20. doi: 10.1006/excr.2001.5191.
- Bochaton-Piallat, M.-L., Gabbiani, G. and Hinz, B. (2016) 'The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions', *F1000Research*, 5(0), p. 752. doi: 10.12688/f1000research.8190.1.

- Boldrin, L., Muntoni, F. and Morgan, J. E. (2010) 'Are Human and Mouse Satellite Cells Really the Same?', *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 58(11), pp. 941–955. doi: 10.1369/jhc.2010.956201.
- Boldrin, L., Neal, A., Zammit, P. S., Muntoni, F. and Morgan, J. E. (2012) 'Donor satellite cell engraftment is significantly augmented when the host niche is preserved and endogenous satellite cells are incapacitated', *Stem Cells*, 30(9), pp. 1971–1984. doi: 10.1002/stem.1158.
- Boldrin, L., Zammit, P. S., Muntoni, F. and Morgan, J. E. (2009) 'Mature adult dystrophic mouse muscle environment does not impede efficient engrafted satellite cell regeneration and self-renewal', *Stem Cells*, 27(10), pp. 2478–2487. doi: 10.1002/stem.162.
- Bouchentouf, M., Benabdallah, B. F., Mills, P. and Tremblay, J. P. (2006) 'Exercise improves the success of myoblast transplantation in mdx mice', *Neuromuscular Disorders*, 16(8), pp. 518–529. doi: 10.1016/j.nmd.2006.06.003.
- Brazelton, T. R., Nystrom, M. and Blau, H. M. (2003) 'Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells', *Developmental Biology*, 262(1), pp. 64–74. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00357-9.
- Breslin, S. and O'Driscoll, L. (2013) 'Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery', *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, 18(5–6), pp. 240–249. doi: 10.1016/j.drudis.2012.10.003.
- Breslin, S., O'Driscoll, L., Breslin, S. and O'Driscoll, L. (2016) 'The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance', *Oncotarget*, 7(29), pp. 45745–45756. doi: 10.18632/oncotarget.9935.
- Brevet, A., Pinto, E., Peacock, J. and Stockdale, F. E. (1976) 'Myosin Synthesis Increased by Electrical Stimulation of Skeletal Muscle Cell Cultures', *Science*, 193(4258), pp. 1152–1154.
- Brodie, C., Brody, M. and Sampson, S. R. (1989) 'Characterization of the relation between sodium channels and electrical activity in cultured rat skeletal myotubes: regulatory aspects.', *Brain research*, 488(1–2), pp. 186–94. doi: 10.1016/0006-8993(89)90708-7.
- Brunetti, A. and Goldfine, I. D. (1990) 'Role of Myogenin in Myoblast differentiation and Its Regulation Growth by Fibroblast Growth Factor', *Biochemistry*, 265(11), pp. 5960–5963.
- Buckingham, M. and Relaix, F. (2007) 'The role of Pax genes in the development of tissues and organs : Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, pp. 645–673. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123438.
- Buckingham, M. and Rigby, P. W. J. (2014) 'Review gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis', *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 28(3), pp. 225–238. doi: 10.1016/j.devcel.2013.12.020.
- Burks, T. N. and Cohn, R. D. (2011) 'One size may not fit all : anti - aging therapies and sarcopenia', *Aging*, 3(12), pp. 1–12. doi: 10.18632/aging.100409.
- Bursac, N., Juhas, M. and Rando, T. A. (2015) 'Synergizing Engineering and Biology to Treat and Model Skeletal Muscle Injury and Disease', *Annual Review of Biomedical Engineering*, 17(1), pp. 217–242. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071114-040640.
- Cadot, B., Gache, V., Vasyutina, E., Falcone, S., Birchmeier, C. and Gomes, E. R. (2012) 'Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3', *EMBO reports*. Nature Publishing Group, 13(8), pp. 741–749. doi: 10.1038/embor.2012.89.
- Caliari, S. R. and Burdick, J. A. (2016) 'A practical guide to hydrogels for cell culture', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 13(5), pp. 405–414. doi: 10.1038/nmeth.3839.
- Camargo, F. D., Green, R., Capetenaki, Y., Jackson, K. A. and Goodell, M. A. (2003) 'Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates', *Nature Medicine*, 9(12), pp. 1520–1527. doi: 10.1038/nm963.

- Candiani, G., Riboldi, S., Sadr, N., Lorenzoni, S., Neuenschwander, P., Montevecchi, F. M. and Mantero, S. (2010) 'Cyclic mechanical stimulation favors myosin heavy chain accumulation in engineered skeletal muscle constructs.', *Journal of applied biomaterials & biomechanics : JABB*, 8(2), pp. 68–75.
- Cantini, M., Giurisato, E., Radu, C., Tiozzo, S., Pampinella, F., Senigaglia, D., Zaniolo, G., Mazzoleni, F. and Vitiello, L. (2002) 'Macrophage-secreted myogenic factors. A promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo', *Neurological Sciences*, 23, pp. 189–194.
- Carpenter, G. and Cohen, S. (1979) 'Epidermal Growth Factor', *Annual Review Biochem*, 48, pp. 193–216. doi: 10.1385/159745012X.
- Carrel, A. (1921) 'Cicatrización de heridas', *The Journal of Experimental Medicine*, 34(5), pp. 425–434.
- Carvajal, J. J., Cox, D., Summerbell, D. and Rigby, P. W. J. (2001) 'A BAC transgenic analysis of the Mrf4/Myf5 locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development.', *Development*, 128(10), pp. 1857–68.
- Carvajal, J. J., Cox, D., Summerbell, D. and Rigby, P. W. J. (2001) 'A BAC transgenic analysis of the Mrf4 / Myf5 locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development', *Development*, 128(10), pp. 1857–1868.
- Carvajal, J. J., Keith, A. and Rigby, P. W. J. (2008) 'Global transcriptional regulation of the locus encoding the skeletal muscle determination genes Mrf4 and Myf5', *Genes and Development*, 22(2), pp. 265–276. doi: 10.1101/gad.442408.
- Cerletti, M., Jurga, S., Witczak, C. A., Hirshman, M. F., Shadrach, J. L., Goodyear, L. J. and Wagers, A. J. (2008) 'Highly Efficient, Functional Engraftment of Skeletal Muscle Stem Cells in Dystrophic Muscles', *Cell*, 134(1), pp. 37–47. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.049.
- Chargé, S. B. P. and Rudnicki, M. A. (2004) 'Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration', *Physiological Reviews*, 84, pp. 209–238.
- Charville, G. W., Cheung, T. H., Yoo, B., Santos, P. J., Lee, G. K., Shrager, J. B. and Rando, T. A. (2015) 'Ex vivo expansion and in vivo self-renewal of human muscle stem cells', *Stem Cell Reports*. The Authors, 5(4), pp. 621–632. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.08.004.
- Chaudhari, N., Delay, R. and Beam, K. G. (1989) 'Restoration of normal function in genetically defective myotubes by spontaneous fusion with fibroblasts', *Nature*, 342, pp. 189–92. doi: 10.1038/340301a0.
- Chazaud, B., Brigitte, M., Yacoub-Youssef, H., Arnold, L., Gherardi, R., Sonnet, C., Lafuste, P. and Chretien, F. (2009) 'Dual and Beneficial Roles of Macrophages During Skeletal Muscle Regeneration', *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 37(1), pp. 18–22.
- Chazaud, B., Sonnet, C., Lafuste, P., Bassez, G., Rimaniol, A. C., Poron, F., Authier, F. J., Dreyfus, P. A. and Gherardi, R. K. (2003) 'Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200212046.
- Chen, C., Krohn, J., Bhattacharya, S. and Davies, B. (2011) 'A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a PhiC31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells.', *PLoS one*, 6(8), p. e23376. doi: 10.1371/journal.pone.0023376.
- Cheng, C. S., El-Abd, Y., Bui, K., Hyun, Y.-E., Hughes, R. H., Kraus, W. E. and Truskey, G. A. (2014) 'Conditions that promote primary human skeletal myoblast culture and muscle differentiation in vitro', *AJP: Cell Physiology*, 306(4), pp. C385–C395. doi: 10.1152/ajpcell.00179.2013.
- Chew, S. H., Okazaki, Y., Nagai, H., Misawa, N., Akatsuka, S., Yamashita, K., Jiang, L., Yamashita, Y., Noguchi, M., Hosoda, K., Sekido, Y., Takahashi, T. and Toyokuni, S. (2014) 'Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production', *Carcinogenesis*, 35(1), pp. 164–172. doi: 10.1093/carcin/bgt267.

- Chitturi, R. T., Balasubramaniam, A. M., Parameswar, R. A., Kesavan, G., Haris, K. T. M. and Mohideen, K. (2015) 'The role of myofibroblasts in wound healing, contraction and its clinical implications in cleft palate repair.', *Journal of international oral health*, 7(3), pp. 75–80.
- Christ, B. and Ordahl, C. P. (1995) 'Early stages of chick somite development', *Anatomy and Embryology*, 191(November), pp. 381–396.
- Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F.-J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B. and Guerardi, R. K. (2007) 'Muscle satellite cells and endothelial cells. Close neighbors and privileged partners', *Molecular Biology of the Cell*, 18, pp. 1397–1409. doi: doi/10.1091/mbc.E06-08-0693.
- Chromiak, J. A. and Vandenberg, H. H. (1994) 'Mechanical stimulation of skeletal muscle cells mitigates glucocorticoid-induced decreases in prostaglandin production and prostaglandin synthase activity', *Journal of Cellular Physiology*, 159(3), pp. 407–414. doi: 10.1002/jcp.1041590304.
- Clark, P., Coles, D. and Peckham, M. (1997) 'Preferential adhesion to and survival on patterned laminin organizes myogenesis in vitro.', *Experimental cell research*, 230(2), pp. 275–83. doi: 10.1006/excr.1996.3429.
- Clegg, C. H., Linkhart, T. A., Olwin, B. B. and Hauschka, S. D. (1987) 'Growth factor control of skeletal muscle differentiation: Commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor', *Journal of Cell Biology*, 105(2), pp. 949–956. doi: 10.1083/jcb.105.2.949.
- Cohen, I. K., Moore, C. D. and Diegelmann, R. F. (1979) 'Onset and localization of collagen synthesis during wound healing in open rat skin', *Journal of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 160, pp. 458–462.
- Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T. A. and Morgan, J. E. (2005) 'Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche', *Cell*, 122(2), pp. 289–301. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.010.
- Connor, M. K., Irrcher, I. and Hood, D. A. (2001) 'Contractile Activity-induced Transcriptional Activation of Cytochrome c Involves Sp1 and is Proportional to Mitochondrial ATP Synthesis in C2C12 Muscle Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), pp. 15898–15904. doi: 10.1074/jbc.M100272200.
- Corbel, S. Y., Lee, A., Yi, L., Duenas, J., Brazelton, T. R., Blau, H. M. and Rossi, F. M. V (2003) 'Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle', *Nature Medicine*, 9(12), pp. 1528–1532. doi: 10.1038/nm959.
- Cornelison, D. D. W., Olwin, B. B., Rudnicki, M. A. and Wold, B. J. (2000) 'MyoD^{-/-} Satellite Cells in Single-Fiber Culture Are Differentiation Defective and MRF4 Deficient', *Developmental Biology*, 224(2), pp. 122–137. doi: 10.1006/dbio.2000.9682.
- Cornelison, D. D. W., Wilcox-Adelman, S. A., Goetinck, P. F., Rauvala, H., Rapraeger, A. C. and Olwin, B. B. (2004) 'Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration', ... & *development*, (303), pp. 2231–2236. doi: 10.1101/gad.1214204.GENES.
- Cornelison, D. and Filla, M. (2001) 'Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration', *Developmental ...*, 94, pp. 79–94. doi: 10.1006/dbio.2001.0416.
- Cosgrove, B. D., Gilbert, P. M., Porpiglia, E., Mourkioti, F., Lee, S. P., Corbel, S. Y., Llewellyn, M. E., Delp, S. L. and Blau, H. M. (2014) 'Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles.', *Nature medicine*. Nature Publishing Group, 20(3), pp. 255–64. doi: 10.1038/nm.3464.
- Cossu, G. and Mavilio, F. (2000) 'Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: Wishful thinking or therapeutic perspective?', *Journal of Clinical Investigation*, 105(12), pp. 1669–1674. doi: 10.1172/JCI10376.
- Cossu, G., Tajbakhsh, S. and Buckingham, M. (1996) 'How is myogenesis initiated in the embryo?', *Trends in Genetics*, 12(6), pp. 218–223.
- Courbin, P., Koenig, J., Ressouches, A., Beam, K. G. and Powell, J. A. (1989) 'Rescue of excitation-contraction coupling in dysgenic muscle by addition of fibroblasts in vitro', *Neuron*, 2(4), pp. 1341–1350. doi: 10.1016/0896-6273(89)90072-X.

- Cruz-Jentoft, A. J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F. C., Michel, J. P., Rolland, Y., Schneider, S. M., Topinková, E., Vandewoude, M. and Zamboni, M. (2010) 'Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis', *Age and Ageing*, 39(4), pp. 412–423. doi: 10.1093/ageing/afq034.
- Dahiya, P. (2009) 'Burns as a model of SIRS', *Frontiers in Bioscience*, 14(June 1), pp. 4962–4967.
- Daly, T. J. and Buffenstein, R. (1998) 'Skin morphology and its role in thermoregulation in mole-rats, *Heterocephalus glaber* and *Cryptomys hottentotus*.' *Journal of anatomy*, 193 (Pt 4, pp. 495–502. doi: 10.1046/j.1469-7580.1998.19340495.x.
- Danoviz, M. E. and Yablonka-Reuveni, Z. (2012) 'Skeletal Muscle Satellite Cells: Background and Methods for Isolation and Analysis in a Primary Culture System', *Methods in Molecular Biology*, 798(206), pp. 21–52. doi: 10.1007/978-1-61779-343-1_2.
- Darabi, R., Arpke, R. W., Irion, S., Dimos, J. T., Grskovic, M., Kyba, M. and Perlingeiro, R. C. R. (2012) 'Short Article Human ES- and iPS-Derived Myogenic Progenitors Restore DYSTROPHIN and Improve Contractility upon Transplantation in Dystrophic Mice', *Stem Cell*. Elsevier Inc., 10(5), pp. 610–619. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.015.
- Darabi, R., Gehlbach, K., Bachoo, R. M., Kamath, S., Osawa, M., Kamm, K. E., Kyba, M. and Perlingeiro, R. C. R. (2008) 'Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells', *Nature Medicine*, 14(2), pp. 134–143. doi: 10.1038/nm1705.
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F. and Desmoulière, A. (2014) 'Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing', *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7, pp. 301–311. doi: 10.2147/CCID.S50046.
- Das, M., Gregory, C. A., Molnar, P., Riedel, L. M., Wilson, K. and Hickman, J. J. (2006) 'A defined system to allow skeletal muscle differentiation and subsequent integration with silicon microstructures', *Biomaterials*, 27(24), pp. 4374–4380. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.03.046.
- Das, M., Rumsey, J. W., Bhargava, N., Stancescu, M. and Hickman, J. J. (2010) 'A defined long-term in vitro tissue engineered model of neuromuscular junctions', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 31(18), pp. 4880–4888. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.02.055.
- Das, M., Rumsey, J. W., Gregory, C. A., Bhargava, N., Kang, J. F., Molnar, P., Riedel, L., Guo, X. and Hickman, J. J. (2007) 'Embryonic motoneuron-skeletal muscle co-culture in a defined system', *Neuroscience*, 146(2), pp. 481–488. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.01.068.
- Davidovic, L., Durand, N., Khalfallah, O., Tabet, R., Barbry, P., Mari, B., Sacconi, S., Moine, H. and Bardoni, B. (2013) 'A Novel Role for the RNA-Binding Protein FXR1P in Myoblasts Cell-Cycle Progression by Modulating p21/Cdkn1a/Cip1/Waf1 mRNA Stability', *PLoS Genetics*, 9(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1003367.
- Davidson, J. M., Yu, F. and Opalenik, S. R. (2013) 'Splinting Strategies to Overcome Confounding Wound Contraction in Experimental Animal Models.', *Advances in wound care*, 2(4), pp. 142–148. doi: 10.1089/wound.2012.0424.
- Dellavalle, A., Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, A., Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S. and Cossu, G. (2011) 'Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 2, p. 499. doi: 10.1038/ncomms1508.
- Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B. G., Messina, G., Morosetti, R., Li, S., Belicchi, M., Peretti, G., Chamberlain, J. S., Wright, W. E., Torrente, Y., Ferrari, S., Bianco, P. and Cossu, G. (2007) 'Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells', *Nature Cell Biology*, 9(3), pp. 255–267. doi: 10.1038/ncb1542.
- Demestre, M., Orth, M., Föhr, K. J., Achberger, K., Ludolph, A. C., Liebau, S. and Boeckers, T. M. (2015) 'Formation and characterisation of neuromuscular junctions between hiPSC derived motoneurons and myotubes', *Stem Cell Research*. The Authors, 15(2), pp. 328–336. doi: 10.1016/j.scr.2015.07.005.

- Dennis, R. G. and Kosnik, P. E. (2000) 'Excitability and Isometric Contractile Properties of Mammalian Skeletal Muscle Constructs Engineered in Vitro', *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 36(5), p. 327. doi: 10.1290/1071-2690(2000)036<0327:EAICPO>2.0.CO;2.
- Díaz-Manera, J., Alejandre, A., González, L., Olivé, M., Gómez-Andrés, D., Muelas, N., Vílchez, J. J., Llauger, J., Carbonell, P., Márquez-Infante, C., Fernández-Torrón, R., Poza, J. J., López de Munáin, A., González-Quereda, L., Mirabet, S., Clarimon, J., Gallano, P., Rojas-García, R., Gallardo, E. and Illa, I. (2016) 'Muscle imaging in muscle dystrophies produced by mutations in the EMD and LMNA genes', *Neuromuscular Disorders*, 26(1), pp. 33–40. doi: 10.1016/j.nmd.2015.10.001.
- Díaz-Manera, J., Touvier, T., Dellavalle, A., Tonlorenzi, R., Tedesco, F. S., Messina, G., Meregalli, M., Navarro, C., Perani, L., Bonfanti, C., Illa, I., Torrente, Y. and Cossu, G. (2010) 'Partial dysferlin reconstitution by adult murine mesoangioblasts is sufficient for full functional recovery in a murine model of dysferlinopathy', *Cell Death and Disease*, 1(8), pp. 1–11. doi: 10.1038/cddis.2010.35.
- Djian-Zaouche, J., Bernex, F., Louise, A. and Buckingham, M. (2012) 'Pigment Cell & melanoma expression in the skin', *Pigment Cell Melanoma Research*, 25(5), pp. 545–554. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.01024.x.
- Douglas, M. R., Morrison, K. E., Salmon, M. and Buckley, C. D. (2002) 'Why does inflammation persist: a dominant role for the stromal microenvironment?', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(25). doi: 10.1017/S1462399402005264.
- Dubowitz, V., Oldfors, A. and Sewry, C. A. (2013) *Muscle biopsy: A practical approach*.
- Duda, R. O., Hart, P. E. and Stork, D. G. (2000) *Pattern Classification*. Wiley Interscience.
- Dumont, N. A., Wang, Y. X. and Rudnicki, M. A. (2015) 'Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function', *Development*, 142(5), pp. 1572–1581. doi: 10.1242/dev.114223.
- Dusterhoft, S. and Pette, D. (1990) 'Effects of electrically induced contractile activity on cultured embryonic chick breast muscle cells', *Differentiation*, 44(3), pp. 178–184. doi: 10.1111/j.1432-0436.1990.tb00616.x.
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. and Yang, L. (2014) 'Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors', *ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4), pp. 207–218. doi: 10.1089/adt.2014.573.
- Elenius, K. and Jalkanen, M. (1994) 'Function of the syndecans-a family of cell surface proteoglycans', *Journal of Cell Science*, 107(11), pp. 2975–2982.
- Emery, A. E. H. (2002) 'The muscular dystrophies.', *Lancet*, 359, pp. 687–695. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07815-7.
- Engleka, K. A., Gitler, A. D., Zhang, M., Zhou, D. D., High, F. A. and Epstein, J. A. (2005) 'Insertion of Cre into the Pax3 locus creates a new allele of Splotch and identifies unexpected Pax3 derivatives', *Developmental Biology*, 280(2), pp. 396–406. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.002.
- Engler, A. J., Griffin, M. A., Sen, S., Bönnemann, C. G., Sweeney, H. L. and Discher, D. E. (2004) 'Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: Pathological implications for soft or stiff microenvironments', *Journal of Cell Biology*, 166(6), pp. 877–887. doi: 10.1083/jcb.200405004.
- Etzaniz, U., Vicente, A. P. S., Gago-López, N., García-Dominguez, M., Iribar, H., Aduriz, A., Pérez-López, V., Burgoa, I., Irizar, H., Muñoz-Culla, M., Vallejo-Illarramendi, A., Leis, O., Matheu, A., Martín, A. G., Otaegui, D., López-Mato, M. P., Gutiérrez-Rivera, A., MacLellan, R. and Izeta, A. (2014) 'Neural-competent cells of adult human dermis belong to the Schwann lineage', *Stem Cell Reports*, 3(5), pp. 774–788. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.09.009.
- Evans, D. J. R., Britland, S. and Wigmore, P. M. (1999) 'Differential response of fetal and neonatal myoblasts to topographical guidance cues in vitro', *Development Genes and Evolution*, 209(7), pp. 438–442. doi: 10.1007/s004270050275.
- Evans, H. E. and de Lahunta, A. (2013) *Miller's Anatomy of the Dog*. 4th edn. Edited by Elsevier Health Sciences.

- Ewton, D. Z., Spizz, G., Olson, E. N. and Florini, J. R. (1988) 'Decrease in transforming growth factor- β binding and action during differentiation in muscle cells', *Journal of Biological Chemistry*, 263(8), pp. 4029–4032.
- Falcone, S., Roman, W., Hnia, K., Gache, V., Didier, N., Lainé, J., Auradé, F., Marty, I., Nishino, I., Charlet-Berguerand, N., Romero, N. B., Marazzi, G., Sassoon, D., Laporte, J. and Gomes, E. R. (2014) 'N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1- dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy', *EMBO Mol Med*, 6(11), pp. 1455–1475. doi: 10.15252/emmm.
- Federle, M. P., Rosado-de-Christenson, M. L., Carter, B. W., Raman, S. P., Woodward, P. J. and Shaaban, A. M. (2016) *Imaging Anatomy: Chest, Abdomen, Pelvis*. Edited by E.-H. S. Division.
- Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. and De Boer, J. (2013) 'Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues', *Trends in Biotechnology*, 31(2), pp. 108–115. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.
- Fernandes, K. J. L., McKenzie, I. A., Mill, P., Smith, K. M., Akhavan, M., Barnabé-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N. R., Toma, J. G., Kaplan, D. R., Labosky, P. A., Rafuse, V., Hui, C.-C. and Miller, F. D. (2004) 'A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells', *Nature Cell Biology*, 6(11), pp. 1082–1093. doi: 10.1038/ncb1181.
- Fernandes, K. J. L., Toma, J. G. and Miller, F. D. (2008) 'Multipotent skin-derived precursors : adult neural crest-related precursors with therapeutic potential', (February 2007), pp. 185–198. doi: 10.1098/rstb.2006.2020.
- Ferrari, G., Cusella-De-Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. and Mavilio, F. (1998) 'Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.pdf', *Science*, 279(March 6).
- Ferrari, G. and Mavilio, F. (2002) 'Myogenic stem cells from the bone marrow: A therapeutic alternative for muscular dystrophy?', *Neuromuscular Disorders*, 12(SUPPL.), pp. 10–13. doi: 10.1016/S0960-8966(02)00102-5.
- Ferrari, G., Stornaiuolo, A. and Mavilio, F. (2001) 'Failure to correct murine muscular dystrophy.pdf', *Nature*, 411(June 28).
- Fielding, R. A., Manfredi, T. J., Ding, W., Fiatarone, M. A., Evans, W. J. and Cannon, J. G. (1993) 'Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle', *American Journal of Physiology*, 265(1).
- Fitzgerald, C. M. and Segal, N. A. (2015) *Musculoskeletal health in pregnancy and postpartum: An evidence-based guide for clinicians*. Springer.
- Foster, R. F., Thompson, J. M. and Kaufman, S. J. (1987) 'A laminin substrate promotes myogenesis in rat skeletal muscle cultures: Analysis of replication and development using antidesmin and anti-BrdUrd monoclonal antibodies', *Developmental Biology*, 122(1), pp. 11–20. doi: 10.1016/0012-1606(87)90327-7.
- Frank, E. and Fischbach, G. D. (1979) 'Early events in neuromuscular junction formation in vitro. Induction of acetylcholine receptor clusters in the postsynaptic membrane and morphology of newly formed synapses', *Journal of Cell Biology*, 83(1), pp. 143–158. doi: 10.1083/jcb.83.1.143.
- Frontera, W. R. and Ochala, J. (2015) 'Skeletal Muscle : A Brief Review of Structure and Function', *Calcified Tissue International*, 96(3), pp. 183–195. doi: 10.1007/s00223-014-9915-y.
- Frudinger, A., Kolle, D., Schwaiger, W., Pfeifer, J., Paede, J., Halligan, S., Kölle, D., Schwaiger, W., Pfeifer, J., Paede, J., Halligan, S., Kolle, D., Schwaiger, W., Pfeifer, J., Paede, J. and Halligan, S. (2010) 'Muscle-derived cell injection to treat anal incontinence due to obstetric trauma: pilot study with 1 year follow-up', *Gut*. Elsevier Ltd, 59(1), pp. 55–61. doi: gut.2009.181347 [pii]r10.1136/gut.2009.181347.
- Frudinger, A., Pfeifer, J., Paede, J., Kolovetsiou-Kreiner, V., Marksteiner, R. and Halligan, S. (2015) 'Autologous skeletal-muscle-derived cell injection for anal incontinence due to obstetric trauma: A 5-year follow-up of an initial study of 10 patients', *Colorectal Disease*, 17(9), pp. 794–801. doi: 10.1111/codi.12947.
- Fukada, S.-I., Ma, Y., Ohtani, T., Watanabe, Y., Murakami, S. and Yamaguchi, M. (2013) 'Isolation, characterization, and molecular regulation of muscle stem cells.', *Frontiers in physiology*, 4(November), p. 317. doi: 10.3389/fphys.2013.00317.

- Fukada, S., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y. and Takeda, S. (2007) 'Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells in Adult Skeletal Muscle', *Stem Cells*, 25(10), pp. 2448–2459. doi: 10.1634/stemcells.2007-0019.
- Fuoco, C., Salvatori, M., Biondo, A., Shapira-Schweitzer, K., Santoleri, S., Antonini, S., Bernardini, S., Tedesco, F. S., Cannata, S., Seliktar, D., Cossu, G. and Gargioli, C. (2012) 'Injectable polyethylene glycol-fibrinogen hydrogel adjuvant improves survival and differentiation of transplanted mesoangioblasts in acute and chronic skeletal-muscle degeneration', *Skeletal Muscle*, 2(1), p. 24. doi: 10.1186/2044-5040-2-24.
- Furtado, M. B., Costa, M. W., Pranoto, E. A., Salimova, E., Pinto, A. R., Lam, N. T., Park, A., Snider, P., Chandran, A., Harvey, R. P., Boyd, R., Conway, S. J., Pearson, J., Kaye, D. M. and Rosenthal, N. A. (2014) 'Cardiogenic genes expressed in cardiac fibroblasts contribute to heart development and repair', *Circulation Research*, 114(9), pp. 1422–1434. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302530.
- Gabbiani, G., Ryan, G. B. and Majno, G. (1971) 'Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction', *Experientia*, 27(5), pp. 549–550. doi: 10.1007/BF02147594.
- García-Parra, P., Cavaliere, F., Maroto, M., Bilbao, L., Obieta, I., López de Munain, A., Alava, J. I. and Izeta, A. (2012) 'Modeling neural differentiation on micropatterned substrates coated with neural matrix components.', *Frontiers in cellular neuroscience*, 6(March), p. 10. doi: 10.3389/fncel.2012.00010.
- García-Parra, P., Maroto, M., Cavaliere, F., Naldaiz-Gastesi, N., Álava, J. I., García, A. G., López de Munain, A. and Izeta, A. (2013) 'A neural extracellular matrix-based method for in vitro hippocampal neuron culture and dopaminergic differentiation of neural stem cells A neural extracellular matrix-based method for in vitro hippocampal neuron culture and dopaminergic differentiation of', *BMC neuroscience*, 14.
- Gates, R. R. (1946) *Human Genetics*.
- Gekas, C. and Graf, T. (2013) 'CD41 expression marks myeloid biased adult hematopoietic stem cells and increases with age.', *Blood*, 121(22), pp. 4463–4472. doi: 10.1182/blood-2012-09-457929.
- Gensch, N., Borchardt, T., Schneider, A., Riethmacher, D. and Braun, T. (2008) 'Different autonomous myogenic cell populations revealed by ablation of Myf5-expressing cells during mouse embryogenesis.', *Development*, 135(9), pp. 1597–604. doi: 10.1242/dev.019331.
- Gibson, A. J., Karasinski, J., Relvas, J., Moss, J., Sherratt, T. G., Strong, P. N. and Watt, D. J. (1995) 'Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in mdx mouse muscle.', *Journal of cell science*, 108 (Pt 1, pp. 207–214.
- Gilbert, P., Havenstrite, K., Magnusson, K., Sacco, A., Leonardi, N., Kraft, P., Nguyen, N., Thrun, S., Lutolf, M. and Blau, H. (2011) 'Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture', *Science*, 329(5995), pp. 1078–1081. doi: 10.1126/science.1191035.Substrate.
- Goldring, K., Jones, G. E., Thiagarajah, R. and Watt, D. J. (2002) 'The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro.', *Journal of cell science*, 115(Pt 2), pp. 355–66. doi: 10.1083/jcb.91.2.568.
- Goldring, K., Jones, G. E. and Watt, D. J. (2000) 'A factor implicated in the myogenic conversion of nonmuscle cells derived from the mouse dermis', *Cell Transplantation*, 9(4), pp. 519–529.
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S. and Mulligan, R. C. (1996) 'Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo', *The Journal of Experimental Medicine*, 183(April), pp. 1797–1806.
- Gopinath, S. D., Webb, A. E., Brunet, A. and Rando, T. A. (2014) 'FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of self-renewal', *Stem Cell Reports*. The Authors, 2(4), pp. 414–426. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.02.002.
- Gottrup, F., Ågren, M. S. and Karlsmark, T. (2000) 'Models for use in wound healing research: A survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue', *Wound Repair and Regeneration*, 8(2), pp. 83–96. doi: 10.1046/j.1524-475X.2000.00083.x.

- Goulding, M., Lumsden, A. and Paquette, A. J. (1994) 'Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development', *Development*, 120, pp. 957–971.
- Le Grand, F., Jones, A. E., Seale, V., Scimè, A. and Rudnicki, M. A. (2009) 'Wnt7a Activates the Planar Cell Polarity Pathway to Drive the Symmetric Expansion of Satellite Stem Cells', *Cell Stem Cell*. Elsevier Ltd, 4(6), pp. 535–547. doi: 10.1016/j.stem.2009.03.013.
- Gräs, S., Klarskov, N. and Lose, G. (2014) 'Intraurethral injection of autologous minced skeletal muscle: A simple surgical treatment for stress urinary incontinence', *Journal of Urology*. Elsevier Ltd, 192(3), pp. 850–855. doi: 10.1016/j.juro.2014.04.005.
- Graziotti, G. H., Ríos, C. M. and Rivero, J. L. (2001) 'Evidence for Three Fast Myosin Heavy Chain Isoforms in Type II Skeletal Muscle Fibers in the Adult Llama (Lama glama)', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49(8), pp. 1033–1044.
- Greenberg, S. A. and Walsh, R. J. (2005) 'Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part I: Genetic determinants of inherited disease and their laboratory detection', *Muscle and Nerve*, 31(4), pp. 418–430. doi: 10.1002/mus.20278.
- Greenwood, J. E. (2010) 'Function of the panniculus carnosus--a hypothesis.', *The Veterinary record*, 167(19), p. 760. doi: 10.1136/vr.c6210.
- Gromova, A., Tierney, M. T. and Sacco, A. (2015) 'FACS-based Satellite Cell Isolation From Mouse Hind Limb Muscles.', *Bio-protocol*, 5(16), pp. 1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27668269>.
- Gros, J., Manceau, M., Thomé, V. and Marcelle, C. (2005) 'A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells', *Nature*, 435(June). doi: 10.1038/nature03572.
- Grounds, M. D. (2008) 'Complexity of extracellular matrix and skeletal muscle regeneration', in Media, S. S. & B. (ed.) *Skeletal Muscle Repair and Regeneration*.
- Grouselle, M., Koenig, J., Lascombe, M. L., Chapron, J., Méléard, P. and Georgescauld, D. (1991) 'Fura-2 imaging of spontaneous and electrically induced oscillations of intracellular free Ca²⁺ in rat myotubes', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 418(1–2), pp. 40–50. doi: 10.1007/BF00370450.
- Guimarães-Camboa, N., Cattaneo, P., Sun, Y., Moore-Morris, T., Gu, Y., Dalton, N. D., Rockenstein, E., Masliah, E., Peterson, K. L., Stallcup, W. B., Chen, J. and Evans, S. M. (2017) 'Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo', *Cell Stem Cell*, 20(3), p. 345–359.e5. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.006.
- Günschmann, C., Chiticariu, E., Garg, B., Hiz, M. M., Mostmans, Y., Wehner, M. and Scharfenberger, L. (2014) 'Transgenic Mouse Technology in Skin Biology : Inducible Gene Knockout in Mice', *Journal of Investigative Dermatology*, 134, pp. 1–4. doi: 10.1038/jid.2014.213.
- Günther, S., Kim, J., Kostin, S., Lepper, C., Fan, C. M. and Braun, T. (2013) 'Myf5-Positive Satellite Cells Contribute to Pax7-Dependent Long-Term Maintenance of Adult Muscle Stem Cells', *Cell Stem Cell*, pp. 590–601. doi: 10.1016/j.stem.2013.07.016.
- Guo, X., Gonzalez, M., Stancescu, M., Vandeburgh, H. H. and Hickman, J. J. (2011) 'Neuromuscular junction formation between human stem cell-derived motoneurons and human skeletal muscle in a defined system', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 32(36), pp. 9602–9611. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.014.
- Guo, X., Greene, K., Akanda, N., Smith, A., Stancescu, M., Lambert, S., Vandeburgh, H. and Hickman, J. (2014) 'In vitro Differentiation of Functional Human Skeletal Myotubes in a Defined System.', *Biomaterials science*, 2(1), pp. 131–138. doi: 10.1039/C3BM60166H.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M. and Mulligan, R. C. (1999) 'Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation', *Nature*, 401(6751), pp. 390–394. doi: 10.1038/43919.

- Gutiérrez-Rivera, A., Iribar, H., Tuneu, A. and Izeta, A. (2012) 'Skin-Derived Precursor Cells as an In Vitro Modelling Tool for the Study of Type 1 Neurofibromatosis', *Stem Cells International*, 2012, pp. 1–9. doi: 10.1155/2012/646725.
- Hall, J. E. (2016) *Tratado de fisiología médica*. 13th edn. Elsevier.
- Hamrick, M. W., McGee-Lawrence, M. E. and Frechette, D. M. (2016) 'Fatty Infiltration of Skeletal Muscle: Mechanisms and Comparisons with Bone Marrow Adiposity', *Frontiers in Endocrinology*, 7(June), pp. 1–7. doi: 10.3389/fendo.2016.00069.
- Hansen, J. T. (2002) *Essential Anatomy Dissector: Following Grant's Method*. Edited by Lippincott Williams & Wilkins.
- Harman, D. (2003) 'The free radical theory of aging', *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(5), pp. 557–561.
- Harrison, R. G. (1907) 'Observations on the living Developing Nerve', *The Anatomical Record*, 116(June), pp. 116–128.
- Hartley, R. S. and Yablonka-Reuveni, Z. (2014) 'Long-term maintenance of primary myogenic cultures on a reconstituted basement membrane', 26(10), pp. 955–961.
- Hauschka, S. D. and Konigsberg, I. R. (1966) 'The influence of collagen on the development of muscle clones.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(1), pp. 119–126. doi: 10.1073/pnas.55.1.119.
- Hawke, T. J. and Garry, D. J. (2001) 'Myogenic satellite cells. Physiology to molecular biology', *Journal of Applied Physiology*, 91, pp. 534–551.
- Haycock, J. W. (2011) '3D Cell Culture: A review of current approaches and techniques', in *3D Cell Culture: Methods and Protocols*, pp. 1–15. doi: 10.1007/978-1-60761-984-0.
- Heffner, C. S., Herbert Pratt, C., Babiuk, R. P., Sharma, Y., Rockwood, S. F., Donahue, L. R., Eppig, J. T. and Murray, S. A. (2012) 'Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 3, p. 1218. doi: 10.1038/ncomms2186.
- Hogrel, J. Y., Zagnoli, F., Canal, A., Fraysse, B., Bouchard, J. P., Skuk, D., Fardeau, M. and Tremblay, J. P. (2013) 'Assessment of a symptomatic Duchenne muscular dystrophy carrier 20years after myoblast transplantation from her asymptomatic identical twin sister', *Neuromuscular Disorders*, 23(7), pp. 575–579. doi: 10.1016/j.nmd.2013.04.007.
- Holstege, G. and Blok, B. F. (1989) 'Descending pathways to the cutaneous trunci muscle motoneuronal cell group in the cat', *Journal of Neurophysiology*, 62(6).
- Hosoyama, T., Meyer, M. G., Krakora, D. and Suzuki, M. (2013) 'Isolation and in vitro propagation of human skeletal muscle progenitor cells from fetal muscle', *Cell Biology International*, 37(2), pp. 191–196. doi: 10.1002/cbin.10026.
- Huard, J., Verreault, S., Roy, R., Tremblay, M. and Tremblay, J. P. (1994) 'High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice', *Journal of Clinical Investigation*, 93(2), pp. 586–599. doi: 10.1172/JCI117011.
- Hughes, A. F. W. and Dann, L. (1941) 'Vascular regeneration in experimental wounds and burns', *British Journal of Experimental Pathology*, 22(1), pp. 9–14.
- Hunt, D. P. J., Jahoda, C. and Chandran, S. (2009) 'Multipotent skin-derived precursors: from biology to clinical translation'. doi: 10.1016/j.copbio.2009.10.004.
- Iida, M., Katsuno, M., Nakatsuji, H., Adachi, H., Kondo, N., Miyazaki, Y., Tohnai, G., Ikenaka, K., Watanabe, H., Yamamoto, M., Kishida, K. and Sobue, G. (2015) 'Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors', *Human Molecular Genetics*, 24(2), pp. 314–329. doi: 10.1093/hmg/ddu445.
- Illa, I., León-Monzón, M. and Dalakas, M. C. (1992) 'Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells', *Annals of Neurology*, 31, pp. 46–52.

- Iribar, H., Pérez-López, V., Etxaniz, U., Gutiérrez-Rivera, A. and Izeta, A. (2017) 'Schwann Cells in the Ventral Dermis Do Not Derive from Myf5-Expressing Precursors', *Stem Cell Reports*, 9, pp. 1477–1487. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.010.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. and Speed, T. P. (2003) 'Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data', *Biostatistics*, 4(2), pp. 249–264. doi: 10.1093/biostatistics/4.2.249.
- Ivanova, A., Signore, M., Caro, N., Greene, N. D. E., Copp, A. J. and Martinez-Barbera, J. P. (2005) 'In vivo genetic ablation by Cre-mediated expression of diphtheria toxin fragment A', *Genesis*, 43(3), pp. 129–135. doi: 10.1002/gene.20162.
- Jackson, K. a, Mi, T. and Goodell, M. a (1999) 'Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25), pp. 14482–14486. doi: 10.1073/pnas.96.25.14482.
- Jedrzejczak-Silicka, M. (2017) 'History of Cell Culture', *New Insights into Cell Culture Technology*, 3, pp. 1–40. doi: 10.5772/66905.
- Joe, A. W., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F., So, L., Wang, J., Rudnicki, M. A. and Rossi, F. M. (2010) 'Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis', *Nat Cell Biol.* Nature Publishing Group, 12(2), pp. 153–163. doi: 10.1038/ncb2015.
- Jones, B. R. (2012) 'Twitch or no twitch? The cutaneous trunci reflex', *Journal of Small Animal Practice*, 53(8), pp. 431–431. doi: 10.1111/j.1748-5827.2012.01267.x.
- Jostes, B., Walther, C. and Gruss, P. (1991) 'The murine paired box gene , Pax7 , is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system', *Mechanisms of Development*, 33, pp. 27–38.
- Jung, S.-J., Lee, H., Choi, I.-J. and Lee, J.-H. (2016) 'Muscular axillary arch accompanying variation of the musculocutaneous nerve: axillary arch.', *Anatomy & cell biology*, 49(2), pp. 160–2. doi: 10.5115/acb.2016.49.2.160.
- Kaasik, P., Leisson, K., Puhke, R., Alev, K. and Seene, T. (2012) 'Characteristics of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle', *Advances in Biological Chemistry*, 2(May), pp. 77–83.
- Kalinina, N. I., Sysoeva, V. Y., Rubina, K. A., Parfenova, Y. V and Tkachuk, V. A. (2011) 'Mesenchymal stem cells in tissue engineering', *Acta Naturae*, 3(4 (11)), pp. 30–37.
- Kaplan, J. C., Hamroun, D., Rivief, F. and Bonne, G. (2016) 'The 2017 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome)', *Neuromuscular Disorders*. Elsevier B.V., 26, pp. 895–929. doi: 10.1016/j.nmd.2016.11.010.
- Kassar-Duchossoy, L. (2005) 'Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development', *Genes & ...*, 19, pp. 1426–1431. doi: 10.1101/gad.345505.1426.
- Kayalioglu, G., Altay, B., Uyaroglu, F. G., Bademkiran, F., Uludag, B. and Ertekin, C. (2008) 'Morphology and innervation of the human cremaster muscle in relation to its function', *Anatomical Record*, 291(7), pp. 790–796. doi: 10.1002/ar.20711.
- Ke, T., Yang, M., Mao, D., Zhu, M., Che, Y., Kong, D. and Li, C. (2015) 'Co-transplantation of skin-derived precursors and collagen sponge facilitates diabetic wound healing by promoting local vascular regeneration', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37, pp. 1725–1737. doi: 10.1159/000438537.
- Kelvin, D. J., Simard, G. and Connolly, J. A. (1989) 'FGF and EGF act synergistically to induce proliferation in BC3H1 myoblasts', *Journal of Cellular Physiology*, 138(2), pp. 267–272. doi: 10.1002/jcp.1041380207.
- Khodabukus, A. and Baar, K. (2012) 'Defined Electrical Stimulation Emphasizing Excitability for the Development and Testing of Engineered Skeletal Muscle', *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18(5), pp. 349–357. doi: 10.1089/ten.tec.2011.0364.

- Kiefer, J. C. and Hauschka, S. D. (2001) 'Myf-5 is transiently expressed in nonmuscle mesoderm and exhibits dynamic regional changes within the presegmented mesoderm and somites I – IV', *Developmental Biology*, 232, pp. 77–90. doi: 10.1006/dbio.2000.0114.
- Kinoshita, I., Vilquin, J.-T., Guerette, B., Asselin, I., Roy, R. and Tremblay, J. P. (1994) 'Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression', *Muscle and Nerve*, 17(December), pp. 1407–1415.
- Klimczak, A. and Kozłowska, U. (2016) 'Mesenchymal stromal cells and tissue-specific progenitor cells: Their role in tissue homeostasis', *Stem Cells International*, 2016. doi: 10.1155/2016/4285215.
- Klumpp, D., Horch, R. E., Kneser, U. and Beier, J. P. (2010) 'Engineering skeletal muscle tissue - new perspectives in vitro and in vivo', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(11), pp. 2622–2629. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01183.x.
- Knight, E. and Przyborski, S. (2015) 'Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro', *Journal of Anatomy*, 227(6), pp. 746–756. doi: 10.1111/joa.12257.
- Kobayashi, T. and Askanas, V. (1985) 'Acetylcholine receptors and acetylcholinesterase accumulate at the nerve contacts of de novo grown human monolayer muscle co-cultured with fetal spinal cord', *Experimental Neurology*, 88, pp. 327–355.
- König, H. E. and Bragulla, H. (2007) *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook and Colour Atlas*. Edited by Schattauer Verlag.
- Kopan, R., Nye, J. S. and Weintraub, H. (1994) 'The intracellular domain of mouse Notch : a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD', *Development*, 120, pp. 2385–2396.
- Korthuis, R. J. (2011) *Skeletal Muscle Circulation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.
- Kostallari, E., Baba-Amer, Y., Alonso-Martin, S., Ngoh, P., Relaix, F., Lafuste, P. and Gherardi, R. K. (2015) 'Pericytes in the myovascular niche promote post-natal myofiber growth and satellite cell quiescence', *Development*, 142(7), pp. 1242–1253. doi: 10.1242/dev.115386.
- Kuang, S., Gillespie, M. A. and Rudnicki, M. A. (2008) 'Niche Regulation of Muscle Satellite Cell Self-Renewal and Differentiation', *Cell Stem Cell*, 2(1), pp. 22–31. doi: 10.1016/j.stem.2007.12.012.
- Kuang, S., Kuroda, K., Grand, F. Le and Rudnicki, M. (2007) 'Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle', *Cell*, 129(5), pp. 999–1010. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.044.Asymmetric.
- Kühl, U., Öcalan, M., Timpl, R. and von der Mark, K. (1986) 'Role of laminin and fibronectin in selecting myogenic versus fibrogenic cells from skeletal muscle cells in vitro', *Developmental Biology*, 117(2), pp. 628–635. doi: 10.1016/0012-1606(86)90331-3.
- Kwan, P. (2013) 'Sarcopenia, a neurogenic syndrome?', *Journal of Aging Research*, 2013. doi: 10.1155/2013/791679.
- Kwee, B. J. and Mooney, D. J. (2017) 'Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 47, pp. 16–22. doi: 10.1016/j.copbio.2017.05.003.
- Kwok, C. K., Tam, P. K. and Ngan, E. S. (2013) 'Potential use of skin-derived precursors (SKPs) in establishing a cell-based treatment model for', *Journal of Pediatric Surgery*. Elsevier Inc., 48(3), pp. 619–628. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.08.026.
- LaBarge, M. A. and Blau, H. M. (2002) 'Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fibers in response to injury', *Cell*, 111, pp. 589–601.
- Landi, F., Calvani, R., Cesari, M., Tosato, M., Martone, A. M., Bernabei, R., Onder, G. and Marzetti, E. (2015) 'Sarcopenia as the Biological Substrate of Physical Frailty', *Clinics in Geriatric Medicine*, 31(3), pp. 367–374. doi: 10.1016/j.cger.2015.04.005.

- Lang, T., Streeper, T., Cawthon, P., Baldwin, K., Taaffe, D. R. and Harris, T. B. (2010) 'Sarcopenia: Etiology, clinical consequences, intervention, and assessment', *Osteoporosis International*, 21(4), pp. 543–559. doi: 10.1007/s00198-009-1059-y.
- Langworthy, O. R. (1924) 'The panniculus carnosus in cat and dog and its genetical relation to the pectoral musculature', *Journal of Mammalogy*, 5(1), pp. 49–63. doi: 10.1644/859.1.Key.
- Langworthy, O. R. (1925) 'A morphological study of the panniculus carnosus and its genetical relationship to the pectoral musculature in rodents', *The American Journal of Anatomy*, 35(2).
- Langworthy, O. R. (1932) 'The panniculus carnosus and pouch musculature of the opossum, a marsupial', *Journal of Mammalogy*, 13(3), pp. 241–251. doi: 10.1644/859.1.Key.
- Lanza, R., Langer, R. and Vacanti, J. P. (2011) *Principles of Tissue Engineering*. 3rd edn. Academic Press.
- Laterza, O. F., Lim, L., Garrett-engele, P. W., Vlasakova, K., Muniappa, N., Tanaka, W. K., Johnson, J. M., Sina, J. F., Fare, T. L., Sistare, F. D. and Glaab, W. E. (2009) 'Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury', *Clinical Chemistry*, 55(11), pp. 1977–1983. doi: 10.1373/clinchem.2009.131797.
- Latil, M., Rocheteau, P., Châtre, L., Sanulli, S., Mémet, S., Ricchetti, M., Tajbakhsh, S. and Chrétien, F. (2012) 'Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity.', *Nature communications*, 3(May), p. 903. doi: 10.1038/ncomms1890.
- Lepper, C., Conway, S. and Fan, C. (2009) 'Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements', *Nature*, 460(7255), pp. 627–631. doi: 10.1038/nature08209.Adult.
- Lepper, C. and Fan, C. (2011) 'Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells', *Genesis*, 48(7), pp. 424–436. doi: 10.1002/dvg.20630.Inducible.
- Lepper, C. and Fan, C. M. (2010) 'Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells', *Genesis*, 48(7), pp. 424–436. doi: 10.1002/dvg.20630.
- Lepper, C., Partridge, T. a and Fan, C.-M. (2011) 'An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration.', *Development*, 138(17), pp. 3639–46. doi: 10.1242/dev.067595.
- Lescaudron, L., Peltékian, E., Fontaine-Pérus, J., Paulin, D., Zampieri, M., Garcia, L. and Parrish, E. (1999) 'Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant', *Neuromuscular Disorders*. doi: 10.1016/S0960-8966(98)00111-4.
- Lewis, M. R. (1915) 'Rhythmical contraction of the skeletal muscle tissue observed in tissue cultures', May.
- Li, A., Dearman, B. L., Crompton, K. E., Moore, T. G. and Greenwood, J. E. (2009) 'Evaluation of a novel biodegradable polymer for the generation of a dermal matrix.', *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*, 30(4), pp. 717–28. doi: 10.1097/BCR.0b013e3181abffca.
- Lin, H.-T., Otsu, M. and Nakauchi, H. (2013) 'Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 368(1609), pp. 1–14. doi: 10.1098/rstb.2011.0334.
- Liu, N., Garry, G. A., Li, S., Bezprozvannaya, S., Sanchez-Ortiz, E., Chen, B., Shelton, J. M., Jaichander, P., Bassel-Duby, R. and Olson, E. N. (2017) 'A Twist2-dependent progenitor cell contributes to adult skeletal muscle', *Nature Cell Biology*, 19(3), pp. 202–213. doi: 10.1038/ncb3477.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lluri, G., Langlois, G. D., McClellan, B., Soloway, P. D. and Diane, M. (2010) 'Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates neuromuscular junction development via a β 1 integrin-mediated mechanism', *Journal of Neurobiology*, 66(12), pp. 1365–1377. doi: 10.1002/neu.20315.

- Long, J. Z., Lackan, C. S. and Hadjantonakis, A. K. (2005) 'Genetic and spectrally distinct in vivo imaging: embryonic stem cells and mice with widespread expression of a monomeric red fluorescent protein', *BMC Biotechnol*, 5, p. 20. doi: 10.1186/1472-6750-5-20.
- Ma, Q., Zhou, B. and Pu, W. (2008) 'Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity', *Developmental biology*, 323(1), pp. 98–104. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.08.013.Reassessment.
- Machado, M. J. C., Watson, M. G., Devlin, A. H., Chaplain, M. A. J., Mcdougall, S. R. and Mitchell, C. A. (2011) 'Dynamics of Angiogenesis During Wound Healing: A Coupled In Vivo and In Silico Study', *Microcirculation*, 18(3), pp. 183–197. doi: 10.1111/j.1549-8719.2010.00076.x.
- Machingal, M. A., Corona, B. T., Walters, T. J., Kesireddy, V., Koval, C. N., Dannahower, A., Zhao, W., Yoo, J. J. and Christ, G. J. (2011) 'A Tissue-Engineered Muscle Repair Construct for Functional Restoration of an Irrecoverable Muscle Injury in a Murine Model', *Tissue Engineering Part A*, 17(17–18), pp. 2291–2303. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0682.
- Maesner, C. C., Almada, A. E. and Wagers, A. J. (2016) 'Established cell surface markers efficiently isolate highly overlapping populations of skeletal muscle satellite cells by fluorescence-activated cell sorting', *Skeletal Muscle*. *Skeletal Muscle*, 6(1), p. 35. doi: 10.1186/s13395-016-0106-6.
- Maley, M. a, Davies, M. J. and Grounds, M. D. (1995) 'Extracellular matrix, growth factors, genetics: their influence on cell proliferation and myotube formation in primary cultures of adult mouse skeletal muscle.', *Experimental cell research*, pp. 169–179. doi: 10.1006/excr.1995.1217.
- Mangoni, A. A. and Jackson, S. H. D. (2004) 'Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: Basic principles and practical applications', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 57(1), pp. 6–14. doi: 10.1046/j.1365-2125.2003.02007.x.
- Mantonavi, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M. (2004) 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', *Trends in Immunology*, 25(12), pp. 677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.
- Mao, D., Yao, X., Feng, G., Yang, X., Mao, L., Wang, X., Ke, T., Che, Y. and Kong, D. (2015) 'Skin-derived precursor cells promote angiogenesis and stimulate proliferation of endogenous neural stem cells after cerebral infarction', *BioMed Research International*, 2015, p. 10.
- Marbini, A., Bellanova, M. F., Ferrari, A., Lodesani, M. and Gemignani, F. (1997) 'Immunohistochemical study of merosin-negative congenital muscular dystrophy: laminin alpha 2 deficiency in skin biopsy', *Acta Neuropathol*, 94(2), pp. 103–108.
- Marbini, A., Gemignani, F., Bellanova, M. F., Guidetti, D. and Ferrari, A. (1997) 'Immunohistochemical localization of utrophin and other cytoskeletal proteins in skin smooth muscle in neuromuscular diseases (vol 143, pg 156, 1996)', *Journal of the Neurological Sciences*, 150(2), pp. 181–182.
- Marbini, A., Marcello, N., Bellanova, M. F., Guidetti, D., Ferrari, A. and Gemignani, F. (1995) 'Dystrophin expression in skin biopsy immunohistochemical localisation of striated muscle type dystrophin', *Journal of the Neurological Sciences*, 129(1), pp. 29–33. doi: 10.1016/0022-510X(94)00240-O.
- Marcus, R. L., Addison, O., Kidde, J. P., Dibble, L. E. and Lastayo, P. C. (2010) 'Skeletal muscle fat infiltration: Impact of age, inactivity, and exercise', *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 14(5), pp. 362–366. doi: 10.1007/s12603-010-0081-2.
- Martinez, F. O. and Gordon, S. (2014) 'The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment', *F1000Prime Reports*, 6(March), pp. 1–13. doi: 10.12703/P6-13.
- Matthaei, K. (2007) 'Genetically manipulated mice: a powerful tool with unsuspected caveats', *The Journal of physiology*, 2, pp. 481–488. doi: 10.1113/jphysiol.2007.134908.
- Mauro, A. (1961) 'Satellite cells of skeletal muscle fibers', *J Biophys Biochem Cytol*, 9, pp. 493–495.

- McNally, E. M. and Pytel, P. (2007) 'Muscle Diseases: The Muscular Dystrophies', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2(1), pp. 87–109. doi: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.091936.
- Menant, J. C., Weber, F., Lo, J., Sturnieks, D. L., Close, J. C., Sachdev, P. S., Brodaty, H. and Lord, S. R. (2017) 'Strength measures are better than muscle mass measures in predicting health-related outcomes in older people: time to abandon the term sarcopenia?', *Osteoporosis International*, 28(1), pp. 59–70. doi: 10.1007/s00198-016-3691-7.
- Menko, A. S. and Boettiger, D. (1987) 'Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation', *Cell*, 51(1), pp. 51–57. doi: 10.1016/0092-8674(87)90009-2.
- Mercuri, E., Pichiecchio, A., Allsop, J., Messina, S., Pane, M. and Muntoni, F. (2007) 'Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: Past, present, and future', *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 25(2), pp. 433–440. doi: 10.1002/jmri.20804.
- Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F. and Gardahaut, M. F. (1999) 'Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation', *Muscle and Nerve*, June. doi: 10.1002/(SICI)1097-4598(199906)22:6<724::AID-MUS9>3.0.CO;2-O.
- Mertens, J. P., Sugg, K. B., Lee, J. D. and Larkin, L. M. (2014) 'Engineering muscle constructs for the creation of functional engineered musculoskeletal tissue', *Regenerative Medicine*, 9(1), pp. 89–100. doi: 10.2217/rme.13.81.
- Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M. V. G., Coletta, M., Vivarelli, E., Frati, L., Cossu, G. and Giacomello, A. (2004) 'Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart', *Circulation Research*, 95(9), pp. 911–921. doi: 10.1161/01.RES.0000147315.71699.51.
- Metzger, T., Gache, V., Xu, M., Cadot, B., Folker, E. S., Richardson, B. E., Gomes, E. R. and Baylies, M. K. (2012) 'MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function', *Nature*, 484(7392), pp. 120–124. doi: 10.1038/nature10914.
- Mitchell, K. J., Pannérec, A., Cadot, B., Parlakian, A., Besson, V., Gomes, E. R., Marazzi, G. and Sassoon, D. A. (2010) 'Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(3), pp. 257–266. doi: 10.1038/ncb2025.
- Montagna, W. and Ellis, R. A. (2013) *The Biology of Hair Growth*. Edited by Elsevier.
- Montanaro, F., Liadaki, K., Volinski, J., Flint, A. and Kunkel, L. M. (2003) 'Skeletal muscle engraftment potential of adult mouse skin side population cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), pp. 9336–9341. doi: 10.1073/pnas.1133179100.
- Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T. and Buckingham, M. (2005) 'Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration', *Science*, 309(5743), pp. 2064–2067.
- Mourkioti, F. and Rosenthal, N. (2005) 'IGF-1, inflammation and stem cells: Interactions during muscle regeneration', *Trends in Immunology*. doi: 10.1016/j.it.2005.08.002.
- Mozzetta, C., Consalvi, S., Saccone, V., Tierney, M., Diamantini, A., Mitchell, K. J., Marazzi, G., Borsellino, G., Battistini, L., Sassoon, D., Sacco, A. and Puri, P. L. (2013) 'Fibroblast progenitors mediate the ability of HDAC inhibitors to promote regeneration in dystrophic muscles of young, but not old Mdx mice', *EMBO Molecular Medicine*, 5(4), pp. 626–639. doi: 10.1002/emmm.201202096.
- Murphy, M., Drago, J. and Bartlett, P. F. (1990) 'Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro', *Journal of Neuroscience Research*, 25(4), pp. 463–475. doi: 10.1002/jnr.490250404.
- Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A. and Kardon, G. (2011) 'Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration', *Development*, 138(17), pp. 3625–3637. doi: 10.1242/dev.064162.
- Musarò, A. (2014) 'The basis of muscle regeneration', *Advances in Biology*, 2014, p. 16.

- Mutsaers, S. E., Bishop, J. E., McGrouther, G. and Laurent, G. J. (1997) 'Mechanism of tissue repair: from wound healing to fibrosis', *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 29(1), pp. 5–17.
- Muzumdar, M., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. and Luo, L. (2007) 'A global double-fluorescent Cre reporter mouse', *Genesis*, 605(September), pp. 593–605. doi: 10.1002/dvg.
- Nandan, D., Clarke, E. P., Ball, E. H. and Sanwal, B. D. (1990) 'Ethyl-3,4-dihydroxybenzoate Inhibits Myoblast Differentiation: Evidence for an Essential Role of Collagen', *The Journal of Cell Biology*, 110(May), pp. 1673–1679.
- Narici, M. V. and Maffulli, N. (2010) 'Sarcopenia: Characteristics, mechanisms and functional significance', *British Medical Bulletin*, 95(1), pp. 139–159. doi: 10.1093/bmb/ldq008.
- Navre, M. and Ringold, G. M. (1989) 'Differential effects of fibroblast growth factor and tumor promoters on the initiation and maintenance of adipocyte differentiation.', *The Journal of cell biology*, 109(4 Pt 1), pp. 1857–63.
- Negróni, E., Butler-Browne, G. S. and Mouly, V. (2006) 'Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle', *Pathologie Biologie*, 54(2), pp. 100–108. doi: 10.1016/j.patbio.2005.09.001.
- Negróni, E., Gidaro, T., Bigot, A., Butler-Browne, G. S., Mouly, V. and Trollet, C. (2015) 'Invited review: Stem cells and muscle diseases: Advances in cell therapy strategies', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 41(3), pp. 270–287. doi: 10.1111/nan.12198.
- Niiyama, T., Higuchi, I., Sakoda, S., Matsumura, T., Fukunaga, H. and Osame, M. (2002) 'Diagnosis of dystrophinopathy by skin biopsy', *Muscle and Nerve*, 25(3), pp. 398–401. doi: 10.1002/mus.10040.
- Nomura, T., Ashihara, E., Tateishi, K., Asada, S., Ueyama, T., Takahashi, T., Matsubara, H. and Oh, H. (2007) 'Skeletal myosphere-derived progenitor cell transplantation promotes neovascularization in d-sarcoglycan knockdown cardiomyopathy', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(3), pp. 668–674. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.097.
- Nomura, T., Ashihara, E., Tateishi, K., Ueyama, T., Takahashi, T., Yamagishi, M., Kubo, T., Yaku, H., Matsubara, H. and Oh, H. (2007) 'Therapeutic potential of stem/progenitor cells in human skeletal muscle for cardiovascular regeneration', *Current Stem Cell Research and Therapy*, 2(4), pp. 293–300. doi: 10.2174/157488807782793808.
- Ogata, T., Ueyama, T., Nomura, T., Asada, S., Tagawa, M., Nakamura, T., Takahashi, T., Matsubara, H. and Oh, H. (2007) 'Osteopontin is a myosphere-derived secretory molecule that promotes angiogenic progenitor cell proliferation through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(2), pp. 341–347. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.104.
- Olguin, H. C. and Olwin, B. B. (2004) 'Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: A potential mechanism for self-renewal', *Developmental Biology*, 275(2), pp. 375–388. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.08.015.
- Orimo, S., Hiyamatu, E., Arahata, K. and Sugita, H. (1991) 'Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupicavine-induced myonecrosis', *Muscle and Nerve*, 14(June), pp. 515–520.
- Osses, N. and Brandan, E. (2002) 'ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression', *American journal of physiology. Cell physiology*, 282(2), pp. C383–C394. doi: 10.1152/ajpcell.00322.2001.
- Ostrovodov, S., Hosseini, V., Ahadian, S., Fujie, T., Parthiban, S. P., Ramalingam, M., Bae, H., Kaji, H. and Khademhosseini, A. (2014) 'Skeletal Muscle Tissue Engineering: Methods to Form Skeletal Myotubes and Their Applications', *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 20(5), pp. 403–436. doi: 10.1089/ten.teb.2013.0534.
- Ozderdem, U. and Grako, K. (2001) 'NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis', *Developmental dynamics*, 227(June), pp. 218–227. doi: 10.1002/dvdy.1200.
- Pai, A. C. (1965) 'Developmental genetics of a lethal mutation, muscular dysgenesis (mdg), in the mouse', *Developmental Biology*, 11(1), pp. 82–92. doi: 10.1016/0012-1606(65)90038-2.

- Pampaloni, F., Reynaud, E. G. and Stelzer, E. H. K. (2007) 'The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), pp. 839–845. doi: 10.1038/nrm2236.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R. and Sáez, F. J. (2007) *Citología e histología vegetal y animal*. Cuarta. McGraw-Hill - Interamericana.
- Pannerec, A., Formicola, L., Besson, V., Marazzi, G. and Sassoon, D. A. (2013) 'Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials', *Development*, 140(14), pp. 2879–2891. doi: 10.1242/dev.089326.
- Pantelouris, E. M. (1968) 'Absence of thymus in a mouse mutant', *Nature*, 217.
- Partridge, T. (2000) 'The current status of myoblast transfer.', *Neurological sciences*, 21(5 Suppl), pp. S939-42. doi: 10.1007/s100720070007.
- Partridge, T. A., Morgan, J. E., Coulton, G. R., Hoffman, E. P. and Kunkel, L. M. (1989) 'Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts.pdf', *Nature*, 337(12).
- Pavletic, M. M. (2011) *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. 3rd edn. Edited by John Wiley & Sons.
- Péault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J. P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L. M. and Huard, J. (2007) 'Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy', *Molecular Therapy*. The American Society of Gene Therapy, 15(5), pp. 867–877. doi: 10.1038/mt.sj.6300145.
- Périé, S., Trollet, C., Mouly, V., Vanneaux, V., Mamchaoui, K., Bouazza, B., Marolleau, J. P., Laforêt, P., Chapon, F., Eymard, B., Butler-Browne, G., Larghero, J. and St Guily, J. L. (2014) 'Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: A phase I/IIa clinical study', *Molecular Therapy*, 22(1), pp. 219–225. doi: 10.1038/mt.2013.155.
- Perrin, W. F., Würsig, B. and Thewissen, J. G. M. (2009) *Encyclopedia of Marine Mammals*. 2nd edn. Edited by Academic Press.
- Pette, D. and Staron, R. S. (2000) 'Myosin Isoforms, Muscle Fiber Types, and Transitions', *Microscopy Research and Technique*, 509(April), pp. 500–509.
- Polesskaya, A., Seale, P. and Rudnicki, M. A. (2003) 'Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration', *Cell*, 113(7), pp. 841–852. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00437-9.
- Poulet, C., Wettwer, E., Christ, T. and Ravens, U. (2011) 'Skeletal muscle stem cells propagated as myospheres display electrophysiological properties modulated by culture conditions', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd., 50(2), pp. 357–366. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.10.011.
- Powell, C. A., Smiley, B. L., Mills, J. and Vandeburgh, H. H. (2002) 'Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle', *AJP: Cell Physiology*, 283(5), pp. C1557–C1565. doi: 10.1152/ajpcell.00595.2001.
- Price, F. D., Kuroda, K. and Rudnicki, M. A. (2007) 'Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1772(2), pp. 272–283. doi: 10.1016/j.bbdis.2006.08.011.
- Prisk, V. and Huard, J. (2003) 'Muscle injuries and repair. the role of prostaglandins and inflammation', *Histology and Histopathology*, 18(4), pp. 1243–1256. doi: 10.14670/HH-18.1243.
- Puttonen, K. A., Ruponen, M., Naumenko, N., Hovatta, O. H., Tavi, P. and Koistinaho, J. (2015) 'Generation of Functional Neuromuscular Junctions from Human Pluripotent Stem Cell Lines', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(December), pp. 1–9. doi: 10.3389/fncel.2015.00473.
- Pye, D. and Watt, D. J. (2001) 'Dermal fibroblasts participate in the formation of new muscle fibres when implanted into regenerating normal mouse muscle.', *Journal of anatomy*, 198(Pt 2), pp. 163–73. doi: 10.1017/S0021878251007186.
- Qiu, Z., Miao, C., Li, J., Lei, X. and Liu, S. (2010) 'Skeletal Myogenic Potential of Mouse Skin-Derived Precursors', *Stem cells and development*, 19(2). doi: 10.1089/scd.2009.0058.

- Randolph, M. E. and Pavlath, G. K. (2015) 'A muscle stem cell for every muscle: Variability of satellite cell biology among different muscle groups', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(OCT), pp. 1–14. doi: 10.3389/fnagi.2015.00190.
- Rangarajan, S., Madden, L. and Bursac, N. (2014) 'Use of flow, electrical, and mechanical stimulation to promote engineering of striated muscles', *Annals of Biomedical Engineering*, 42(7), pp. 1391–1405. doi: 10.1007/s10439-013-0966-4.
- Rao, L., Qian, Y., Khodabukus, A., Ribar, T. and Bursac, N. (2018) 'Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue', *Nature Communications*. Springer US, 9(1), p. 126. doi: 10.1038/s41467-017-02636-4.
- Ravenscroft, M. S., Bateman, K. E., Shaffer, K. M., Schessler, H. M., Jung, D. R., Schneider, T. W., Montgomery, C. B., Custer, T. L., Schaffner, A. E., Liu, Q. Y., Li, Y. X., Barker, J. L. and Hickman, J. J. (1998) 'Developmental neurobiology implications from fabrication and analysis of hippocampal neuronal networks on patterned silane-modified surfaces', *Journal of the American Chemical Society*, 120(47), pp. 12169–12177. doi: 10.1021/ja973669n.
- Reimann, J., Brimah, K., Schröder, R., Wernig, A., Beauchamp, J. R. and Partridge, T. A. (2004) 'Pax7 distribution in human skeletal muscle biopsies and myogenic tissue cultures', *Cell and Tissue Research*, 315(2), pp. 233–242. doi: 10.1007/s00441-003-0833-y.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A. and Buckingham, M. (2006) 'Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells', *Journal of Cell Biology*, 172(1), pp. 91–102. doi: 10.1083/jcb.200508044.
- Relaix, F. and Polimeni, M. (2003) 'The transcriptional activator PAX3-FKHR rescues the defects of Pax3 mutant mice but induces a myogenic gain-of-function phenotype with ligand-independent', *Genes & Development*, 17, pp. 2950–2965. doi: 10.1101/gad.281203.the.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A. and Buckingham, M. (2005) 'A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells.', *Nature*, 435(7044), pp. 948–53. doi: 10.1038/nature03594.
- Relaix, F. and Zammit, P. S. (2012) 'Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage', *Development*, 139(16), pp. 2845–2856. doi: 10.1242/dev.069088.
- Relvas, J. B., Aldridge, H., Wells, K. E., Wells, D. J. and Watt, D. J. (1997) 'Exogenous genes are expressed in mdx muscle fibres following the implantation of primary mouse skin cells', *Basic and Applied Myology*, 7(3–4), pp. 211–219.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S. (1992) 'Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System', *Science*, 27(March), pp. 1707–1710.
- Rittié, L. (2016) 'Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals', *Journal of Cell Communication and Signaling*. Journal of Cell Communication and Signaling, 10(2), pp. 103–120. doi: 10.1007/s12079-016-0330-1.
- Robson, L. G., Foggia, V., Radunovic, A., Bird, K., Zhang, X. and Marino, S. (2011) 'Bmi1 is expressed in postnatal myogenic satellite cells, controls their maintenance and plays an essential role in repeated muscle regeneration', *PLoS ONE*, 6(11). doi: 10.1371/journal.pone.0027116.
- Romanazzo, S., Forte, G., Ebara, M., Uto, K., Pagliari, S., Aoyagi, T., Traversa, E. and Taniguchi, A. (2012) 'Substrate stiffness affects skeletal myoblast differentiation *in vitro*', *Science and Technology of Advanced Materials*, 13(6), p. 64211. doi: 10.1088/1468-6996/13/6/064211.
- Rønning, S. B., Carlson, C. R., Stang, E., Kolset, S. O., Hollung, K. and Pedersen, M. E. (2015) 'Syndecan-4 Regulates Muscle Differentiation and Is Internalized from the Plasma Membrane during Myogenesis.', *PloS one*, 10(6), p. e0129288. doi: 10.1371/journal.pone.0129288.
- Rosenberg, I. H. (1997) 'Sarcopenia: Diagnosis and Mechanisms Sarcopenia: Assessment of Muscle Mass 1', *The Journal of Nutrition*, 127, pp. 994–997.
- Rossant, J. and McMahon, A. (1999) 'genetics "' Cre "' -ating mouse mutants — a meeting review on conditional mouse genetics', *Genes & development*, 13, pp. 142–145.

- Rossi, C. A., Flaibani, M., Blaauw, B., Pozzobon, M., Figallo, E., Reggiani, C., Vitiello, L., Elvassore, N. and De Coppi, P. (2011) 'In vivo tissue engineering of functional skeletal muscle by freshly isolated satellite cells embedded in a photopolymerizable hydrogel', *The FASEB Journal*, 25(7), pp. 2296–2304. doi: 10.1096/fj.10-174755.
- Rossi, M. I., Barros, A. P., Baptista, L. S., Garzoni, L. R., Meirelles, M. N., Takiya, C. M., Pascarelli, B. M., Dutra, H. S. and Borojevic, R. (2005) 'Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional in vitro culture system for the study of hematopoietic cell migration', *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38(10), pp. 1455–1462. doi: 10.1590/S0100-879X2005001000002.
- Rudnicki, M. A., Schlegelsberg, P. N. J., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. and Jaenisch, R. (1993) 'MyoD or Myf-5 Is Required for the Formation of Skeletal Muscle', 75, pp. 1351–1359.
- Rufaut, N. W., Goldthorpe, N. T., Wildermoth, J. E. and Wallace, O. A. M. (2006) 'Myogenic differentiation of dermal papilla cells from bovine skin', *The Journal of experimental zoology*, 209, pp. 959–966. doi: 10.1002/jez.1401940110.
- Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S. and Blau, H. M. (2008) 'Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells', *Nature*, 456(7221), pp. 502–506. doi: 10.1038/nature07384.
- Saitoh, O., Periasamy, M., Kan, M. and Matsuda, R. (1992) 'Cis-4-hydroxy-L-proline and ethyl-3,4-dihydroxybenzoate prevent myogenesis of C2C12 muscle cells and block myoD1 and myogenin expression', *Experimental Cell Research*, 200(1), pp. 70–76. doi: 10.1016/S0014-4827(05)80072-2.
- Sajko, S., Kubínová, L., Cvetko, E., Kreft, M., Wernig, A. and Erzen, I. (2004) 'Frequency of M-cadherin-stained satellite cells declines in human muscles during aging.', *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 52(2), pp. 179–85. doi: 10.1177/002215540405200205.
- Salvatori, G., Lattanzi, L., Coletta, M., Aguanno, S., Vivarelli, E., Kelly, R., Ferrari, G., Harris, a J., Mavilio, F. and Molinaro, M. (1995) 'Myogenic conversion of mammalian fibroblasts induced by differentiating muscle cells.', *Journal of cell science*, 108 (Pt 8, pp. 2733–2739.
- Sambasivan, R., Comai, G., Le Roux, I., Gomès, D., Konge, J., Dumas, G., Cimper, C. and Tajbakhsh, S. (2013) 'Embryonic founders of adult muscle stem cells are primed by the determination gene Mrf4.', *Developmental biology*. Elsevier, 381(1), pp. 241–55. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.04.018.
- Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpfennig, a., Van Wittenberghe, L., Paldi, a., Gayraud-Morel, B., Guenou, H., Malissen, B., Tajbakhsh, S. and Galy, a. (2011) 'Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration', *Development*, 138(19), pp. 4333–4333. doi: 10.1242/dev.073601.
- Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J. L., Galvez, B. G., Barthélémy, I., Perani, L., Mantero, S., Guttinger, M., Pansarasa, O., Rinaldi, C., Cusella De Angelis, M. G., Torrente, Y., Bordignon, C., Bottinelli, R. and Cossu, G. (2006) 'Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs', *Nature*, 444(7119), pp. 574–579. doi: 10.1038/nature05282.
- Sanchez-Gurmaches, J. and Guertin, D. A. (2014a) 'Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1842(3), pp. 340–351. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.05.027.
- Sanchez-Gurmaches, J. and Guertin, D. A. (2014b) 'Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5(May), pp. 1–13. doi: 10.1038/ncomms5099.
- Sánchez-Yus, E. and Simón, P. (2000) 'Striated muscle: A normal component of the dermis and subcutis in many areas of the face', *American Journal of Dermatopathology*, 22(6), pp. 503–509. doi: 10.1097/00000372-200012000-00004.
- Sangiorgi, E. and Capecchi, M. R. (2008) 'Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells', *Nature Genetics*, 40(7), pp. 915–920. doi: 10.1038/ng.165.
- Sappey, P. C. (1838) *Tratado de anatomía descriptiva*. Bailly-Baillière, Carlos.

- Sarig, R., Baruchi, Z., Fuchs, O., Nudel, U. and Yaffe, D. (2006) 'Regeneration and Transdifferentiation Potential of Muscle-Derived Stem Cells Propagated as Myospheres', *Stem Cells*, 24(7), pp. 1769–1778. doi: 10.1634/stemcells.2005-0547.
- Sartore, S., Gorza, L. and Schiaffino, S. (1982) 'Fetal myosin heavy chains in regenerating muscle', *Nature*, 298(July).
- Schiaffino, S., Rossi, A. C., Smerdu, V., Leinwand, L. A. and Reggiani, C. (2015) 'Developmental myosins: expression patterns and functional significance.', *Skeletal muscle*. *Skeletal Muscle*, 5, p. 22. doi: 10.1186/s13395-015-0046-6.
- Schmalbruch, H. (1976) 'The number of satellite cells in normal human muscle', *The Anatomical Record*, 186, pp. 279–288.
- Schmalbruch, H. (1977) 'The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells', *The Anatomical Record*, 185, pp. 169–176.
- Schmalbruch, H. (1985) *Skeletal Muscle*. Springer Berlin Heidelberg New York Tokyo. doi: 10.1007/978-3-642-82551-4.
- Schmalbruch, H. (2006) 'The satellite cell of skeletal muscle fibres', *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 23(2), pp. 159–172.
- Schofield, D., Alam, K., Douglas, L., Shrestha, R., MacArthur, D. G., Davis, M., Laing, N. G., Clarke, N. F., Burns, J., Cooper, S. T., North, K. N., Sandaradura, S. A. and O'Grady, G. L. (2017) 'Cost-effectiveness of massively parallel sequencing for diagnosis of paediatric muscle diseases', *npj Genomic Medicine*, 2(1), p. 4. doi: 10.1038/s41525-017-0006-7.
- Schubert, W., Zimmermann, K., Cramer, M. and Starzinski-Powitz, a (1989) 'Lymphocyte antigen Leu-19 as a molecular marker of regeneration in human skeletal muscle.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(1), pp. 307–311. doi: 10.1073/pnas.86.1.307.
- Scott, W., Stevens, J. and Binder-macleod, S. A. (2001) 'Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications', *Physical Therapy*, 81(11), pp. 1810–1816.
- Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L. M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D. and Spiegelman, B. M. (2007) 'Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16', *Cell Metabolism*, 6(1), pp. 38–54. doi: 10.1016/j.cmet.2007.06.001.
- Seale, P. and Rudnicki, M. A. (2000) 'A New Look at the Origin, Function, and " Stem-Cell " Status of Muscle Satellite Cells', *Developmental Biology*, 218, pp. 115–124. doi: 10.1006/dbio.1999.9565.
- Serrero, G. and Mills, D. (1991) 'Physiological role of epidermal growth factor on adipose tissue development in vivo.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), pp. 3912–3916. doi: 10.1073/pnas.88.9.3912.
- Shadrin, I. Y., Khodabukus, A. and Bursac, N. (2016) 'Striated muscle function, regeneration, and repair', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 73(22), pp. 4175–4202. doi: 10.1007/s00018-016-2285-z.
- Shamir, E. R. and Ewald, A. J. (2014) 'Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(10), pp. 647–664. doi: 10.1038/nrm3873.
- Sharma, M. C. (2012) 'Skin biopsy as an alternative to muscle biopsy for the diagnosis of Ullrich congenital muscular dystrophy', *Journal of Pediatric Neurology*, 10(3), pp. 173–180. doi: 10.3233/JPN-2012-0562.
- Shea, K. L., Xiang, W., LaPorta, V. S., Licht, J. D., Keller, C., Basson, M. A. and Brack, A. S. (2010) 'Sprouty1 Regulates Reversible Quiescence of a Self-Renewing Adult Muscle Stem Cell Pool during Regeneration', *Cell Stem Cell*. Elsevier Ltd, 6(2), pp. 117–129. doi: 10.1016/j.stem.2009.12.015.
- Shefer, G., Wlekinski-Lee, M. and Yablonka-Reuveni, Z. (2004) 'Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway', *Journal of Cell Science*, 117(22), pp. 5393–5404. doi: 10.1242/jcs.01419.

- Sherwood, R. I., Christensen, J. L., Weissman, I. L. and Wagers, A. J. (2004) 'Determinants of Skeletal Muscle Contributions from Circulating Cells, Bone Marrow Cells, and Hematopoietic Stem Cells', *Stem Cells*, 22(7), pp. 1292–1304. doi: 10.1634/stemcells.2004-0090.
- Shi, C., Zhu, Y., Su, Y. and Cheng, T. (2006) 'Stem cells and their applications in skin-cell therapy', *Trends in Biotechnology*, 24(1), pp. 48–52. doi: 10.1016/j.tibtech.2005.11.003.
- Shimada, Y., Fischman, D. A. and Moscona, A. A. (1969) 'Formation of neuromuscular junctions in embryonic cell cultures', *Zoology*, January 22.
- Sienkiewicz, D., Kulak, W., Okurowska-Zawada, B., Paszko-Patej, G. and Kawnik, K. (2015) 'Duchenne muscular dystrophy: current cell therapies', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 8(4), pp. 166–177. doi: 10.1177/1756285615586123.
- Singh, V. (2014) *Textbook of Anatomy Abdomen and Lower Limb*. 2nd edn. Edited by E. H. Sciences. Elsevier India.
- Sirabella, D., Angelis, L. De and Berghella, L. (2013) 'Sources for skeletal muscle repair: from satellite cells to reprogramming', *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 4, pp. 125–136. doi: 10.1007/s13539-012-0098-y.
- Sisakht, M. M., Kheirkhah, M. S., Sharifzad, F. and Ali, M. (2015) 'Skin Stem Cells in Skin Cell Therapy', 2(4), pp. 7–10. doi: 10.17795/jssc38698.Review.
- Skuk, D. (2013) 'Cell Transplantation and "Stem Cell Therapy" in the Treatment of Myopathies: Many Promises in Mice, Few Realities in Humans', *ISRN Transplantation*, 2013, pp. 1–25. doi: 10.5402/2013/582689.
- Skuk, D., Caron, N., Goulet, M., Roy, B., Espinosa, F. and Tremblay, J. P. (2002) 'Dynamics of the early immune cellular reactions after myogenic cell transplantation', *Cell Transplantation*, 11(7), pp. 671–681. doi: 10.3727/000000002783985378.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Chapdelaine, P., Bouchard, J.-P., Roy, R., Dugré, F. J., Sylvain, M., Lachance, J.-G., Deschênes, L., Senay, H. and Tremblay, J. P. (2006) 'Dystrophin Expression in Muscles of Duchenne Muscular Dystrophy Patients After High-Density Injections of Normal Myogenic Cells', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(4), pp. 371–386. doi: 10.1097/01.jnen.0000218443.45782.81.
- Skuk, D., Paradis, M., Goulet, M., Chapdelaine, P., Rothstein, D. M. and Tremblay, J. P. (2010) 'Intramuscular transplantation of human postnatal myoblasts generates functional donor-derived satellite cells', *Molecular Therapy*. Nature Publishing Group, 18(9), pp. 1689–1697. doi: 10.1038/mt.2010.128.
- Slatter, D. H. (2003) *Textbook of Small Animal Surgery, Volumen 1*. Edited by E. H. Sciences.
- Sloane, E. (2002) *Biology of women*. Cengage Learning.
- Smaldone, M. C. and Chancellor, M. B. (2008) 'Muscle derived stem cell therapy for stress urinary incontinence', *World Journal of Urology*, 26(4), pp. 327–332. doi: 10.1007/s00345-008-0269-9.
- Smith, A. S. T., Davis, J., Lee, G., Mack, D. L. and Kim, D. H. (2016) 'Muscular dystrophy in a dish: engineered human skeletal muscle mimetics for disease modeling and drug discovery', *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, 21(9), pp. 1387–1398. doi: 10.1016/j.drudis.2016.04.013.
- Smith, C. K. 2nd, Janney, M. J. and Allen, R. E. (1994) 'Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells.', *Journal of cellular physiology*, 159(2), pp. 379–385. doi: 10.1002/jcp.1041590222.
- Smolina, N., Kostareva, A., Bruton, J., Karpushev, A., Sjoberg, G. and Sejersen, T. (2015) 'Primary Murine Myotubes as a Model for Investigating Muscular Dystrophy.', *BioMed research international*, 2015, p. 594751. doi: 10.1155/2015/594751.
- Snowden, J. M., Kennedy, D. F. and Cliff, W. J. (1982) 'Wound contraction. The effects of scab formation and the nature of the wound bed.', *The Australian journal of experimental biology and medical science*, 60(Pt 1), pp. 73–82.

- Somuncu, O. S., Kasikci, E., Somuncu, S., Tasli, P. N. and Sahin, F. (2016) 'Myogenic differentiation potential of human newborn foreskin stem cells combined with polycaprolactone-based nanofiber', *Journal of Skin and Stem Cell*. doi: 10.5812/jssc.44923.Research.
- Somuncu, Ö. S., Taşlı, P. N., Şişli, H. B., Somuncu, S. and Şahin, F. (2015) 'Characterization and Differentiation of Stem Cells Isolated from Human Newborn Foreskin Tissue', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(5), pp. 1040–1054. doi: 10.1007/s12010-015-1795-8.
- Son, E., Ichida, J., Wainger, B. and Toma, J. (2011) 'Conversion of Mouse and Human Fibroblasts into Functional Spinal Motor Neurons', *Cell stem cell*, 9(3), pp. 205–218. doi: 10.1016/j.stem.2011.07.014.Conversion.
- Sonnet, C., Lafuste, P., Arnold, L., Brigitte, M., Poron, F., Authier, F. J., Chrétien, F., Gherardi, R. K. and Chazaud, B. (2006) 'Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems', *Journal of Cell Science*, 119, pp. 2497–2507.
- Soriano, P. (1999) 'Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain', *Nature Genetics*, 21. doi: DOI: 10.1038/5007.
- Sorichter, S., Mair, J., Koller, A., Muller, E., Kremser, C., Judmaier, W., Haid, C., Calzolari, C., Haid, C., Calzolari, C. and Puschendorf, B. (2001) 'Creatine kinase, myosin heavy chains and magnetic resonance imaging after eccentric exercise', *Journal of Sports Sciences*, 19(9), pp. 687–691. doi: 10.1080/02640410152475810.
- Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodríguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jardí, M., Ballestar, E., González, S., Serrano, A. L., Perdiguero, E. and Muñoz-Cánoves, P. (2014) 'Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence', *Nature*, 506(7488), pp. 316–321. doi: 10.1038/nature13013.
- Srinivas, S. and Watanabe, T. (2001) 'Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus', *BMC Developmental Biology*, 1(4).
- Stacey, G. (2006) 'Primary Cell Cultures and Immortal Cell Lines', *Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1–6. doi: 10.1038/npg.els.0003960.
- Standring, S. (2016) *Gray's Anatomy*. 41th edn. Elsevier.
- St Pierre, B. A. and Tidball, J. G. (1994) 'Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension', *Journal of Applied Physiology*, 77(1).
- Starkey, J. D., Yamamoto, M., Yamamoto, S. and Goldhamer, D. J. (2011) 'Skeletal Muscle Satellite Cells Are Committed to Myogenesis and Do Not Spontaneously Adopt Nonmyogenic Fates', *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(1), pp. 33–46. doi: 10.1369/jhc.2010.956995.
- Stevenson, R. E. (2005) *Human Malformations and Related Anomalies*. 2nd edn. Edited by O. U. Press.
- Stevenson, R. E., Hall, J. G., Everman, D. B. and Solomon, B. D. (2015) *Human Malformations and Related Anomalies*.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S. and Mesirov, J. P. (2005) 'Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), pp. 15545–50. doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- Swaminathan, S., Ellis, H. M., Waters, L. S., Yu, D., Lee, E. C., Court, D. L. and Sharan, S. K. (2001) 'Rapid engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides', *Genesis*, 29(1), pp. 14–21. doi: 10.1002/1526-968X(200101)29:1<14::AID-GENE1001>3.0.CO;2-X.
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G. and Buckingham, M. (1997) 'Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD.', *Cell*, 89(1), pp. 127–138. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80189-0.

- Tallon, C., Russell, K. A., Sakhalkar, S., Andrapallayal, N. and Farah, M. H. (2016) 'Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice', *Neuroscience*, 312, pp. 179–189. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.018.
- Tallquist, M. and Weismann, K. (2000) 'Early myotome specification regulates PDGFA expression and axial skeleton development', *Development*, 127, pp. 5059–5070.
- Tanaka, K. K., Hall, J. K., Troy, A. A., Cornelison, D. D. W., Majka, S. M. and Olwin, B. B. (2009) 'Syndecan-4-Expressing Muscle Progenitor Cells in the SP Engraft as Satellite Cells during Muscle Regeneration', *Cell Stem Cell*, Elsevier Ltd, 4(3), pp. 217–225. doi: 10.1016/j.stem.2009.01.016.
- Tanveer, N., Sharma, M. C., Sarkar, C., Gulati, S., Kalra, V., Singh, S. and Bhatia, R. (2009) 'Diagnostic utility of skin biopsy in dystrophinopathies', *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 111(6), pp. 496–502. doi: 10.1016/j.clineuro.2009.01.011.
- Tapscott, S. J. (2005) 'The circuitry of a master switch : MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription', pp. 2685–2695. doi: 10.1242/dev.01874.
- Tatsumi, R., Sankoda, Y., Anderson, J. E., Sato, Y., Mizunoya, W., Shimizu, N., Suzuki, T., Yamada, M., Rhoads, R. P., Ikeuchi, Y. and Allen, R. E. (2009) 'Possible implication of satellite cells in regenerative motoneuritogenesis: HGF upregulates neural chemorepellent Sema3A during myogenic differentiation.', *American journal of physiology. Cell physiology*, 297(2), pp. C238–52. doi: 10.1152/ajpcell.00161.2009.
- Teboul, L., Gaillard, D., Staccini, L., Inadera, H., Amri, E. Z. and Grimaldi, P. A. (1995) 'Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells', *J Biol Chem*, 270(47), pp. 28183–28187. doi: 10.1074/jbc.270.47.28183.
- Tedesco, F. S. and Cossu, G. (2012) 'Stem cell therapies for muscle disorders', *Current Opinion in Neurology*, 25(5), pp. 597–603. doi: 10.1097/WCO.0b013e328357f288.
- Tedesco, F. S., Dellavalle, A., Diaz-manera, J., Messina, G. and Cossu, G. (2010) 'Review series Repairing skeletal muscle : regenerative potential of skeletal muscle stem cells', *Journal of Clinical Investigation*, 120(1), pp. 11–19. doi: 10.1172/JCI40373.and.
- Tedesco, F. S., Moyle, L. A. and Perdiguero, E. (2017) 'Muscle interstitial cells: a brief field guide to non-satellite cell populations in skeletal muscle', in *Muscle Stem Cells: Methods and Protocols*. doi: 10.1007/978-1-4939-6771-1.
- Theriault, E. and Diamond, J. (1988) 'Intrinsic organization of the rat cutaneous trunci motor nucleus', *Journal of Neurophysiology*, 60(2), pp. 463–477.
- Thomas, J. A. and Kastelein, R. A. (2013) *Sensory Abilities of Cetaceans: Laboratory and Field Evidence*. Edited by Springer Science & Business Media.
- Thomas, K., Engler, A. J. and Meyer, G. A. (2015) 'Extracellular matrix regulation in the muscle satellite cell niche', *Connective Tissue Research*, 56(1), pp. 1–8. doi: 10.3109/03008207.2014.947369.
- Tidball, J. G. (1995) 'Inflammatory cell response to acute muscle injury', *Official Journal of the American College of Sports Medicine*.
- Tidball, J. G. (2005) 'Inflammatory processes in muscle injury and repair', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288, pp. 345–353.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J. L., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R. and Miller, F. D. (2001) 'Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin', *Nature Cell Biology*, 3(9), pp. 778–784. doi: 10.1038/ncb0901-778.
- Toma, J. G., McKenzie, I. A., Bagli, D. and Miller, F. D. (2005) 'Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin', *Stem Cells*, 23, pp. 727–737. doi: 10.1634/stemcells.2004-0134.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. and Brown, R. A. (2002) 'Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), pp. 349–363. doi: 10.1038/nrm809.

- Torrente, Y., Belicchi, M., Marchesi, C., Dantona, G., Cogiமானian, F., Pisati, F., Gavina, M., Giordano, R., Tonlorenzi, R., Fagiolari, G., Lamperti, C., Porretti, L., Lopa, R., Sampaolesi, M., Vicentini, L., Grimoldi, N., Tiberio, F., Songa, V., Baratta, P., Prella, A., Forzenigo, L., Guglieri, M., Pansarasa, O., Rinaldi, C., Mouly, V., Butler-Browne, G., Comi, G., Biondetti, P., Moggio, M., Gaini, S., Stocchetti, N., Priori, A., D'Angelo, M., Turconi, A., Bottinelli, R., Cossu, G., Rebullia, P. and Bresolin, N. (2007) 'Autologous Transplantation of CD133+ Stem Cells in Duchenne Muscle Patients', *Cell Transplantation*, 16(6), pp. 563–577.
- Tunici, P., Bulte, J. W. M., Bruzzone, M. G., Poliani, P. L., Cajola, L., Grisoli, M., Douglas, T. and Finocchiaro, G. (2006) 'Brain engraftment and therapeutic potential of stem / progenitor cells derived from mouse skin', *The Journal of Gene Medicine*, 8(October 2005), pp. 506–513. doi: 10.1002/jgm.866.
- Turner (1870) 'On a rudiment of the panniculus carnosus superficial to the trapezius', *Journal of Anatomy and Physiology*, 5(1), pp. 116–117.
- Turner, N. J. and Badylak, S. F. (2012) 'Regeneration of skeletal muscle', *Cell and Tissue Research*, 347, pp. 759–774. doi: 10.1007/s00441-011-1185-7.
- Turner, W. (1867) 'On the musculus sternalis', *Journal of anatomy and physiology*.
- Turrina, A., Martínez-González, M. A. and Stecco, C. (2013) 'The muscular force transmission system : Role of the intramuscular connective tissue', *Bodywork and Movement Therapies*, 17, pp. 95–102. doi: 10.1016/j.jbmt.2012.06.001.
- Tyndale-Biscoe, H. c. (2005) *Life of Marsupials*. Edited by Csiro Publishing.
- Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S. and Tsuchida, K. (2010) 'Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(2), pp. 143–152. doi: 10.1038/ncb2014.
- Uezumi, A., Ikemoto-Uezumi, M. and Tsuchida, K. (2014) 'Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle', *Frontiers in Physiology*, 5 FEB(February), pp. 1–11. doi: 10.3389/fphys.2014.00068.
- Uezumi, A., Nakatani, M., Ikemoto-Uezumi, M., Yamamoto, N., Morita, M., Yamaguchi, A., Yamada, H., Kasai, T., Masuda, S., Narita, A., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Fukada, S. ichiro, Nishino, I. and Tsuchida, K. (2016) 'Cell-Surface Protein Profiling Identifies Distinctive Markers of Progenitor Cells in Human Skeletal Muscle', *Stem Cell Reports*. The Authors, 7(2), pp. 263–278. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.004.
- Umbach, J. A., Adams, K. L., Gundersen, C. B. and Novitch, B. G. (2012) 'Functional neuromuscular junctions formed by embryonic stem cell-derived motor neurons', *PLoS ONE*, 7(5), pp. 3–8. doi: 10.1371/journal.pone.0036049.
- Uquillas, J. A., Pacelli, S., Kobayashi, S. and Uquillas, S. (2017) 'Musculoskeletal Tissue Engineering : Tendon , Ligament , and Skeletal Muscle Replacement and Repair', pp. 463–522. doi: 10.1002/9783527689934.ch15.
- Valiente-Alandi, I., Albo-Castellanos, C., Herrero, D., Arza, E., Garcia-Gomez, M., Segovia, J. C., Capecchi, M. and Bernad, A. (2015) 'Cardiac Bmi1 + cells contribute to myocardial renewal in the murine adult heart', *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), p. 205. doi: 10.1186/s13287-015-0196-9.
- Vandenburgh, H. H. (1982) 'Dynamic mechanical orientation of skeletal myofibers in vitro', *Developmental Biology*, 93(2), pp. 438–443. doi: 10.1016/0012-1606(82)90131-2.
- Vandenburgh, H. H., Karlisch, P. and Farr, L. (1988) 'Maintenance of highly contractile tissue-cultured avian skeletal myotubes in collagen gel', *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 24(3), pp. 166–174.
- Vargas, J. R. (2002) *Anatomía Topográfica*. Edited by UACJ.
- Vasli, N. and Laporte, J. (2013) 'Impacts of massively parallel sequencing for genetic diagnosis of neuromuscular disorders', *Acta Neuropathologica*, 125(2), pp. 173–185. doi: 10.1007/s00401-012-1072-7.
- Vigodarzere, G. C. and Mantero, S. (2014) 'Skeletal muscle tissue engineering: strategies for volumetric constructs', *Frontiers in Physiology*, 5(September), pp. 1–13. doi: 10.3389/fphys.2014.00362.

- Vilmont, V., Cadot, B., Ouanounou, G. and Gomes, E. R. (2016) 'A system for studying mechanisms of neuromuscular junction development and maintenance', *Development*, 143(13), pp. 2464–2477. doi: 10.1242/dev.130278.
- Visser, M. and Schaap, L. A. (2011) 'Consequences of sarcopenia', *Clinics in Geriatric Medicine*. Elsevier Ltd, 27(3), pp. 387–399. doi: 10.1016/j.cger.2011.03.006.
- Wakabayashi, M., Ito, Y., Hamazaki, T. S. and Okochi, H. (2010) 'Efficient Myogenic Differentiation of Murine Dermal Sca-1 (–) Cells via Initial Aggregation Culture', *Tissue Engineering Part A*, 16(10), pp. 3251–3259. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0678.
- Wang, H.-J., Chuang, Y.-C. and Chancellor, M. B. (2011) 'Development of cellular therapy for the treatment of stress urinary incontinence', *International Urogynecology Journal*, 22(9), pp. 1075–1083. doi: 10.1007/s00192-011-1432-1.
- Watts, G. T. (1960) 'Wound shape and tissue tension in healing', *The British Journal of Surgery*.
- Wei, Y., Kaufmann, A. M. and Albers, A. E. (2012) 'Retention of stem cell properties post-expansion in myosphere culture', *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, 8, pp. 235–246. doi: 10.1007/978-94-007-4798-2.
- Wei, Y., Li, Y., Chen, C., Stoelzel, K., Kaufmann, A. M. and Albers, A. E. (2011) 'Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture', *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc., 317(7), pp. 1016–1027. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.01.019.
- Wessler, I. and Kirkpatrick, C. J. (2009) 'Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans', *British Journal of Pharmacology*, 154(8), pp. 1558–1571. doi: 10.1038/bjp.2008.185.
- Westerman, K. A. (2015) 'Myospheres are composed of two cell types: One that is myogenic and a second that is mesenchymal', *PLoS ONE*, 10(2), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0116956.
- Westerman, K. A., Penvose, A., Yang, Z., Allen, P. D. and Vacanti, C. A. (2010) 'Adult muscle "stem" cells can be sustained in culture as free-floating myospheres', *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc., 316(12), pp. 1966–1976. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.03.022.
- Westerman, K. A., Zac, C., Cristina, P. A., Allen, P. D. and Charles, V. A. (2008) '"Myospheres" Can Be Used To Maintain and Isolate Primitive Muscle Cells', *Molecular Therapy*, 16(May), pp. S99–S100. doi: 10.1016/S1525-0016(16)39667-8.
- Whalen, R. G., Harris, J. B., Butler-browne, G. S. and Sesodia, S. (1990) 'Expression of Myosin Isoforms during Notexin-Induced Regeneration of Rat Soleus Muscles', 40, pp. 24–40.
- Williams, B. A. and Ordahl, C. P. (1994) 'Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification', *Development*, 120, pp. 785–796.
- Wise, C. J., Watt, D. J. and Jones, G. E. (1996) 'Conversion of dermal fibroblasts to a myogenic lineage is induced by a soluble factor derived from myoblasts', *Journal of Cellular Biochemistry*, 61(3), pp. 363–374. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(19960601)61:3<363::AID-JCB4>3.0.CO;2-R.
- Wong, V. W., Sorkin, M., Glotzbach, J. P., Longaker, M. T. and Gurtner, G. C. (2011) 'Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, pp. 1–8. doi: 10.1155/2011/969618.
- Xu, X., Wilschut, K. J., Kouklis, G., Tian, H., Hesse, R., Garland, C., Sbitany, H., Hansen, S., Seth, R., Knott, P. D., Hoffman, W. Y. and Pomerantz, J. H. (2015) 'Human Satellite Cell Transplantation and Regeneration from Diverse Skeletal Muscles', *Stem Cell Reports*. The Authors, 5(3), pp. 419–434. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.07.016.
- Yablonka-Reuveni, Z. and Rivera, a J. (1994) 'Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers.', *Developmental biology*, 164, pp. 588–603. doi: 10.1006/dbio.1994.1226.
- Yablonka-Reuveni, Z., Rudnicki, M. A., Rivera, A. J., Primig, M., Anderson, J. E. and Natanson, P. (1999) 'The Transition from Proliferation to Differentiation Is Delayed in Satellite Cells from Mice Lacking MyoD', *Developmental Biology*, 210(2), pp. 440–455. doi: 10.1006/dbio.1999.9284.

- Yamada, M., Ikeuchi, T. and Hatanaka, H. (1997) 'The neurotrophic action and signaling of epidermal growth factor', *Progress in Neurobiology*, 51, pp. 19–37.
- Yin, H., Pasut, A., Soleimani, V. D., Bentzinger, C. F., Antoun, G., Thorn, S., Seale, P., Fernando, P., Van Ijcken, W., Grosveld, F., Dekemp, R. A., Boushel, R., Harper, M. E. and Rudnicki, M. A. (2013) 'MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 17(2), pp. 210–224. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.004.
- Yin, H., Price, F. and Rudnicki, M. A. (2013) 'Satellite cells and the muscle stem cell niche', *Physiological Reviews*, 93(329), pp. 23–67. doi: 10.1152/physrev.00043.2011.
- Yiou, R., Hogrel, J. Y., Loche, C. M., Authier, F. J., Lecorvoisier, P., Jouany, P., Roudot-Thoraval, F. and Lefaucheur, J. P. (2013) 'Periurethral skeletal myofibre implantation in patients with urinary incontinence and intrinsic sphincter deficiency: A phase I clinical trial', *BJU International*, 111(7), pp. 1105–1116. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11682.x.
- Zammit, P. S. (2006) 'Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells', *Journal of Cell Science*, 119(9), pp. 1824–1832. doi: 10.1242/jcs.02908.
- Zatz, M., Rapaport, D., Vainzof, M., Passos-Bueno, M. R., Bortolini, E. R., Pavanello, R. D. C. M. and Peres, C. A. (1991) 'Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy', *Journal of the Neurological Sciences*, 102, pp. 190–196.
- Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalife, T., Lu, L.-S., Lyu, Y. L., Liu, L. F. and Yeh, E. T. H. (2012) 'Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 18(11), pp. 1639–1642. doi: 10.1038/nm.2919.
- Zhao, C., Andersen, H., Ozyilmaz, B., Ramaprabhu, S., Pastorin, G. and Ho, H. K. (2015) 'Spontaneous and specific myogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on polyethylene glycol-linked multi-walled carbon nanotube films for skeletal muscle engineering.', *Nanoscale*, 7(43), pp. 18239–18249. doi: 10.1039/c5nr04303d.
- Zhou, L. J., Matsui, R. and Ono, I. (2000) 'Development of a chronic skin defect model and a study of cytokine secretion using the model.', *Wound repair and regeneration*, 8(4), pp. 304–318.
- Zhu, X., Bergles, D. and Nishiyama, A. (2008) 'NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes', *Development*, 137, pp. 145–157. doi: 10.1242/dev.004895.

ANEXOS

10 ANEXOS

10.1 Anexo I: BD Lyoplate™ Mouse Cell Surface Marker Screening Panel

A continuación, se muestra el diseño de las placas del BD Lyoplate™ Mouse Cell Surface Marker Screening Panel (Figura 10.1, 10.2 y 10.3) y se detalla información sobre los anticuerpos y diversos controles que contienen dichas placas en tablas obtenidas del *Technical Data Sheet* del producto (Tablas 10.1, 10.2 y 10.3).

	Plate 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Buffer	CD2	CD4	CD5 (Ly-1)	CD8a (Ly-2)	CD9	CD11a	CD11b	CD13	CD14	CD16/CD32	CD18
B	CD19	CD21/CD35	CD23	CD24	CD25	CD26	CD29	CD31	CD34	CD35	CD38	CD41
C	CD43	CD44	CD45	CD45R	CD45RA	CD45RO	CD47	CD49b	CD49d	CD49e	CD51	CD53
D	CD62E	CD62L	CD70	CD71	CD72b/c	CD73	CD80	CD83	CD86	CD90.2	CD94	CD98
E	CD102	CD103	CD104	CD106	CD117	CD121a	CD121b	CD122	CD123	CD124	CD125	CD126
F	CD127	CD131	CD132	CD134	CD135	CD137	CD138	CD140a	CD144	CD147	CD153	CD162
G	CD172a	CD179a	CD179b	CD180	CD184 (CXCR4)	CD185 (CXCR5)	CD195	CD197	CD200	CD209a	CD210	CD223
H	CD244.1	CD252	CD253	CD254 (RANKL)	CD267	CD273	CD274	CD278	CD284	CD309 (Flk-1, VEGF-R2)	CD314	CD326

Figura 10.1. Diseño de la placa 1 del BD Lyoplate™.

	Plate 2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Buffer	CD335 (NKP46)	4-1BB Ligand (CD137L)	Crry/p65	Dendritic Cells	Early B Lineage	F4/80-like receptor	GITR	I-A/I-E	IL-21 Receptor	Integrin β 7 chain	LPAM-1
B	Ly-6A/E (Sca-1)	Ly-6D (ThB)	Ly-6G	Ly-6G Ly-6C	CD107b	MA δ -CAM-1	MD-1 (Ly-86)	NKG2 A/C/E	NK-T/NK Cell Antigen	Panendothelial Cell Antigen	PIR-A/B	Pre BCR
C	Siglec-F (Siglec5)	Syndecan 4 (Sdc4)	T/B cell activation antigen	TER-119 (Erythroid Cells)	Ig λ_{123} light chain	IgD	IgE	IgM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
D	Rat IgG1, κ	Rat IgG1, λ	Rat IgG2a, κ	Rat IgG2a, λ	Rat IgG2b, κ	Rat IgG2c, κ	Rat IgM, κ	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
E	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
F	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
G	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
H	CD28	KLRG1	V γ 3 TCR	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer

Figura 10.2. Diseño de la placa 2 del BD Lyoplate™.

	Plate 3	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Buffer	CD3e	CD11c	CD27	CD30	CD40	CD42d	CD48	CD54	CD55	CD61	CD69
B	CD79b	CD81	CD95	CD119	CD120a	CD120b	CD152	CD154	CD279	$\gamma\delta$ -TCR	gp49 R	H2-M3
C	IFN- γ Receptor β chain	TCR β chain	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
D	Ham IgG1, κ	Ham IgG1, λ	Ham IgG2, κ	Ham IgG2, λ	Ham IgG3, λ	Ham IgM, λ	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
E	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
F	CD22.2	CD45.1	CD45.2	CD64 a/b	CD72 a/b/d	CD157	CD212	CD244.2	H-2D ^b	H-2K ^b	H-2K ^d	H-2K ^e
G	H-2K ^Q	H-2K ^S	IFN- $\alpha\beta$ Receptor1	Ly-49C Ly-49J	Ly-51	NK-1.1	Pre TCR α chain	QA-1B	SSEA-1	SSEA-4	Buffer	Buffer
H	Mouse IgG1, κ	Mouse IgG2a, κ	Mouse IgG2b, κ	Mouse IgG3, κ	Mouse IgM, κ	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer

Figura 10.3. Diseño de la placa 3 del BD Lyoplate™.

Placa 1			
Especificidad	Nombres alternativos	Clon	Isotipo
CD2	LFA-2, Ly-37, Ly37	RM2-5	Rt IgG2b, λ
CD4	L3T4, Ly-4	GK1.5	Rt IgG2b, κ
CD5	Ly-1, Lyt-1, Ly-12, Ly-A	53-7.3	Rt IgG2a, κ
CD8A	Ly-2, Lyt-2, Ly-B, Ly-35, Ly-B	53-6.7	Rt IgG2a, κ
CD9	Tspan29, Tetraspanin 29	KMC8	Rt IgG2a, κ
CD11a	Itgal, Integrin alpha L, Ly-15, Ly-21, LFA-1a	M17/4	Rt IgG2a, κ
CD11b	Itgam, Integrin alpha M, Ly-40, CR3a, Mac-1a	M1/70	Rt IgG2b, κ
CD13	Anpep, Apn, Lap-1, Aminopeptidase N, gp150	R3-242	Rt IgG1, κ
CD14	Mo2, LPS Receptor	RMC5-3	Rt IgG1, κ
CD16/CD32	Fcgr3, FcgammaRIII/Fcgr2, FcgammaRII, Ly-17	2.4G2	Rt IgG2b, κ
CD18	Itgb2, Integrin beta 2, LFA-1/Mac-1/CR3 beta	C71/16	Rt IgG2a, κ
CD19	B4; B-lymphocyte antigen CD19	1D3	Rt IgG2a, κ
CD21/CD35	CR2/CR1	7G6	Rt IgG2b, κ
CD23	Fcer2, FceRII, FcepsilonRII, Ly-42	B3B4	Rt IgG2a, κ
CD24	Heat Stable Antigen, HSA, Ly-52, Nectadrin	M1/69	Rt IgG2b, κ
CD25	Il2ra, IL-2 Receptor alpha, IL-2R alpha, Ly-43, p55	PC61	Rt IgG1, λ
CD26	Dpp4, Dipeptidyl peptidase 4, DPP IV, THAM	H194-112	Rt IgG2a, κ
CD29	Itgb1, Integrin beta-1, VLA-4 beta, gpIIa	9EG7	Rt IgG2a, κ
CD31	Pecam1, endoCAM, platelet endothelial cell adhesion molecule	MEC13.3	Rt IgG2a, κ
CD34	Mucosialin	RAM34	Rt IgG2a, κ
CD35	CR1, Complement Receptor 1, C3b Receptor	8C12	Rt IgG2a, κ
CD38	ADP-ribosyl cyclase 1, T10, Cyclic ADP-ribose hydrolase 1	90	Rt IgG2a, κ
CD41	Itga2b, Integrin alpha-2b, GPIIb, Platelet membrane glycoprotein IIb	MWREG30	Rt IgG1, κ
CD43	Spn, Sialophorin, Leukosialin, Galgp, Ly-48	S7	Rt IgG2a, κ
CD44	Ly-24, Pgp-1, ECMRIII, HUTCH-1, Hermes, Hyaluronate Receptor	IM7	Rt IgG2b, κ
CD45	Ptpcr, Leukocyte Common Antigen, LCA	30-F11	Rt IgG2b, κ
CD45R	Ptpcr, B220, Ly-5, Lyt-4	RA3-6B2	Rt IgG2a, κ
CD45RA	Ptpcr, Ly-5, Lyt-4	14.8	Rt IgG2b, κ
CD45RC	Ptpcr, Ly-5, Lyt-4	DNL-1.9	Rt IgG2a, κ
CD47	Itgp, integrin-associated protein, IAP	MIAP301	Rt IgG2a, κ
CD49b	Itga2, Integrin alpha-2, DX5, VLA-2 α , GPIa	DX5	Rt IgM, κ
CD49d	Itga4, Integrin alpha-4, VLA-4 α , LPAM alpha	9C10(MRF4.B)	Rt IgG2a, κ
CD49e	Itga5, Integrin alpha-5, VLA-5 α , Fnra, Fibronectin Receptor alpha	5H10-27	Rt IgG2a, κ
CD51	Itgav, Integrin alpha-v, VNR α , Vitronectin Receptor alpha	RMV-7	Rt IgG1, κ

CD53	OX-44, TSPAN25, Tetraspanin-25	OX-79	Rt IgM,k
CD62E	Sele, E-Selectin, ELAM-1, LECAM-2	10E9.6	Rt IgG2a,k
CD62L	Sell, L-Selectin, LECAM-1, Lnhr, Ly-22, Ly-m22, Lyam-1, Lyam1	MEL-14	Rt IgG2a,k
CD70	CD27 Ligand, CD27L, Tnfsf7	FR70	Rt IgG2b,k
CD71	Tfrc, Transferrin Receptor, Mtvr1, TfR, TR, Trfr, TfR1	C2	Rt IgG1,k
CD72 b/c AlloA	Lyb-2, Ly-19, Ly-m19, Ly-32, Ly-32	JY/93	Rt IgG1,k
CD73	Nt5e, NT, Nt5, Nte, Ecto-5'-nucleotidase	TY/23	Rt IgG2a,k
CD80	B7/BB1, B7-1, Ly-53	1G10/B7	Rt IgG2a,k
CD83	HB15	MICHEL-19	Rt IgG1,k
CD86	B7-2, B70, Ly-58, ETC -1	PO3	Rt IgG2b,k
CD90.2	Thy1, Thy-1.2, q-C3H	30-H12	Rt IgG2b,k
CD94	Klrd1, Killer cell lectin-like Receptor subfamily D member 1, KP43	18D3	Rt IgG2a,k
CD98	Slc3a2, 4F2HC, Ly-10, Mgp-2hc, Mdu1, NACAE	H202-141	Rt IgG2a,k
CD102	CAM-2, Intercellular adhesion molecule 2, Ly-60	3C4(MIC2/4)	Rt IgG2a,k
CD103	Itgae, Integrin alpha-e, Integrin alpha IEL	M290	Rt IgG2a,k
CD104	Itgb4, Integrin beta-4	346-11A	Rt IgG2a,k
CD106	Vcam1, Vcam-1, Vascular cell adhesion molecule 1	429(MVCAM.A)	Rt IgG2a,k
CD117	Kit, c-kit, SCFR, Stem cell growth factor Receptor, Steel factor Receptor	2B8	Rt IgG2b,k
CD121a		35F5	Rt IgG1,k
CD121	Il1r2, IL-1R2, IL-1RII, IL-1R beta, IL-1RB, IL-1 Receptor Type II	4E2	Rt IgG2a
CD122	IL2rb, IL-2RB, IL-2/15 Receptor beta, IL-2 and IL-15 Receptor beta	TM-BETA1	Rt IgG2b
CD123	IL3ra, IL-3R alpha, IL-3RA, IL-3 Receptor alpha	5B11	Rt IgG2a,k
CD124	IL4ra, IL-4R alpha, IL-4RA, IL-4 Receptor alpha	MIL4R-M1	Rt IgG2a,k
CD125	IL5ra, IL-5R alpha, IL-5RA, IL-5 Receptor alpha	T21	Rt IgG1,λ
CD126	IL6ra, IL-6R alpha, IL-6RA, IL-6 Receptor alpha	D7715A7	Rt IgG2b,k
CD127	IL7r, IL-7R alpha, IL-7RA, IL-7 Receptor alpha	B12-1	Rt IgG2a,λ
CD131	Csf2rb/Csf2rb2, AIC2B/AIC2A, bc/bIL3, IL3rb1/IL3rb2	JORO50	Rt IgG1,k
CD132	IL2rg, IL-2 Receptor gamma, Cytokine Receptor Common gamma	TUGM2	Rt IgG2b,k
CD134	Tnfrsf4, Ly-70, OX-40, OX40L Receptor, ACT35 antigen	OX-86	Rt IgG1,k
CD135	Flt3, Fms-like tyrosine kinase 3, Flk-2, Ly-72	A2F10.1	Rt IgG2a,k
CD137	Tnfrsf9, 4-1BB, Ly-63, ILA	1AH2	Rt IgG1,k
CD138	Sdc1, Syndecan-1, Synd1, Syn-1, synstatin, Sstn	281-2	Rt IgG2a,k
CD140a	Pdgfra, PDGF Receptor alpha, PDGF-R alpha	APA5	Rt IgG2a,k
CD144	Cdh5, Cadherin 5, VE-Cadherin, 7B4, VECD	11D4.1	Rt IgG2a,k
CD147	Bsg, Basigin, HT7, gp42, Neurothelin	RL73	Rt IgG2a,k
CD153	Tnfrsf8, CD30 Ligand, CD30L, CD30LG	RM153	Rt IgG2b
CD162	Selplg, P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1	2PH1	Rt IgG1,k
CD172a	Sirpa, SHPS-1, BIT, P84 Antigen, SIRP, SHP-1, Ptpns1	P84	Rt IgG1,k
CD179a	VpreB1, Pre-B lymphocyte gene 1, Immunoglobulin iota chain	R3/VPREB	Rt IgG2a,k
CD179b	Vpreb2, Igl11, Igl-5, Ig lambda-5	LM34	Rt IgG2a,k
CD180	Ly-78, RP105	RP/14	Rt IgG2a,k
CD184 (CXCR4)	CKR	2B11/CXCR4	Rt IgG2b
CD185 (CXCR5)	CXCR5, BLR1, Gpcr6, MDR15	2G8	Rt IgG2a
CD195	CCR5, Cmkbr5, AM4-7, MIP-1 alpha Receptor	C34-3448	Rt IgG2c,k
CD197	CCR7, EBI-1, BLR2, CMKBR7, MIP-3 beta Receptor	4B12/CCR7.1	Rt IgG2a
CD200	OX-2, Mox2	OX-90	Rt IgG2a,k
CD209a	DC-SIGN, CDSIGN, CIRE, CLEC4L	5H10/CIRE	Rt IgG2a
CD210	IL10ra, IL-10 Receptor alpha, IL-10Ra, IL-10R1	1B1.3A	Rt IgG1,k
CD223	LAG3, LAG-3, Lymphocyte activation gene 3, FDC protein, Ly-66	C9B7W	Rt IgG1,k
CD244.1	2B4, C9.1, Ly90, NAIL, Nmrk, NKR2B4, SLAMF4	C9.1	Rt IgG2b,k
CD252	Tnfsf4, OX-40 Ligand, OX40L, gp34, Txgp1, Ath1, CD134L	RM134L	Rt IgG2b,k
CD253	Tnfsf10, TRAIL, APO-2L, TL2, Ly81, Trail, APO-2L	N2B2	Rt IgG2a,k
CD254 (RANKL)	Tnfsf11, ODF, OPG, OPGL, RANKL, Trance, SODF	IK22-5	Rt IgG2a,k
CD267	Tnfrsf13b, TACI	8F10	Rt IgG2a,k
CD273	Pdcd1lg2, Programmed cell death 1 ligand 2, PD-L2, B7-DC, Btdc	TY25	Rt IgG2a,k
CD274	Programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1, Pdcd1l1, Pdcd1lg1, B7-H1	MIH5	Rt IgG2a,λ
CD278	COS, Inducible T-cell co-stimulator, Ly115, H4, AILIM, CCLP, CRP-1	7E.17G9	Rt IgG2b,k

CD284	TLR4, Toll-like receptor 4, Ly87, Ran/M1, Rasl2-8, Lps	MTS510	Rt IgG2a,κ
CD309	KDR, VEGFR2, Flk-1	Avas 12α1	Rt IgG2a,κ
CD314	KLRK1, NKG2D, KLR	CX5	Rt IgG1,κ
CD326	Epcam, epithelial cell adhesion molecule, EGP314, Ly-74, Tacstd1, Trop1	G8.8	Rt IgG2a,κ

Tabla 10.1. Anticuerpos y controles que contiene la placa 1 del BD Lyoplate™.

Placa 2			
Especificidad	Nombres alternativos	Clon	Isotipo
CD335 (NKp46)	Ncr1, Natural cytotoxicity triggering receptor 1, Ly-94, MAR1	29A1.4	Rt IgG2a,κ
4-1BB Ligand	Tnfsf9, CD137L, Ly63l	TKS-1	Rt IgG2a,κ
Crry/p65	Cr1, Complement component (3b/4b) receptor 1-like, Mcp, mCRY, Cry	1F2	Rt IgG2a,κ
Dendritic Cells	DC specific marker 33D1	B3D1	Rt IgG2b,κ
Early B Lineage		493	Rt IgG2a,κ
F4/80-like Receptor	Emr4, EGF-like Module Receptor 4, Egf-tm7, Fire, Gpr127	6F12	Rt IgG2a,κ
GITR	Tnfrsf18, CD357, Glucocorticoid-induced TNFR-related Protein, AITR	DTA-1	Rt IgG2b,λ
I-A/I-E	H-2 Class II Histocompatibility antigen I-A/I-E	2G9	Rt IgG2a,κ
IL-21 Receptor	Il21r, CD360, IL-21R, Interleukin 21 receptor, NR8, LR-beta	4A9	Rt IgG2a,κ
Integrin β7 chain	Itgb7, Ly69, Integrin beta 7, Integrin beta-P, M290 IEL antigen	FIB27	Rt IgG2a,κ
LPAM-1	α4β7, Integrin alpha 4/beta 7, CD49d/Integrin beta 7	DATK32	Rt IgG2,κ
Ly-6A/E	Ly6a, Lymphocyte Antigen-6A/E, Sca-1, Sca1, Stem Cell Antigen 1, TAP	E13-161.7	Rt IgG2a,κ
Ly-6D	Ly6d, Lymphocyte Antigen-6D, Ly-61, Ly61, ThB, Thymocyte B Cell Ag	49-H4	Rt IgG2c,κ
Ly-6G	Ly6g, Lymphocyte Antigen-6G, Gr-1, Gr1	1A8	Rt IgG2a,κ
Ly-6G/Ly-6C	Ly6g/Ly6C, Lymphocyte Antigen-6G/6C	RB6-8C5	Rt IgG2b,κ
CD107b	Lamp2, Lysosomal-associated Membrane Protein 2, CD107b, Mac3	M3/84	Rt IgG1,κ
MAdCAM-1	Madcam1, Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	MECA-89	Rt IgG2a,κ
MD-1	Ly86, Ly-86, Lymphocyte antigen-86, MD1, MMD-1	MD14	Rt IgG2a,κ
NKG2A/C/E	Klrc1/2/3, Killer cell lectin-like receptor subfamily C, members 1/2/3	20D5	Rt IgG2a,κ
NKT/NK Cell Antigen	Icam1, CD54, ICAM-1, Intercellular adhesion molecule 1, Ly-47	U5A2-13	Rt IgG2a,κ
Panendothelial Cell Ag	Plvap; Pv1; MECA32; Plasmalemma vesicle-associated protein	MECA-32	Rt IgG2a,κ
PIR-A/B	Paired immunoglobulin-like receptors-A/B	6C1	Rt IgG1,κ
Pre-BCR	Pre-B Cell Receptor	SL156	Rt IgG2a,κ
Siglec-F	Siglec5, Sialic acid binding Ig-like lectin 5, CD170	E50-2440	Rt IgG2a,κ
Syndecan-4	Sdc4, Ryudocan core protein	KY/8.2	Rt IgG2a,κ
T/B Cell Activation Ag		GL7	Rt IgM,κ
Erythroid Cells	TER-119, Ly-76	TER-119	Rt IgG2b,κ
Igλ1,λ2,λ3 Light Chain	Igk1/2/3, Immunoglobulin lambda constant 1/2/3	R26-46	Rt IgG2a,κ
IgD	IGHD, Igh-5, Immunoglobulin heavy constant delta	11-26C.2A	Rt IgG2a,κ
IgE	Igh-7, Immunoglobulin heavy chain 7, Heavy chain of IgE	R35-72	Rt IgG1,κ
IgM	Ighm, Immunoglobulin heavy constant mu, Igh6	R6-60.2	Rt IgG2a,κ
Rat IgG1,κ IC	Rat IgG1,κ Isotype Control	R3-34	Rt IgG1,κ
Rat IgG1,λ IC	Rat IgG1,λ Isotype Control	A110-1	Rt IgG1,λ
Rat IgG2a,κ IC	Rat IgG2a,κ Isotype Control	R35-95	Rt IgG2a,κ
Rat IgG2a,λ IC	Rat IgG2a,λ Isotype Control	B39-4	Rt IgG2a,λ
Rat IgG2b,κ IC	Rat IgG2b,κ Isotype Control	A95-1	Rt IgG2b,κ
Rat IgG2c,κ IC	Rat IgG2c,κ Isotype Control	A23-1	Rt IgG2c,κ
Rat IgM,κ IC	Rat IgM,κ Isotype Control	R4-22	Rt IgM,κ
CD28	Cd28, T-cell-specific surface glycoprotein CD28	37.51	Syr IgG2,λ1
KLRG1	Klrg1, MAFA, 2F1-Ag	2F1	Syr IgG2,κ
Vγ 3 TCR	Tcr3, Tcrγ T-cell receptor gamma chain 3	536	Syr IgG1,κ

Tabla 10.2. Anticuerpos y controles que contiene la placa 2 del BD Lyoplate™.

Placa 3			
Especificidad	Nombres alternativos	Clon	Isotipo
C D3e	CD3 epsilon, CD3, T3/Leu4 epsilon	145-2C11	Arm IgG1,κ
CD11c	Itgax, Integrin alpha-X, CR4, Complement receptor-4	HL3	Arm IgG1,λ2

CD27	T14, s152, Tnfrs7, Tp55	LG.3A10	Arm IgG1,k
CD30	Tnfrsf8, Ki, Ki-1	MCD30.1	Arm IgG1,k
CD40	gp39 receptor, Tnfrsf5, Bp50	HM40-3	Arm IgM,k
CD42d	Gp5, GPV, Glycoprotein 5, Platelet glycoprotein V	1C2	Arm IgG3,λ1
CD48	Blast, Blast-1, Hulym3, BCM1, OX-45, MEM-102, SLAMF2, Sgp-60	HM48-1	Arm IgG1,λ3
CD54	Icam1, ICAM-1, Ly-47, MALA-2, myD10	3E2	Arm IgG1,k
CD55	Complement decay accelerating factor GPI-anchored, Daf, Daf-GPI, Daf1, GPI-DAF	RIKO-5	Arm IgG3,λ1
CD61 (Integrin β3)	Igfb3, Integrin beta 3, GP3A, Platelet membrane glycoprotein IIIa	2C9.G2	Arm IgG1,k
CD69	AIM, Very Early Activation Antigen, VEA	H1.2F3	Arm IgG1,λ3
CD79b	Igβ, Ig beta, B29, BCR complex-associated protein beta chain	HM79B	Arm IgG2,λ1
CD81	Tapa1, TAPA-1, Tspan28	EAT2	Arm IgG,k
CD95 (Fas)	Fas, APO-1, APO1, APT1, TNFR6, Tnfrsf6, lpr	JO2	Arm IgG2,λ2
CD119 (IFNγR1)	Ifngr1, IFN-gamma Receptor alpha, IFNγR alpha, Ifngra	2E2	Arm IgG1,k
CD120a	Tnfrsf1a, TNFR1, TNF-R1, TNF-RI, TNFRp55, TNF Receptor Type I	55R-286	Arm IgG1,k
CD120b	Tnfrsf1b, TNFR2, TNF-R2, TNF-RII, TNFRp75. TNF Receptor Type II	TR75-89	Arm IgG1,λ3
CD152	Ctla4, CTLA-4, Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, Ly-56	UC10-4F10	Arm IgG1,k
CD154	Cd40lg, Tnfsf5, gp39, CD40 Ligand, CD40L, Ly-62, HIGM1, T-BAM, TRAP	MR1	Arm IgG3,k
CD279	Pdcd1, Pdc1, Pd1, PD-1, Programmed death-1, Ly101	J43	Arm IgG2,k
γδ-TCR	T-cell receptor gamma delta	GL3	Arm IgG2,k
gp49 Receptor	Lilrb4, Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B, CD85K, ILT3	H1.1	Arm IgG3,k
H2-M3	H-2M3, Histocompatibility 2 M region locus 3, MHC class I-b antigen M3	130	Arm IgG1,k
IFN-γR β Chain	Ifngr1, IFN-gamma Receptor alpha, IFNγR alpha, Ifngra	MOB-47	Arm IgG
TCR β chain	Tcrb, T-cell receptor beta chain, Tib, TCRbeta	H57-597	Arm IgG2,λ1
Ham IgG1,κ IC	Hamster IgG1,κ Isotype Control	A19-3	Arm IgG1,k
Ham IgG1,λ IC	Hamster IgG1,λ Isotype Control	G235-2356	Arm IgG1,λ
Ham IgG2,κ IC	Hamster IgG2,κ Isotype Control	B81-3	Arm IgG2,k
Ham IgG2,λ IC	Hamster IgG2,λ Isotype Control	Ha4/8	Arm IgG2,λ
Ham IgG3,λ IC	Hamster IgG3,λ Isotype Control	A19-4	Arm IgG3,λ
Ham IgM,λ IC	Hamster IgM,λ Isotype Control	G235-1	Arm IgM
CD22.2	Lyb-8.2, Siglec-2, Siglec2, B-cell receptor CD22	CY34.1	Ms IgG1,k
CD45.1	PTPRCa, Ly-5.1, Ly-5a	A20	Ms IgG2a,k
CD45.2	PTPRCb, Ly-5.2, Ly-5b	104	Ms IgG2a,k
CD64 a/b AlloAgs	Fcgr1, FcγRI, Fc-gamma receptor 1	X54-5/7.1	Ms IgG1,k
CD72 a/b/d AlloAgs	Lyb-2, Ly-m19, Ly-32	K10.6	Ms IgG2b,k
CD157	Bst1, Ly-65, BP-3, Bone marrow stromal cell antigen 1	BP-3	Ms IgG2b,k
CD212	Il12rb1, IL-12R-beta-1, IL-12beta1, IL-12beta, CD212b1	114	Ms IgG2a,k
CD244.2	Cd244, CD244 2B4, Ly90, NAIL, Nmrk, NKR2B4, SLAMF4	2B4	Ms IgG2b,k
H-2D ^b	H-2Db MHC class I alloantigen	KH95	Ms IgG2b,k
H-2K ^b	H-2Kb MHC class I alloantigen	AF6-88.5	Ms IgG2a,k
H-2K ^d	H-2Kd MHC class I alloantigen	SF1-1.1	Ms IgG2a,k
H-2K ^k	H-2Kk MHC class I alloantigen	AF3-12.1	Ms IgG1,k
H-2K ^Q	H-2Kq MHC class I alloantigen	KH114	Ms IgG2a,k
H-2K ^S	H-2Ks MHC class I alloantigen	KH49	Ms IgM,k
IFN-α/β receptor 1	Ifnar1, Ifar; Ifrc, CD118	MAR1-5A3	Ms IgG1,k
LY-49C LY-49I	Klra3/Klra9, 5E6,Nk2.1	5E6	Ms IgG2a,k
LY-51	Enpep, glutamyl aminopeptidase, APA, Bp-1/6C3	BP-1	Ms IgG2a,k
NK-1.1	Klrb1c, Ly59, CD161, Ly55c, NKRP1	PK136	Ms IgG2a,k
Pre-TCR α chain	Ptcra, pT-alpha	2F5	Ms IgG1,k
QA-1B	H2-T23, histocompatibility 2 T region locus 23, 37b, 37c, Qa-1, T18c	6A8.6F10.1A6	Ms IgG1,k
SSEA-1	Fut4, 3-FAL, LeX antigen, CD15	MC480	Ms IgM,k
SSEA-4	Stage specific embryonic antigen 4	MC813-70	Ms IgG3,k
Ms IgG1, κ IC	Mouse IgG1,κ Isotype Control	MOPC-31C	Ms IgG1,k
Ms IgG2a, κ IC	Mouse IgG2a,κ Isotype Control	G155-178	Ms IgG2a,k
Ms IgG2b, κ IC	Mouse IgG2b,κ Isotype Control	MPC-11	Ms IgG2b,k
Ms IgG3, κ IC	Mouse IgG3,κ Isotype Control	A112-3	Ms IgG3,k
Ms IgM, κ IC	Mouse IgM,κ Isotype Control	G155-228	Ms IgM,k

Tabla 10.3. Anticuerpos y controles que contiene la placa 3 del BD Lyoplate™.

10.2 Anexo II: Arrays utilizados para los análisis transcriptómicos

Los datos del análisis del transcriptoma de las diversas muestras seleccionadas se compararon a su vez con los datos de *arrays* provenientes de distintos estudios publicados en la base de datos GEO para finalmente obtener los resultados mostrados en la **Figura 6.36 A, D y E**. La lista de los datos utilizados se detalla en la **Tabla 10.4** enumerados en base a su código GSM, con una pequeña descripción de la naturaleza de las muestras y la referencia de la publicación del trabajo.

GSM #	Descripción	Referencia
GSM990708	Cardiomiocitos – Cardiomiocitos de ratón WT 129SvEv/C57BL/6 a las 16 horas de la inyección de PBS.	(Zhang <i>et al.</i> , 2012)
GSM990709		
GSM990710		
GSM997165	Mioblastos – Línea celular de mioblastos C2C12.	(Davidovic <i>et al.</i> , 2013)
GSM997166		
GSM1541931	Mioblastos P0 – Mioblastos primarios de ratón C57BL/6J en condiciones de proliferación a pase 0.	Carrió and Suelves, unpublished
GSM1541932		
GSM1541933		
GSM1541934	Mioblastos P8 - P10 - Mioblastos primarios de ratón C57BL/6J en condiciones de proliferación a pase 8 y 10.	
GSM1541935		
GSM1541936		
GSM1541937	Miotubos D1 – Miotubos primarios de ratón C57BL/6J en condiciones de diferenciación a día 1.	
GSM1541938		
GSM1541939		
GSM1541940	Miotubos D2 – Miotubos primarios de ratón C57BL/6J en condiciones de diferenciación a día 2.	
GSM1541941		
GSM1541942		
GSM1541943	Miotubos D4 – Miotubos primarios de ratón C57BL/6J en condiciones de diferenciación a día 4	
GSM1541944		
GSM1541945		
GSM1541949	Músculo esquelético – Músculo esquelético de ratón NOD/ShiLtj.	Roy M Williams, unpublished
GSM1541946	Cuadriceps – Músculo cuadriceps de ratón 129Sv/C57BL/6J.	
GSM1541947		
GSM1541948		
GSM856087	Células madre musculares – Células CD34+/a7-integrin+/Sca-1- separadas por citometría de ratón C57BL/6J DMD/MDX.	Roy M Williams, unpublished
GSM856083	Células intersticiales de músculo – Células CD34+/a7-integrin+/Sca-1+ separadas por citometría de ratón C57BL/6J DMD/MDX.	
GSM856084		
GSM1253022	Músculo esquelético – Músculo esquelético de ratón AR97Q - C57BL/6J AR-97Q.	(Iida <i>et al.</i> , 2015)
GSM1253023		
GSM1253024		

GSM1299431	Células satélite jóvenes 1 – Células satélite separadas por citometría de ratón C57BL/6 de 2 meses de edad.	(Sousa-Victor <i>et al.</i> , 2014)
GSM1299432		
GSM1299433		
GSM1299438	Células satélite jóvenes 2 – Células satélite separadas por citometría de ratón C57BL/6 de 2 meses de edad.	
GSM1299439		
GSM1299440		
GSM1299452	Células satélite jóvenes 3 – Células satélite separadas por citometría de ratón C57BL/6 de 2 meses de edad.	
GSM1299453		
GSM1299454		
GSM1299458	Células satélite 4 – Células satélite separadas por citometría de ratón Bmi1-FVB WT de 2 meses de edad.	
GSM1299459		
GSM1299460		
GSM1299441	Células satélite viejas 2 - Células satélite separadas por citometría de ratón C57BL/6 de 23 meses de edad.	
GSM1299442		
GSM1299443		
GSM1299455	Células satélite adultas 3 - Células satélite separadas por citometría de ratón C57BL/6 de 6 meses de edad.	
GSM1299456		
GSM1299457		
GSM1299434	Células satélite geriátricas 1 - Células satélite separadas por citometría de ratón C57BL/6 de 28 meses de edad.	
GSM1299435		
GSM1299436		
GSM1299444	Células satélite geriátricas 2 - Células satélite separadas por citometría de ratón C57BL/6 de 28 meses de edad.	
GSM1299445		
GSM1220789		Fibroblastos – Fibroblastos de la cola de ratón C57/Bl6-J.
GSM1220790		
GSM1220791		
GSM1037932	Adipocitos – Adipocitos maduros 3T3-L1 cultivados tratados con solución fisiológica salina.	(Chew <i>et al.</i> , 2014)
GSM1037933		
GSM1109740	Células madre hematopoyéticas - Células madre hematopoyéticas Lin-Sca-1+ckit+flt3-CD41- separadas por citometría de médula ósea de ratón.	(Gekas and Graf, 2013)
GSM1109741		
GSM1109742		
GSM1109743	Células madre hematopoyéticas - Células madre hematopoyéticas Lin-Sca-1+ckit+flt3-CD41+ separadas por citometría de médula ósea de ratón.	
GSM1109744		
GSM1109745		
GSM1400758	Macrófagos – Macrófagos de la piel de ratón CD1.	Castellana and Perez-Moreno, unpublished
GSM1400759		
GSM1400760		

Tabla 10.4. Lista de los *arrays* de la base de datos GEO utilizados en este trabajo.

10.3 Anexo III: Controles experimentales

Seguidamente, se muestran la serie de controles utilizados en los experimentos de tinción de la fosfatasa alcalina y la β -gal (Figura 10.4), en las inmunofluorescencias (Figura 10.5) y durante los análisis por citometría de flujo (Figura 10.6).

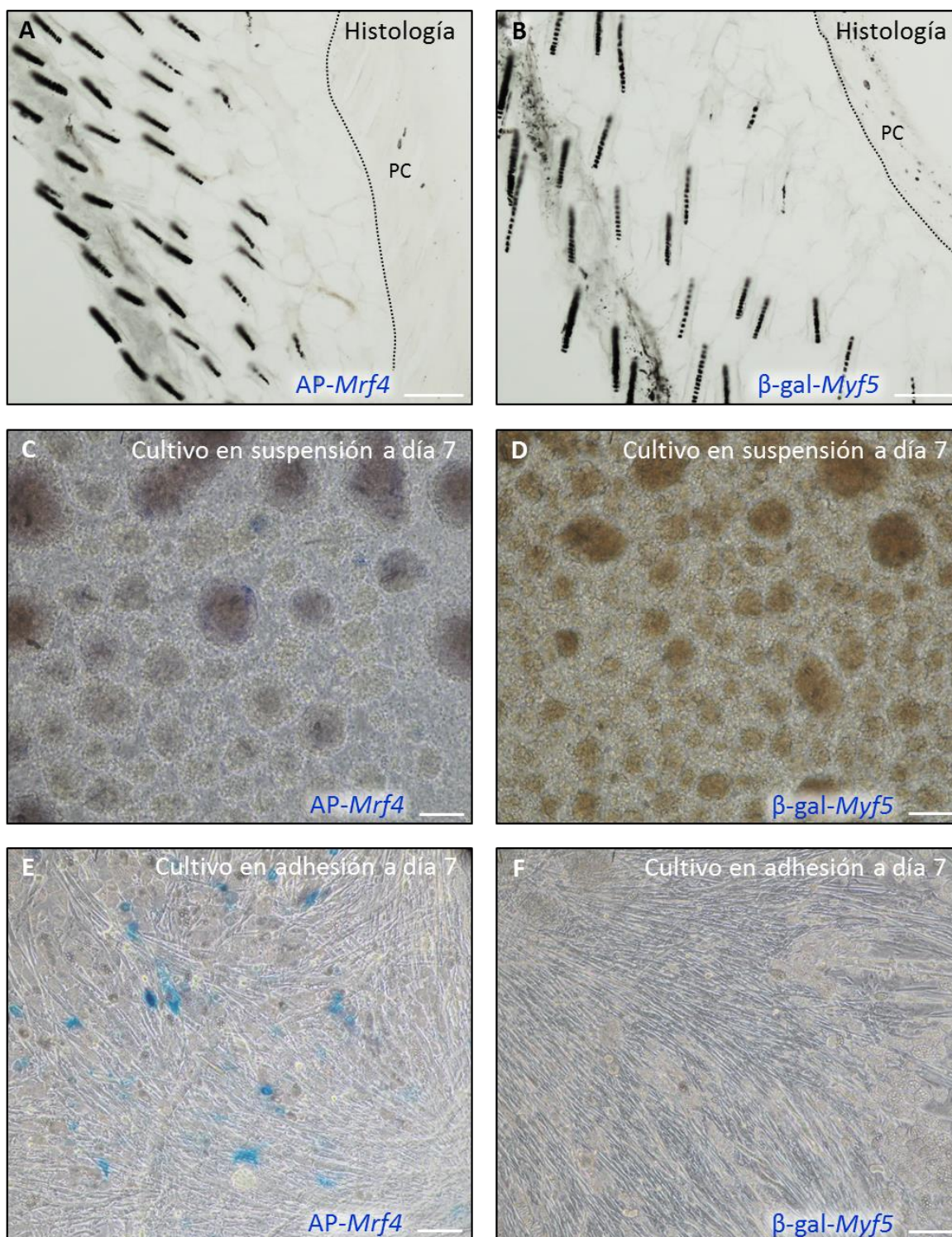


Figura 10.4. Tinciones para la detección de la fosfatasa alcalina y la β -gal en muestras procedentes de ratones control. (A-B) Tinción de color azul para la detección de la fosfatasa alcalina relativa a la expresión del gen *Mrf4* (A, C, E) y de la β -gal relativa a la expresión del gen *Myf5* (B, D, F), en muestras histológicas (A-B), en cultivos en suspensión a los 7 días (C-D) y en cultivos en adhesión a día 7 (E-F). En todos los paneles las barras de tamaño representan 100 μ m.

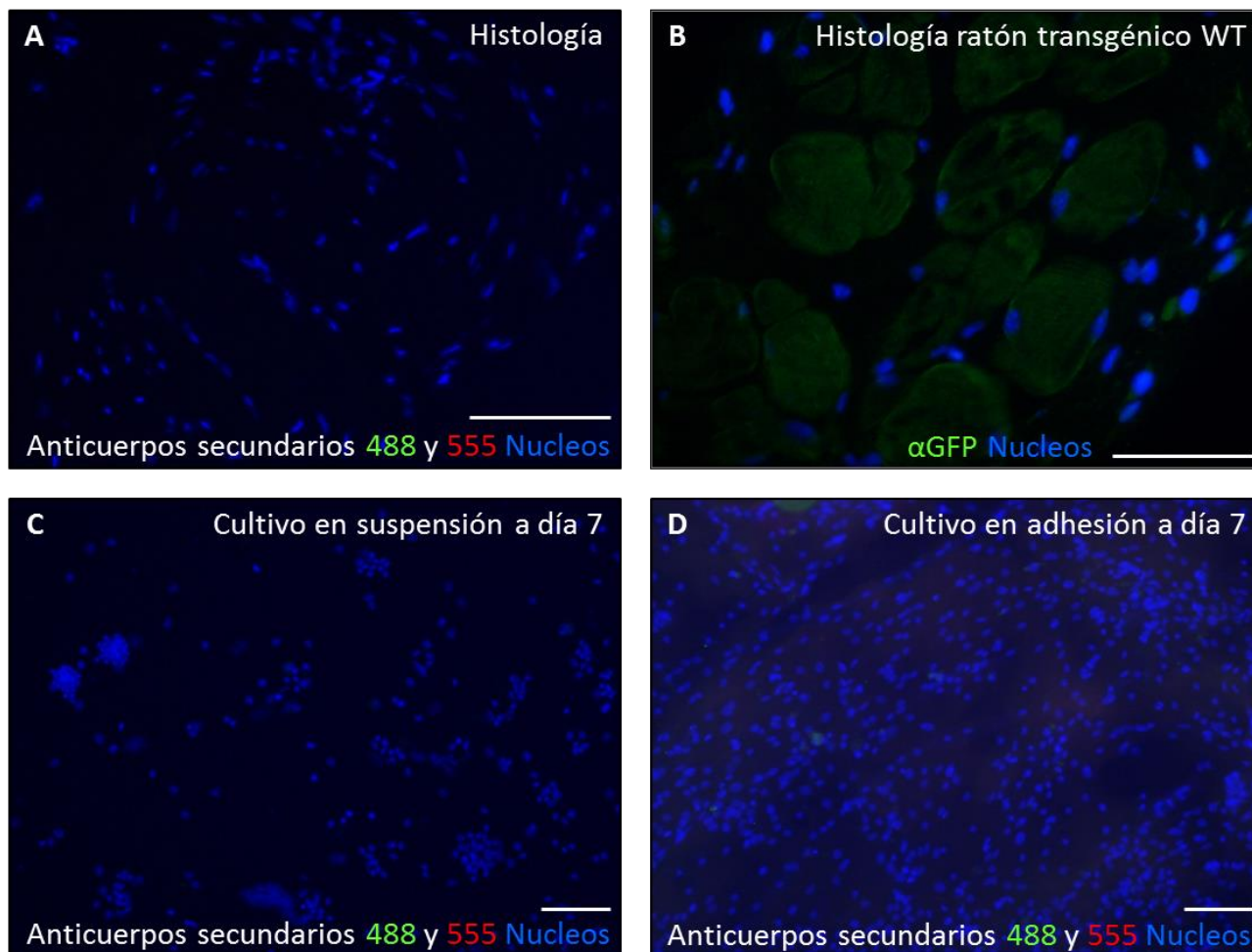


Figura 10.5. Controles negativos empleados en las inmunofluorescencias. (A-D) Fotografías representativas de la fluorescencia de los anticuerpos secundarios detectada en ausencia de anticuerpos primarios, en los cortes histológicos (A), en los cultivos en suspensión a día 7 (C) y en los cultivos en adhesión a los 7 días (D); y de la fluorescencia emitida por las muestras procedentes de los ratones WT en los cortes histológicos (B). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) y las barras de tamaño representan 100 μ m en todos los paneles.

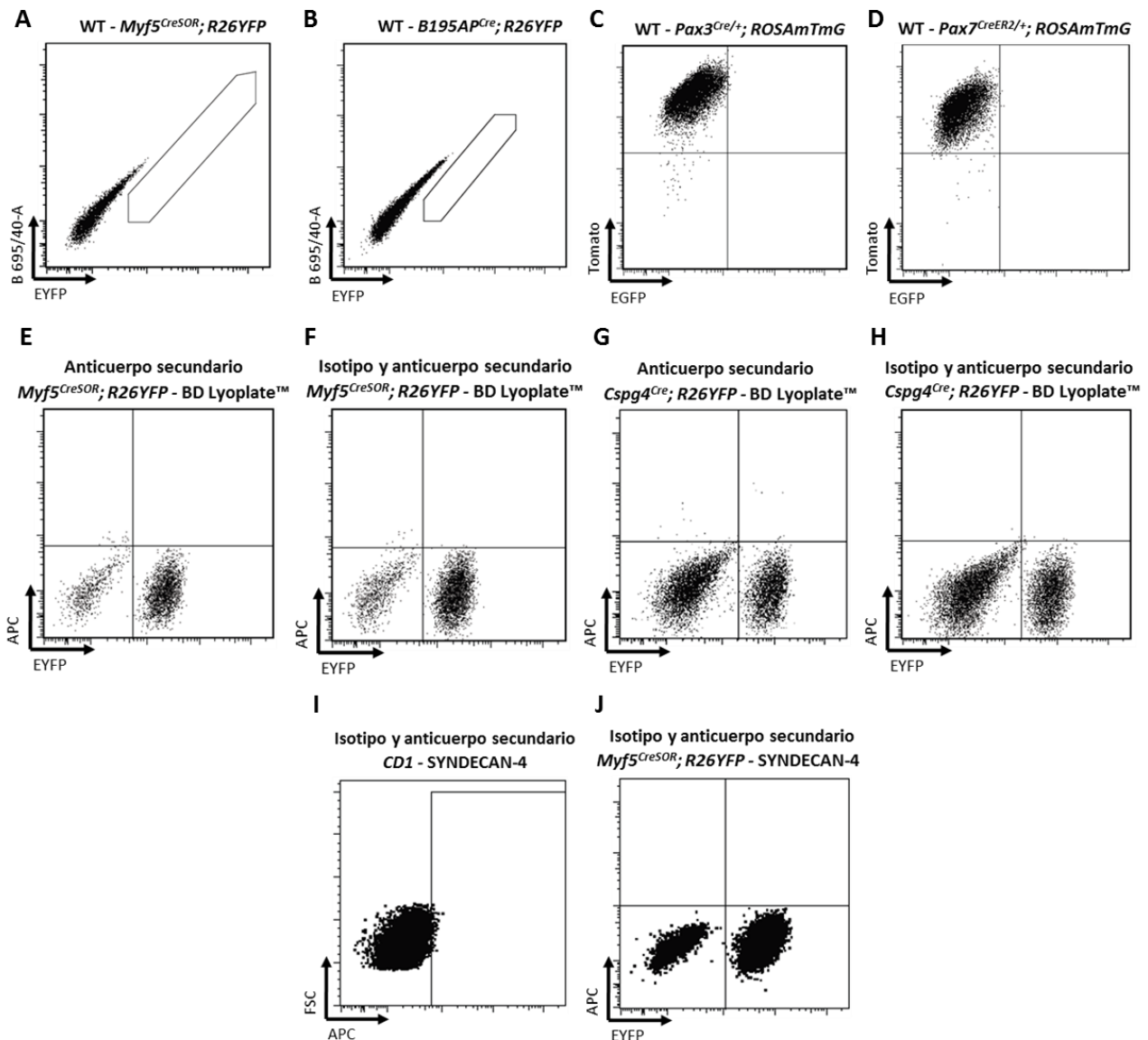


Figura 10.6. Controles aportados para los análisis por citometría de flujo. (A-D) Fluorescencia detectada en las muestras procedentes de los ratones WT de los trazados de linaje de *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* (A), *B195AP^{Cre}; R26YFP* (B), *Pax3^{Cre/+}; ROSAmTmG* (C) y *Pax7^{CreER2/+}; ROSAmTmG* (D). (E-H) Fluorescencia de los anticuerpos secundarios detectada en ausencia de los anticuerpos primarios (E, G) y en presencia de los isotipos (F, H) durante el examen masivo de la expresión de proteínas de superficie con el BD Lyoplate™ en muestras procedentes de los ratones *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* (E-F) y *Cspg4^{Cre}; R26YFP* (G-H). (I-J) Fluorescencia de los anticuerpos secundarios detectada en presencia del isotipo durante la separación en base a la expresión de SYNDECAN-4 en muestras procedentes de los ratones *CD1* (I) y *Myf5^{CreSOR}; R26YFP* (J).

10.4 Anexo IV: Artículos publicados en relación al presente trabajo

Murine Muscle Engineered from Dermal Precursors: An *In Vitro* Model for Skeletal Muscle Generation, Degeneration, and Fatty Infiltration

Patricia García-Parra, PhD,¹⁻³ Neia Naldaiz-Gastesi, BSc,^{1,2} Marcos Maroto, BSc,⁴
Juan Fernando Padín, PhD,⁴ María Goicoechea, PhD,^{2,3} Ana Aiastui, PhD,^{2,3}
José Carlos Fernández-Morales, BSc,⁴ Paula García-Belda, BSc,^{3,5} Jaione Lacalle, PhD,^{1,2,6}
Jose Iñaki Álava, PhD,⁷ José Manuel García-Verdugo, PhD,^{3,5} Antonio G. García, MD, PhD,⁴
Ander Izeta, BSc, PhD,¹ and Adolfo López de Munain, MD, PhD^{2,3,8,9}

Skeletal muscle can be engineered by converting dermal precursors into muscle progenitors and differentiated myocytes. However, the efficiency of muscle development remains relatively low and it is currently unclear if this is due to poor characterization of the myogenic precursors, the protocols used for cell differentiation, or a combination of both. In this study, we characterized myogenic precursors present in murine dermospheres, and evaluated mature myotubes grown in a novel three-dimensional culture system. After 5–7 days of differentiation, we observed isolated, twitching myotubes followed by spontaneous contractions of the entire tissue-engineered muscle construct on an extracellular matrix (ECM). *In vitro* engineered myofibers expressed canonical muscle markers and exhibited a skeletal (not cardiac) muscle ultrastructure, with numerous striations and the presence of aligned, enlarged mitochondria, intertwined with sarcoplasmic reticula (SR). Engineered myofibers exhibited Na⁺- and Ca²⁺-dependent inward currents upon acetylcholine (ACh) stimulation and tetrodotoxin-sensitive spontaneous action potentials. Moreover, ACh, nicotine, and caffeine elicited cytosolic Ca²⁺ transients; fiber contractions coupled to these Ca²⁺ transients suggest that Ca²⁺ entry is activating calcium-induced calcium release from the SR. Blockade by d-tubocurarine of ACh-elicited inward currents and Ca²⁺ transients suggests nicotinic receptor involvement. Interestingly, after 1 month, engineered muscle constructs showed progressive degradation of the myofibers concomitant with fatty infiltration, paralleling the natural course of muscular degeneration. We conclude that mature myofibers may be differentiated on the ECM from myogenic precursor cells present in murine dermospheres, in an *in vitro* system that mimics some characteristics found in aging and muscular degeneration.

Introduction

MUSCLE IS ONE of the major tissues by weight in the body, conferring adaptive functions of great value such as external and internal mobility (the latter being important for cardiac muscle and internal cavity and vessel contraction). Energetically, it is a high consumption organ, and due to its demanding physiology throughout a normal lifespan,

skeletal muscle requires lifelong regenerative capacities that are provided by a resident stem cell pool, known as satellite cells.¹ However, age-associated trauma and immobility may produce sarcopenia, an indirect cause of mobility problems in older people.² In particular, the frail elderly are typically most exposed to falls, which have a major economic impact on public health systems worldwide. On the other hand, genetic or toxic injuries may also cause transient or

¹Tissue Engineering Laboratory, Bioengineering Area, Instituto Biodonostia, Hospital Universitario Donostia, San Sebastian, Spain.

²Neuroscience Area, Instituto Biodonostia, Hospital Universitario Donostia, San Sebastian, Spain.

³CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain.

⁴Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Departamento de Farmacología y Terapéutica and Servicio de Farmacología Clínica del IIS del Hospital Universitario de La Princesa, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

⁵Laboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, Valencia, Spain.

⁶School of Nursing, University of the Basque Country (UPV-EHU), San Sebastian, Spain.

⁷Basque Culinary Center R&D, San Sebastian, Spain.

⁸Department of Neurosciences, University of the Basque Country (UPV-EHU), San Sebastian, Spain.

⁹Department of Neurology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastian, Spain.

progressive muscular degeneration. Muscular dystrophies encompass a heterogeneous family of genetic conditions that generate physical disability and have a devastating impact on patients and relatives.³ In both scenarios, the study of muscular function has been mostly based on human muscle biopsies (taken for diagnostic purposes) and analyses of murine models, both in healthy and genetically modified animals that recapitulate myopathic diseases. However, muscle biopsies are progressively being replaced in clinical practice by less invasive diagnostic methods, such as diagnostic radiology⁴ and subsequent molecular profiling,⁵ which have quickly become the clinical gold standard.⁶ On the other hand, animal models do not always reflect all aspects of human pathology. For these reasons, the ability to generate a human cell-based, tissue-engineered system to study muscle physiology and pathology constitutes a major scientific goal.

Embryonic and induced pluripotent stem (ES/iPS) cell-derived human myogenic cell cultures are already being used successfully as preclinical models of muscular disease.^{7,8} However, ES/iPS cell-based muscle modeling systems are expensive and time-consuming to develop, and as such, could be complemented by a simpler and more cost-effective adult stem cell-based culture model. Moreover, two-dimensional cellular models do not reflect many aspects of muscular physiology,⁹ and it is thus desirable to engineer three-dimensional (3D) tissue constructs that more properly reflect muscle properties *in vivo*, such as contractility seen on constructs engineered on collagen gels.¹⁰ In this sense, and although a number of 3D tissue-engineered muscle constructs are available,¹¹ it is currently acknowledged that a suitable cell source (other than satellite cells, which grow poorly *in vitro*) and improved myogenic differentiation protocols, are urgently needed.¹² It is therefore apparent that an alternative muscle progenitor cell source would be desirable to develop tissue-engineered models, which should have an easier (less invasive) access than muscle. Ideally, and to treat adult onset muscular diseases, the cell source should be available in adults.

While several alternative cell sources are being considered,¹³ skin-derived precursor cells (SKPs) meet both these requirements. These dermal precursors may be isolated via minimally invasive procedures.^{14,15} Furthermore, derivation of skeletal muscle has been achieved from murine SKP cultures, although with relatively low efficiency compared to other myogenic precursor cells.^{16,17} In this article, by making use of a novel 3D support composed of a mixture of Matrigel-like extracellular matrix (ECM), hyaluronic acid, and netrins, we improve the differentiation of murine dermal precursors to achieve levels of myogenicity similar to those of muscle satellite cells on similar supports.^{18,19} Future work will pursue derivation of similar engineered muscle constructs from human dermis-derived cells.

Materials and Methods

Animals

Eight-week-old female CD1 mice were used in accordance to the guidelines and approval provided by the Biodonostia Animal Care Committee (San Sebastian, Spain) in accordance with the European Directive 2010/63/EU and the guidelines established by the National Council on Animal Care.

Isolation and proliferation of dermal precursor cells

Precursor cells were isolated from back skin as described.²⁰ For primary dermosphere expansion, a proliferation medium [Neurobasal™ A (Gibco) supplemented with 2% B27 (Gibco), 1% L-glutamine 200 mM (Sigma-Aldrich), and 1% penicillin/streptomycin] was supplemented every 2 days with a 2% low serum growth supplement (LSGS, Gibco), 40 ng/mL of the epidermal growth factor (EGF; R&D), and 80 ng/mL of the basic fibroblast growth factor (FGF2; R&D).

Preparation of ECM and poly-L-ornithine-coated substrates

ECM-coated glass coverslips were prepared as described,²¹ that is, incubated with a solution of Cultrex® basement membrane extract, hyaluronan, and netrins in phosphate-buffered saline (PBS). To compare ECM-based culture with a previously published protocol,¹⁶ a 0.01% solution of poly-L-ornithine in distilled water (Sigma-Aldrich) was used to coat coverslips, followed by a PBS wash and a drying period of 1 h under laminar flow.

Skeletal muscle induction and contractile myotube video recordings

For muscle induction, primary dermospheres after 7 days of proliferation were gently disaggregated with a 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich) and resuspended in the differentiation medium [the proliferation medium without added growth factors plus 10% fetal bovine serum (FBS; ATCC)], before plating onto coated coverslips at a density of 75,000 cells/cm². Every 2 days, half of the culture volume was replaced with a fresh medium. At day 5–7 of differentiation, myoblast fusion and contractile activity were observed. Bright field microscopic images of cultures as well as video recordings of twitching myotubes were taken by using a Nikon D90 digital camera coupled to a Nikon Eclipse TS100 microscope.

Skin histology

Murine dorsal skin fragments of approximately 0.5 cm² were excised, embedded in a Tissue-Tek® O.C.T.™ compound (Sakura), and immediately frozen in isopentane (Merck) cooled in liquid nitrogen. Seven micron transverse sections were processed and stained with hematoxylin–eosin (H&E).²²

Immunofluorescence and microscopy

Cells were washed with PBS (pH 7.2, Ca²⁺ and Mg²⁺ free, Gibco) and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; Electron Microscopy Sciences) for 10 min at room temperature (RT). Cells were further washed twice in PBS, and permeabilized/blocked by using 0.3% Triton® X-100 in PBS (PBST) plus 5% normal donkey serum (Sigma-Aldrich) for 1 h at RT. Cells were incubated with the appropriate primary antibody diluted in PBST for 2 h at RT (detailed in Supplementary data; Supplementary Data available online at www.liebertpub.com/tec). After three PBS washes (5 min each), fixed cells were incubated for 1 h at RT with a donkey anti-mouse Alexa Fluor® 488 secondary antibody (Invitrogen; 1:500) diluted in PBST. Before mounting in Mowiol® (Fluka), cells were counterstained with 10 µg/mL Hoechst 33258

(Sigma-Aldrich) for 5 min at RT and washed with distilled water. Fluorescence images were obtained by using a Nikon Eclipse 80i microscope coupled to Nikon Digital Sight and analyzed with Nikon NIS-Elements Advance Research software. For quantitative assessment, at least nine different fields out of three independent experiments were quantified. To estimate the total cell number in each photograph, the number of nuclei stained by Hoechst was counted and the percentage of cells positive for each immunostain was determined.

Gene expression

Total RNA was extracted from cells by the miRNeasy Mini kit (Qiagen) and converted into complementary DNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Skeletal (gastrocnemius muscle) and cardiac muscle tissues were also used as positive and negative controls for myogenic gene expression analysis, respectively. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis was carried out using TaqMan gene expression assays in the 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Each cDNA sample was amplified in triplicates. The cycling conditions were 95°C/10 min followed by 40 cycles at 95°C/15 s, 60°C/1 min in a reaction mixture that contained 1×TaqMan Universal PCR Master Mix and 1×Assay Mix in a final volume of 10 µL. The relative quantity of the gene target was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.²³

Western blot

Western blots (WB) were performed as described,²⁴ with minor modifications. Briefly, skeletal (gastrocnemius) and cardiac muscle samples were weighed and homogenized in a TissueLyser mixer-mill disruptor (Qiagen) in 19:1 w/v treatment buffer (0.125 M Tris, 4% SDS, 10% glycerol, 0.1 M EDTA, and 5% β -mercaptoethanol). Similarly, 2×10^6 cells were lysed in 100 µL of the treatment buffer. About 3×10^5 of the lysed cells, as well as 5 µg of homogenized samples, were loaded onto SDS-polyacrylamide gels (Bio-Rad).

Transmission electron microscopy

After fixation in 3.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences), cell cultures were washed in 0.1 M PBS (pH 7.4) and treated with 2% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences) in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 2 h at RT. Samples were rinsed, dehydrated through increasing ethanol solutions, and stained in 2% uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences) in 70% ethanol. Dehydrated cell cultures were embedded in araldite (Fluka). Semithin sections (1.5 µm thick) were cut with a diamond knife and stained with a 1% Toluidine blue solution (Sigma-Aldrich), re-embedded for ultrathin (70 nm-thick) sectioning, and examined under a Tecnai-Spirit Transmission Electron Microscope coupled to a Morada TEM CCD camera (Soft Imaging System).

Electrophysiological recordings, data acquisition, and analysis

Electrophysiological properties of twitching myotubes were investigated after 10–14 days in culture using whole-cell patch-clamp recording techniques.²⁵ Acetylcholine (ACh)-induced currents, action potentials, and membrane

potential changes were recorded using the perforated patch configuration²⁶ under either current or voltage clamp mode, respectively. Myotube-containing, ECM-coated coverslips were placed on a recording experimental chamber mounted on the stage of a Nikon Eclipse T2000 inverted microscope. A perforated patch was obtained using borosilicate glass pipettes (Kimble Chase) containing 50–100 µg/mL amphotericin B in DMSO (both from Sigma-Aldrich) as a permeabilizing agent,²⁷ and a pipette-filling intracellular solution (freshly prepared every 2 h) containing (in mM) 135 KCl, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, and 5 EGTA (pH 7.3 with KOH) (all from Sigma-Aldrich). To facilitate sealing, the pipette was first dipped in a beaker containing the internal solution, and then back-filled with the same solution containing amphotericin B. Recordings started when access resistance decreased below 15 M Ω , which usually occurred within 10 min of sealing. Voltage and current recordings were made with fire-polished electrodes (resistance 2–5 M Ω when filled with the intracellular solution) mounted on the headstage of an EPC-10 patch-clamp amplifier (HEKA Electronic), allowing cancellation of capacitive transients and compensation of series resistance. Data were acquired with a sample frequency of 5 kHz. Recordings with leak currents >100 pA or series resistance >20 M Ω were discarded. During recording, myotubes were locally, rapidly, and continuously superfused with a Tyrode's solution containing (in mM) 2 CaCl₂, 137 NaCl, 1 MgCl₂, 10 glucose, 5.3 KCl, and 10 HEPES/NaOH (pH 7.3; all from Sigma-Aldrich). The different drugs (ACh; tetrodotoxin, TTX; d-tubocurarine, dTC) were dissolved in the extracellular solutions, which were rapidly exchanged using electronically driven miniature solenoid valves coupled to a multibarrel concentration-clamp device, the common outlet of which was placed within 100 µm of the cell to be patched. The flow rate was 1 mL/min and was regulated by gravity. Data acquisition was performed using PULSE programs (HEKA Elektronik) while data analysis was performed using GraphPad Prism software (version 5.01 for Windows). All experiments were performed at room temperature (22°C–24°C). At least three independent experiments were performed to determine the significance of statistical results.

Measurements of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c) changes, data acquisition and analysis

The setup for fluorescence recordings was composed of a Leica DMI 4000 B inverted light microscope (Leica Microsystems) equipped with an oil immersion objective (Leica 40×Plan Apo; numerical aperture 1.25). Before assessment, cells were incubated for 1 h at 37°C in the differentiation medium containing the calcium probe Fura-2 AM (10 µM; Invitrogen). After Fura-2 loading, coverslips were mounted in a chamber, and washed/covered with the Tyrode's solution (as above). Cells were continuously superfused by means of a five-way superfusion system at 1 mL/min with a common outlet 0.28-mm tube driven by electrically controlled valves with the Tyrode's solution with/without drugs (ACh; nicotine; histamine; caffeine; nifedipine; d-tubocurarine, dTC; all from Sigma-Aldrich). Fura-2 AM was excited alternatively at 340 ± 10 and 387 ± 10 nm using a Leica Küber CODIX xenon lamp and emitted fluorescence was collected through a 540 ± 20 nm emission filter and measured

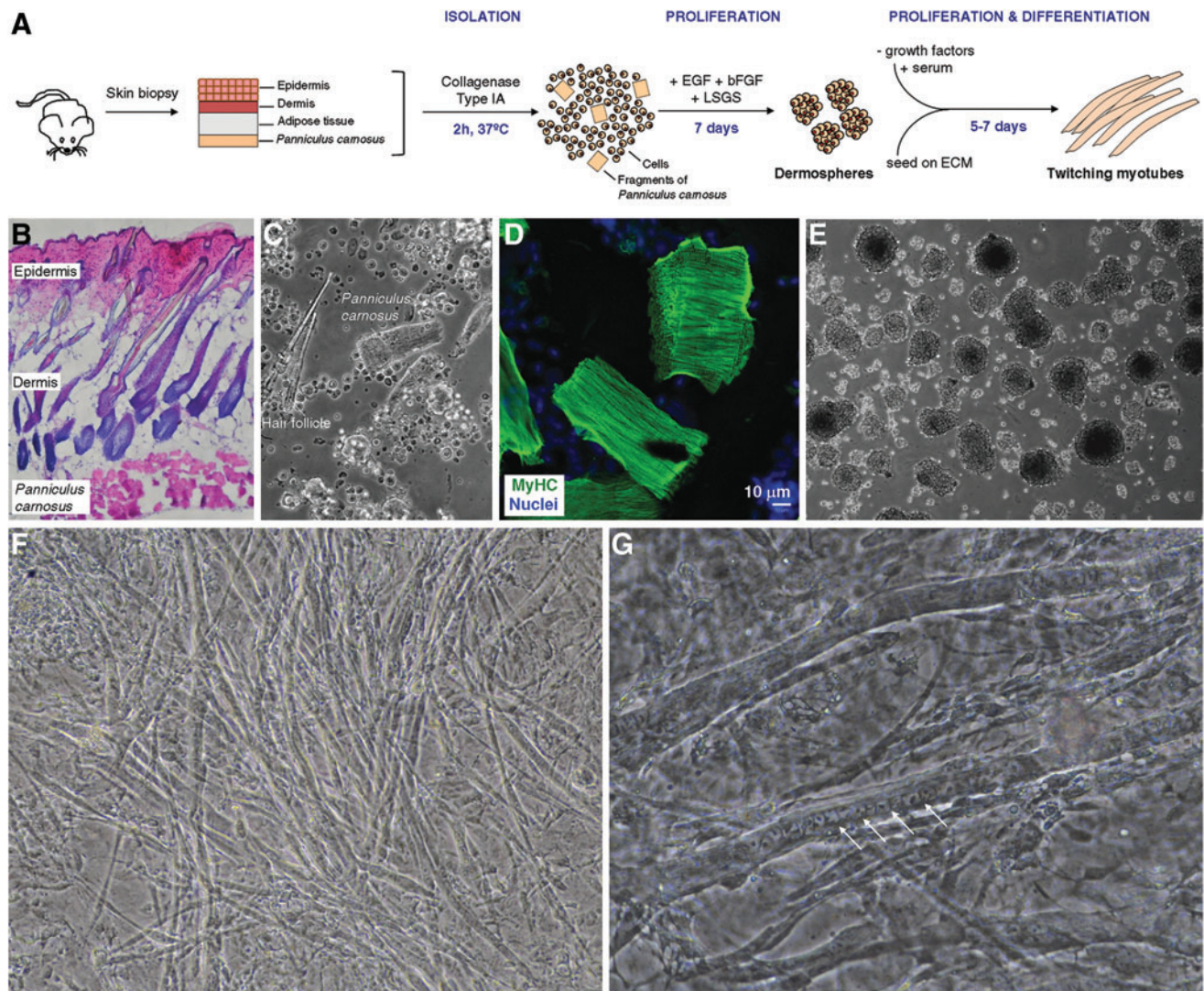


FIG. 1. Twitching myotubes engineered from dermal precursor cells. **(A)** Strategy to engineer twitching myotubes from dermal precursor cells *in vitro*. Once isolated, dermis-derived cells were expanded as dermospheres in the presence of EGF, FGF2, and LSGS. After growth factor withdrawal, dermospheres were differentiated into myotubes by seeding on the extracellular matrix (ECM) and supplementing with serum. **(B–E)** Histological analyses show the presence of *Panniculus carnosus* in murine skin (**B**, $\times 100$ magnification). After disaggregation, small muscle fragments are present in dermal cultures (**C**, $\times 100$), as confirmed in **(D)** by MyHC immunostaining (nuclei are counterstained with Hoechst; scale bar, $10\ \mu\text{m}$). No muscle fragments were detected in dermosphere cultures after 7-day proliferation (**E**, $\times 100$), at the time when spheres were seeded on ECM. **(F, G)** A large number of multinucleated (arrows in **G**), twitching myotubes were observed in culture after 5- to 7-day differentiation (**F**, $\times 100$; **G**, $\times 200$). Color images available online at www.liebertpub.com/tec

with an intensified charge coupled device camera (Hamamatsu camera controller C10600 orca R²). Fluorescence images were generated at 1-s intervals. Images were digitally stored and analyzed using LAS AF software (Leica). Data analysis was carried out on a personal computer, and data obtained from LAS AF software were exported to Microsoft Excel tables. Graphs and mathematical analyses were performed using the Graphpad Prism software (version 5.01). Areas or peak heights were calculated by integrating the calcium transient over time during the stimulus duration by means of Origin Pro 8 SR2 software (version 8.0891; OriginLab Corporation). Areas were worked out by the integration of the input data set by using the trapezoidal rule. Results are expressed as mean \pm SEM.

Adipogenic assays

Adipocytes were assessed by Oil Red O staining.²⁸ Cultures were fixed twice in 10% formalin (Sigma-Aldrich) for 10 min and 1 h at RT, respectively. Fixed cultures were rinsed sequentially with distilled water and 60% isopropanol (Sigma-Aldrich) for 5 min at RT. Once completely dry, cells were stained with the Oil Red O working solution [60% stock solution (0.35% Oil Red O (Sigma-Aldrich) in isopropanol) and 40% distilled water] for 10 min at RT. After four consecutive washes with distilled water, images were acquired. Water was then removed and Oil Red O eluted by adding 100% isopropanol for 10 min under gentle shaking. Optical absorbance (OD) at 500 nm was measured using 100%

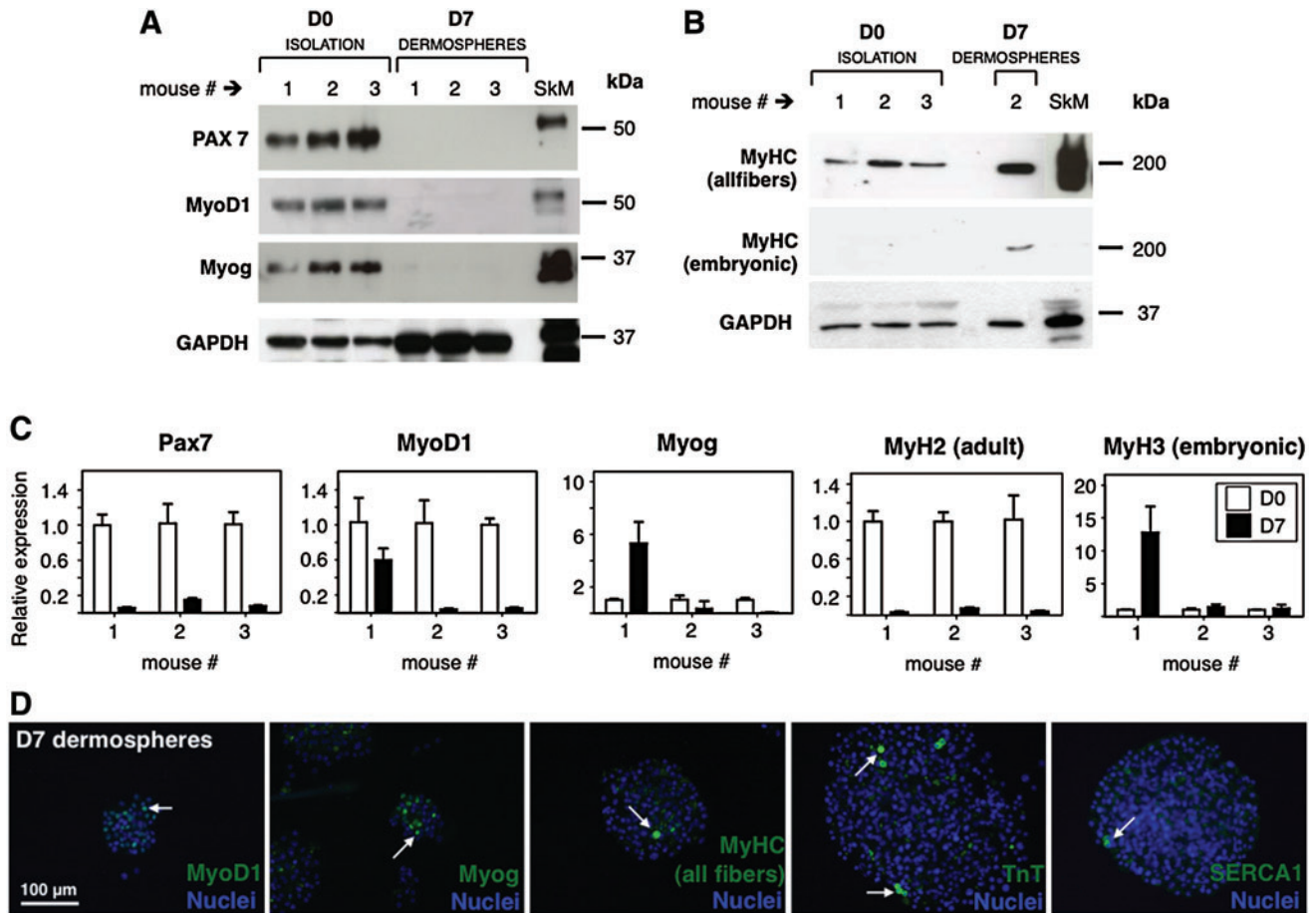


FIG. 2. Presence of myogenic markers in dermal spheres at the proliferation phase. **(A, B)** Western blot of myogenic markers Pax7, MyoD1, Myog, and MyHC (all fibers and embryonic subtypes) using GAPDH as a loading control. Proteins were detected at day 0 and day 7 of dermosphere culture, as well as in skeletal muscle (SkM) as a positive control. Position of known size markers is shown to the right of each panel, mouse replicates on the top. **(C)** Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) of myogenic markers *Pax7*, *MyoD1*, *Myog*, *MyH2*, and *MyH3*; as detected at day 0 (empty bars) and day 7 (black bars) of dermosphere culture. Expression of mRNAs is shown relative to day 0. Mouse replicates are shown on the bottom of each graph. **(D)** Detection of myogenic markers MyoD1, Myog, MyHC, TnT, and SERCA1 by immunofluorescence at day 7 dermospheres. A discrete population of dermosphere cells (arrows) expressed myogenic markers in culture (scale bar, 100 μ m). Color images available online at www.liebertpub.com/tec

isopropanol as a blank. Three individual experiments were performed and results were expressed as fold change respect to the basal condition (24 h after culture, absence of adipocytes). The total concentration of triglycerides was determined by a coupled enzyme assay (Adipogenesis Assay Kit; Sigma-Aldrich), which results in a colorimetric (570 nm) product proportional to the triglycerides present in each sample.

Assessment of statistical significance

Statistics carried out using GraphPad Prism software. A one-way analysis of variance (ANOVA) with subsequent pairwise multiple comparison procedures (Bonferroni's test) was used to assess the statistical significance of the results from immunocytochemistry, RT-qPCR, and adipogenesis experiments. Unless otherwise stated, statistical analyses of patch-clamp results were carried out with the one-way ANOVA test followed by Tukey's *post hoc* analyses. Single or multiple cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) changes

were carried out with a one-tailed paired *t*-test for a confidence interval of 95% or the one-way ANOVA test followed by Dunnett's *post hoc* analyses, respectively. The signs *, **, or *** represent a statistical significance of $p < 0.05$, $p < 0.01$, or $p < 0.001$, respectively.

Results

Spontaneously twitching myotubes engineered from dermis-derived precursors

Once adult dermal precursors that present myogenic potential (both *in vitro* and *in vivo*) as previously described^{16,17} were obtained, two major questions remain unanswered: (1) what is the source of myogenic precursors within murine skin, and (2) can we improve the relatively minor differentiation potential shown *in vitro* by these precursors? To shed light on both issues, we set up an improved isolation, proliferation, and differentiation protocol for dermis-derived precursors as depicted in Figure 1A. Of note, primary cell

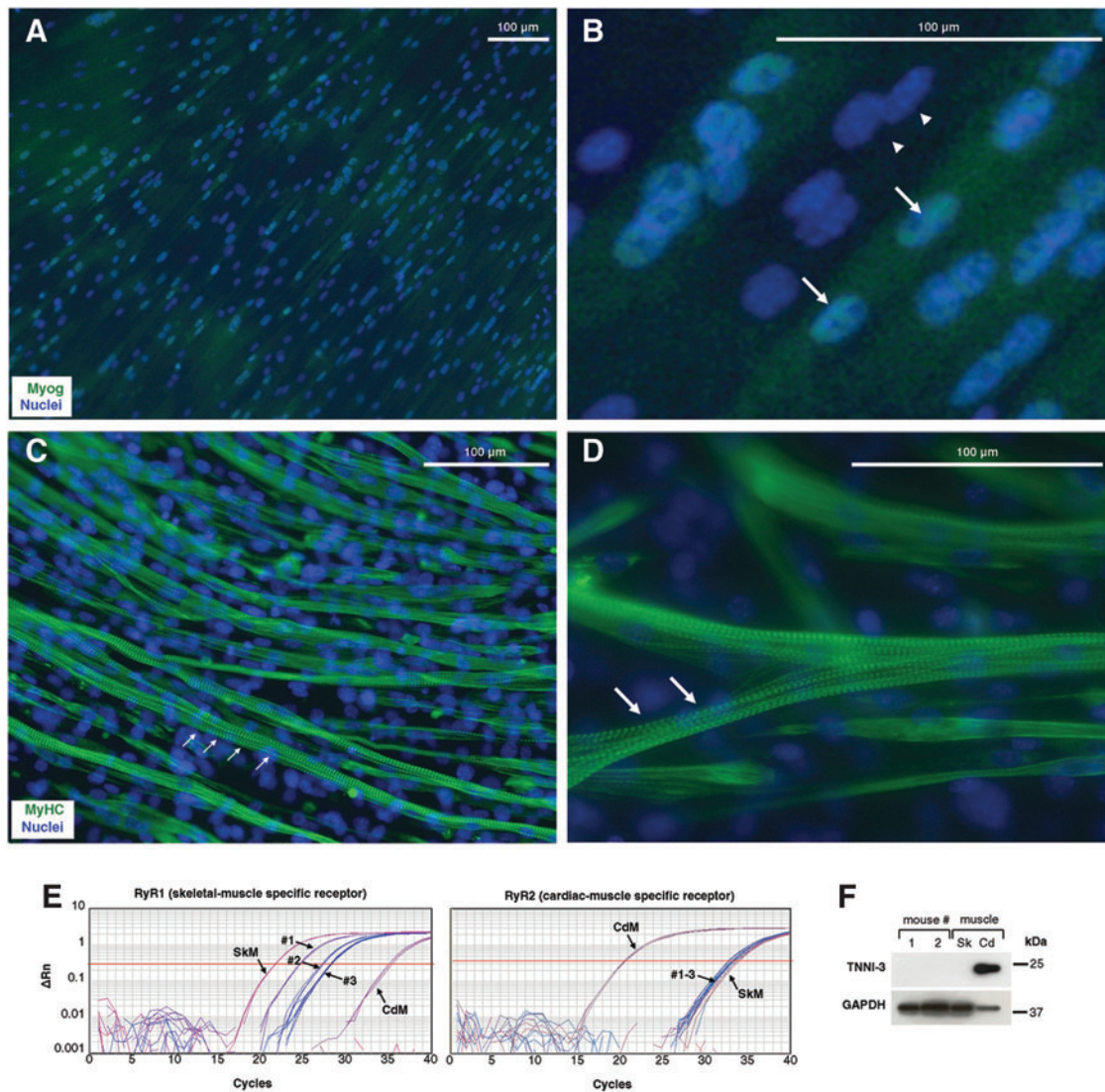
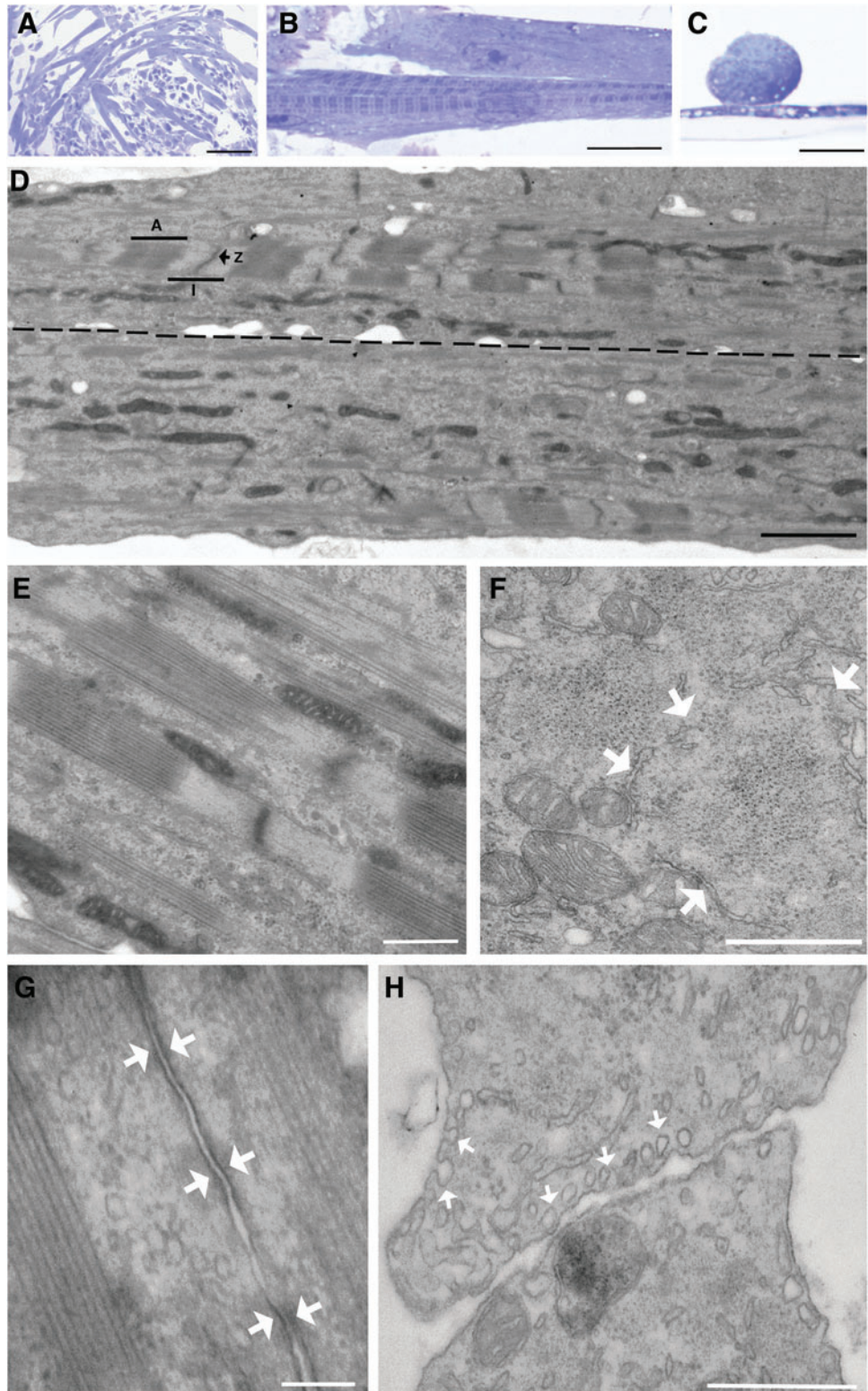


FIG. 3. Engineered muscle is composed of skeletal (not cardiac) myotubes. (A–D) By immunofluorescence, myotubes grown for 7 days on the ECM showed high nuclear expression of myogenin (A, B, arrows; note that other nonmyogenic cells are present in culture, but no expression of myogenin is detected in their nuclei, arrowheads) and sarcoplasmic MyHC (C, D). Striated patterns (arrows), indicative of contractile function, are clearly visible. Nuclei were counterstained with Hoechst. Scale bars, 100 μ m. (E) RT-qPCR analyses showed that skeletal muscle-specific ryanodin receptor (*RyR1*) mRNA is expressed by twitching myotubes, although at lower levels than skeletal muscle (SkM) (E, as compared with positive cardiac muscle-CdM control) and cardiac-specific troponin (TNNI-3) expression by WB (F), corroborated the skeletal (not cardiac) nature of contractile myotubes. Color images available online at www.liebertpub.com/tec

preparations of disaggregated murine skin include fragments of *Panniculus carnosus* (PC) muscle (Fig. 1B–D). After 7 days of proliferation, dermis-derived precursors generated spheres, while muscle fragments were no longer visible in culture (Fig. 1E). Dermal spheres, enriched in precursor cells, were then seeded onto ECM-coated coverslips, and multinucleated myotubes were observed after 5–7 days in the presence of serum (Fig. 1F, G). Interestingly, the engineered myotubes twitched spontaneously, at times in relative isolation (Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/tec), but often in a more widespread and synchronous fashion (Supplementary Movies SM1–SM3).

To characterize the appearance of myogenic markers in dermal proliferation culture, expression of Pax7, MyoD1, Myogenin (Myog), and MyHC were analyzed at day 0 and 7 of sphere culture by Western blot (Fig. 2). As expected (since muscle fragments were present straight after tissue disaggregation), myogenic markers Pax7, MyoD1, Myog, and MyHC (all fibers) were readily detected at day 0. In contrast, embryonic MyHC, a marker of myogenic precursors and nascent myotubes, was absent. Interestingly, expression of all these markers diminished (to levels barely detectable by Western blot) by day 7 when dermospheres were already fully formed. The only exception being embryonic MyHC that was clearly detected at this stage (Fig. 2A, B). These data thus

FIG. 4. Ultrastructural characterization of myotubes. **(A–C).** Aspect of semithin (1.5- μm) sections stained with Toluidine blue. **(A)** Semithin sections showing tubular and spherical cells (scale bar, 100 μm). **(B)** Longitudinally oriented myofibers show clear striations (scale bar, 40 μm). **(C)** A transversally sectioned fiber sits on top of a longitudinally sectioned fiber (scale bar, 30 μm). **(D–H)** Ultrathin (70-nm) sections of muscle fibers, as seen by electron microscopy. **(D)** Panoramic view of two adjacent cells (separated by a discontinuous line), where typical striations of skeletal muscle may be seen. Position of A band, I band, and Z line are indicated (scale bar, 2 μm). Enlarged mitochondria running parallel to fibers are also visible. **(E)** Enlarged image of myofiber organization. Smooth endoplasmic reticulum (SER) cisternae and mitochondria are alternatively detected between myofiber groups (scale bar, 1 μm). **(F)** Transversal section, where myofiber organization is observed: myofibrils are surrounded by SER (arrows) and mitochondria (scale bar, 500 nm). **(G)** Dense muscular (adherens) junctions (arrows) in between adjacent muscular fibers (scale bar, 200 nm). **(H)** Two transversally sectioned myofibers show abundant caveoles (arrows) in the proximity of the cell membrane and myofibrils (scale bar, 500 nm). Color images available online at www.liebertpub.com/tec



confirmed that muscle tissue remnants appeared in dermal cultures at day 0, but not at day 7, and suggested the appearance/enrichment of a myogenic precursor during proliferation culture. To further validate protein expression data, messenger RNA levels for the genes *Pax7*, *MyoD1*, *Myog*, *MyH2* (adult myosin), and *MyH3* (embryonic myosin) were analyzed at day 7 relative to day 0 by real-time quantitative

PCR (RT-qPCR, Fig. 2C). The results confirmed a reduction of myogenic gene mRNA levels as culture progressed, with the exception of embryonic MyHC that was stable or augmented with culture progression. To discriminate the proportion of sphere cells adopting myogenic commitment, expression of *MyoD1*, *Myog*, *MyHC*, *TnT*, and *Serca1* was analyzed by immunofluorescence in day 7 dermospheres (Fig. 2D).

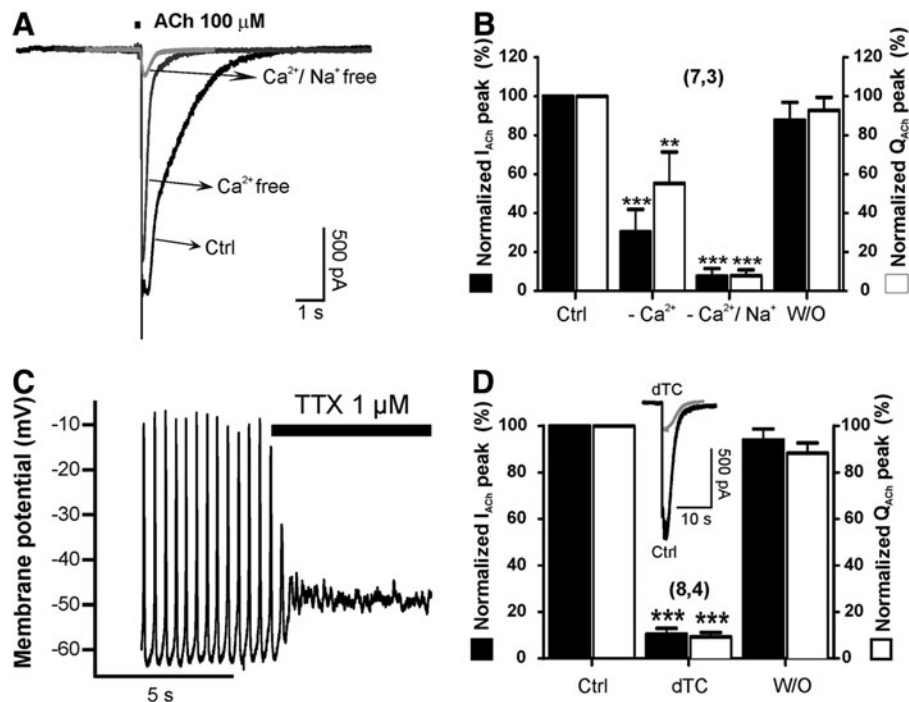


FIG. 5. Acetylcholine-elicited currents (I_{ACh}) and electrical excitability of differentiated beating myotubes. **(A)** Example nicotinic current (I_{ACh}) traces obtained under the voltage-clamp mode of the patch-clamp technique in the presence of Ca^{2+} and Na^+ (Ctrl), in the absence of Ca^{2+} (Ca^{2+} free), and in the absence of Ca^{2+} and Na^+ (Ca^{2+}/Na^+ free). **(B)** Quantitative pooled results on the effects of Na^+ and Ca^{2+} removal on I_{ACh} , and current recovery on returning to the control extracellular saline solution (W/O). **(C)** A current-clamped myotube that exhibited spontaneous firing of action potentials that were suppressed by tetrodotoxin (TTX). **(D)** Effects of the d-tubocurarine (dTC) cell perfused 5 min before and during the ACh pulse; peak current (I) and charge (Q) were normalized in each individual cell expressed as% of initial ACh pulse. Data in panels **B** and **D** are means \pm SEM. of the number of cells (n) from different cultures (N) shown in parentheses (n, N). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, with respect to controls.

Interestingly, a discrete subpopulation of cells was found to express myogenic markers, while the bulk of the precursor cells in the sphere remained negative at day 7. Taken together, these results suggest that twitching myotubes derive from a discrete population of myogenic precursors present in dermal spheres at day 7 of proliferation.

Myotubes present structural characteristics of bona fide skeletal muscle

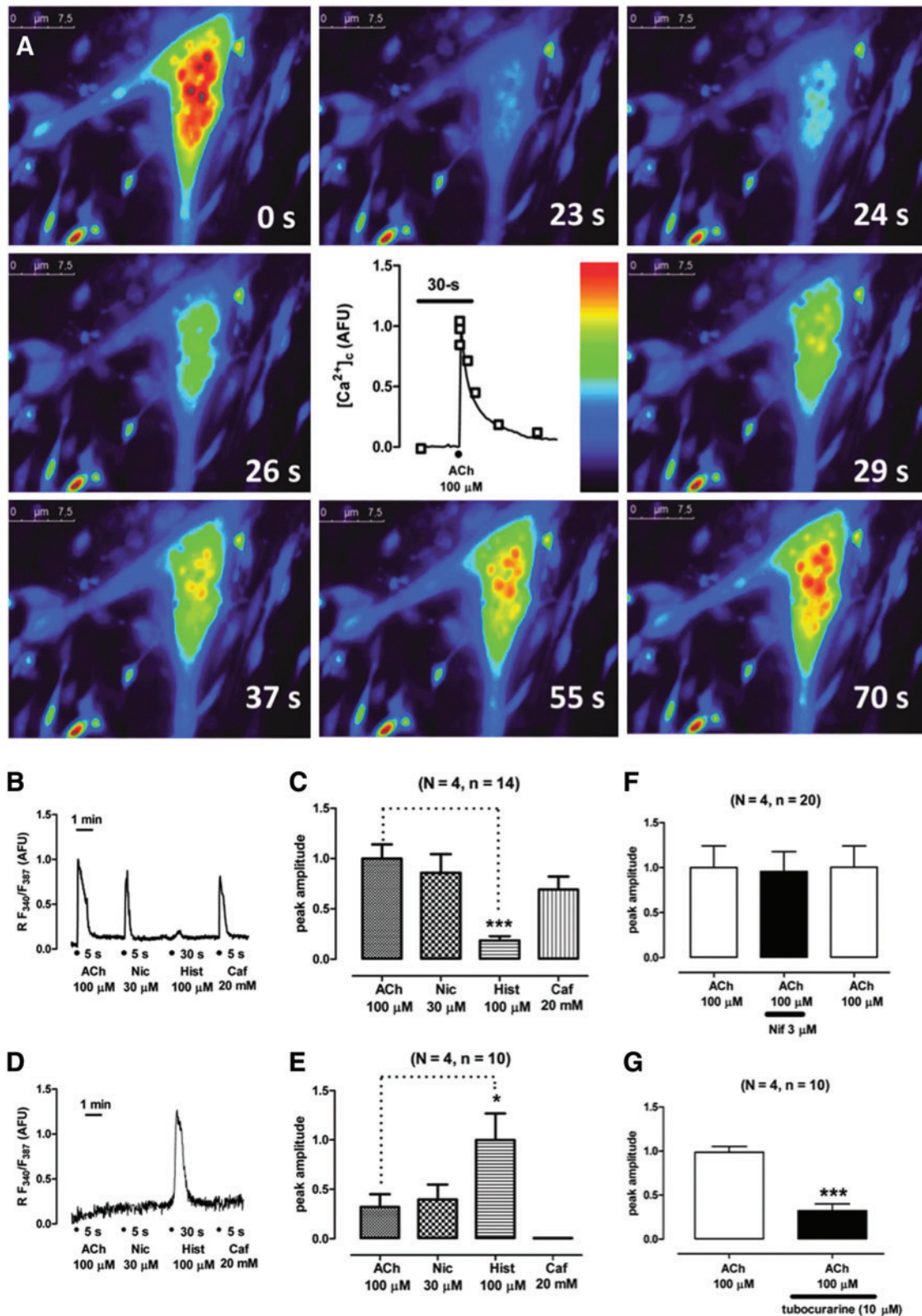
To further characterize *in vitro* engineered myotubes, the expression and subcellular localization of myogenin and MyHC were analyzed by immunofluorescence (Fig. 3). As expected, multinucleated myotubes that express nuclear

Myog were readily detected (Fig. 3A, B). Myotubes showed the characteristic striated pattern of MyHC, as predicted for sarcomeric proteins (Fig. 3C, D). Since SKPs are neural crest derived, and similar tissue-resident precursors have been shown to differentiate into cardiomyocytes,²⁹ we wondered if the observed striated phenotype might correspond to the cardiac, not skeletal muscle. For this reason, we analyzed expression of skeletal or cardiac muscle-specific ryanodine receptors by RT-qPCR (Fig. 3E). Skeletal muscle-specific *RyR1* mRNA was readily detected, while cardiac muscle-specific *RyR2* remained undetectable as compared to control samples of both striated muscles. Cardiac-specific TNNI-3 was also absent from engineered myotube cultures, as assessed by Western blot (Fig. 3F).

FIG. 6. Characterization of cytosolic Ca^{2+} transients elicited by challenging myotubes with various stimuli. Cells were loaded with the calcium probe Fura-2 AM and were subsequently perfused with various saline solutions containing different stimulating compounds. **(A)** The time course of a cytosolic calcium transient is shown as a sequence of photograms taken from the time points shown in the kinetic trace in the middle panel. **(B)** Cytosolic Ca^{2+} transients elicited by acetylcholine (ACh), nicotine (Nic), histamine, and caffeine (Caf) sequentially applied to a perfused example beating myotube. **(D)** Example cell that only responded to histamine. **(C and E)** Bar diagrams showing statistically significant differences between the various stimuli. This pattern of stimuli could be used to differentiate between muscle and other types of responsive cells. **(F)** Nifedipine (Nif) present before and during the second stimulus, did not affect the $[Ca^{2+}]_c$ transient elicited by ACh. **(G)** In contrast, the neuromuscular alkaloid blocker d-tubocurarine (dTC) was able to mitigate the Ca^{2+} entry elicited by nicotinic receptor stimulation with ACh. Data in panels **C**, **E**, **F**, and **G** are shown as mean \pm SEM of the number of cells (n) from different cultures (N), shown in parentheses. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, with respect to the control pulses of 100 μ M ACh (one-way ANOVA and Dunnett's *post hoc* test). Color images available online at www.liebertpub.com/tec

Ultrastructural analyses were then performed by transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 4). Semithin (1.5- μm) sections of resin-embedded tissue constructs showed cells of either spherical or elongated morphology (Fig. 4A). Spherical cells typically were found with irregularly shaped

multiple nuclei that were centrally positioned and abundant organelles scattered through the cytoplasm, with frequent detection of small vacuoles. Some of the spherical cells had a smaller size, irregular cell shape, scarce cytoplasm, and very dense nuclei (not shown). In contrast, elongated cells (Fig.



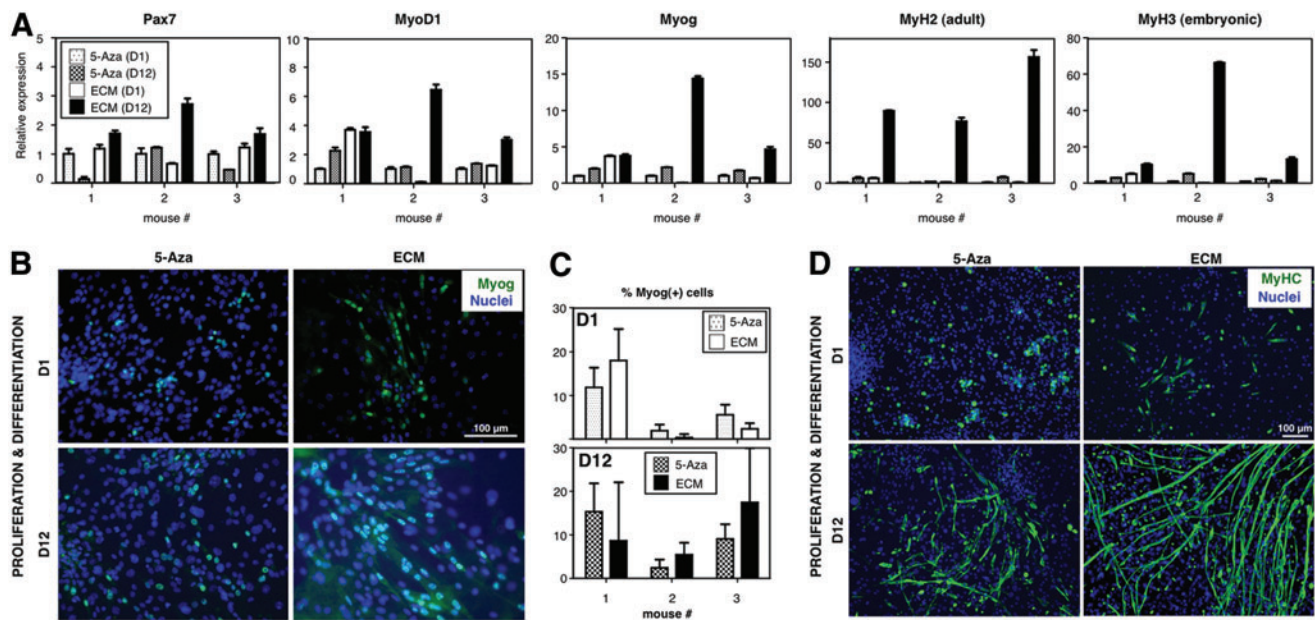


FIG. 7. ECM-based differentiation cultures show enhanced myogenicity. In parallel differentiation cultures run for 12 days, ECM-based cultures were compared to 5-azacytidine-based counterparts.¹⁶ (A) RT-qPCR analyses were performed for *Pax7*, *MyoD1*, *Myog*, *MyH2*, and *MyH3* mRNAs. (B–D) Immunofluorescence analyses were performed for myogenin (B, C) and MyHC (D). Scale bars, 100 μm . Color images available online at www.liebertpub.com/tec

4B) were tubular as clearly visualized on transversal sections (Fig. 4C). Elongated (tubular) cells presented no expansions in contrast to spherical cells. Tubular cells showed a number of centrally positioned nuclei, each having several nucleoli. Interestingly, some elongated cells showed striation of dense and light bands (Fig. 4B). By TEM, the classical actomyosin structures characteristic of striated muscle were clearly visible (A- and I-bands; H zone and Z-line in the sarcomeres; Fig. 4D, E). Repeated measurements showed that sarcomeres were 1.5–3.3 μm long, A-bands 1–2 μm , and I-bands 0.5–1.3 μm . Overall, actomyosin fibers were 0.3–0.6 μm thick. Prolonged mitochondria running parallel to the fibers were often visible; some of them were branched, with abundant crests (Fig. 4D, E), and were also aligned to smooth endoplasmic reticulum (SER). Besides, SER cisternae surrounded actin and myosin bundles in transversal sections (Fig. 4F), as well as transversally oriented mitochondria. Golgi bodies scattered throughout the cytoplasm were also found. Unstriated fusiform cells, which presented abundant dilated rough endoplasmic reticulum (RER) cisternae, were identified as possible fibroblasts. In contrast, striated muscular cells presented scarce, generally undilated RER. Muscle fibers showed no branching and occasionally adherens junctions were seen between adjacent cells (Fig. 4G). Abundant caveolae were seen on the cell surface in transversal sections (Fig. 4H). These results unequivocally demonstrate that skeletal (not cardiac) muscle-like myotubes are being engineered *in vitro* that fully recapitulate ultrastructural characteristics of *bona fide* skeletal muscle.

Electrophysiological characterization of *in vitro* engineered myotubes

Once characterized by immunocytochemistry and specific biomarkers, we pursued functional studies to determine the

nature of the cells under study. Electrophysiological experiments were performed by patching dermis-derived myotubes and challenging them with 100 μM ACh pulses of 250 ms duration (Fig. 5). ACh evoked a 2 nA inward current when membrane potential was clamped at -80 mV. After rapid activation kinetics, slow inactivation developed lasting for about 5 s (Fig. 5A). ACh current charge (Q_{ACh}) were carried by Na^+ and Ca^{2+} ions, so its substitution by the same mOsm quantity of N-methyl-D-glucamine resulted in a strong reduction in Q_{ACh} and I_{ACh} peak (Fig. 5B). In current clamp configuration, a twitching myotube fired spontaneous action potentials that were abolished in the presence of the Na^+ channel blocker TTX (Fig. 5C). To further characterize the nature of the receptor implicated in this signal, we tested the neuromuscular blocker d-tubocurarine in our preparation. At 10 μM , this drug reversibly blocked I_{ACh} and Q_{ACh} by 90% approximately (Fig. 5D).

Muscle contraction is a Ca^{2+} -dependent process, which in turn depends on cell depolarization and Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) from the sarcoplasmic reticulum.³⁰ So, we wanted to look at cytosolic Ca^{2+} signaling ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) mediated by ACh receptor stimulation (Fig. 6). Cells were incubated for 1 h with Fura-2AM. Under fluorescence recording, cells stimulated with ACh increased their $[\text{Ca}^{2+}]_c$ as shown in Figure 6A and Supplementary Movie SM4. Each photograph is taken at different time points after application of the 100 μM ACh pulse. These cells were tested against other stimuli, namely, nicotine, caffeine, and histamine. Twitching cells responded to 30 μM nicotine, 20 mM caffeine, but not to 100 μM histamine (Fig. 6B, C and Supplementary Table S1). However, another cell population with different morphology (not myotubes), also present in dermis-derived muscle cultures, had the opposite response pattern increasing their $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in response to histamine, but not to caffeine or nicotine (Fig. 6D, E and Supplementary Table S1). At this time

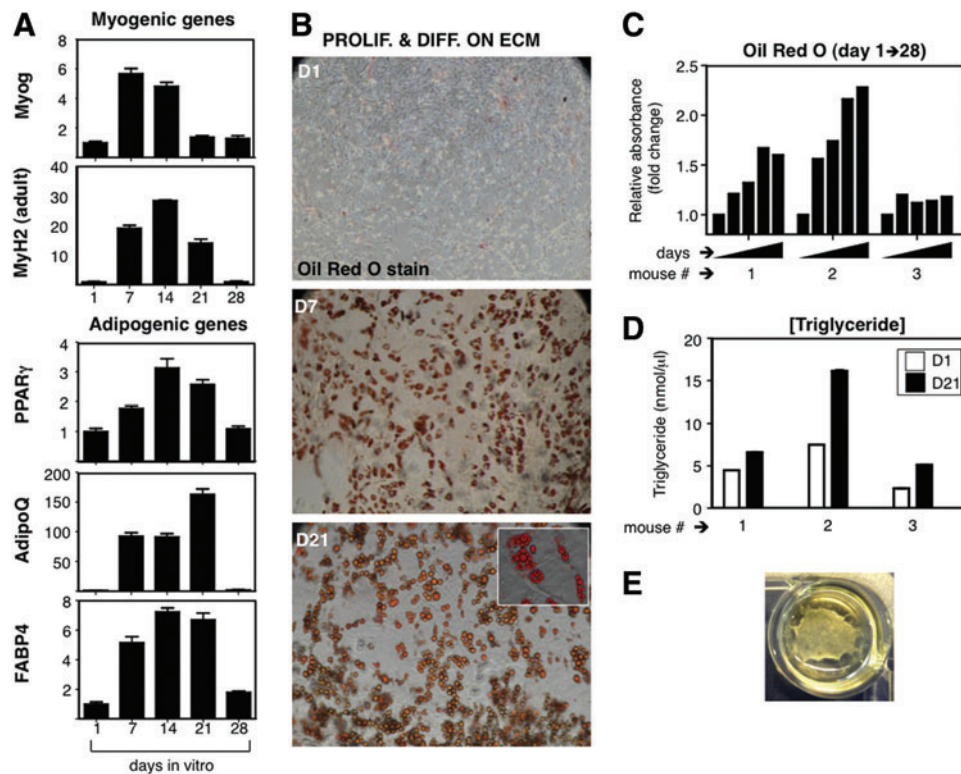


FIG. 8. Long-term progression of myotube cultures shows fatty infiltration. **(A)** Gene expression analyses by RT-qPCR revealed an early expression of myogenic mRNAs (*Myog* and *MyH2*; peaking at 7–14 days), followed by a clear decrease after 20 days of differentiation. Concomitantly, an increased expression of adipogenic genes *PPAR γ* , *AdipoQ*, and *FABP4* was detected peaking at day 14–21. **(B, C)** A progressive differentiation of adipocytes was visible by Oil Red O staining **(B, $\times 100$)**, peaking after 21 days in culture **(C)**. **(D)** The triglyceride content confirmed these data. **(E)** The aged appearance of engineered skeletal muscle after 1 month in culture is shown. Note that the ECM is progressively peeling off the edges of the culture plate due to the force generated during the contractions of myotubes. The abundance of adipocytes makes the aged culture turn yellow. Color images available online at www.liebertpub.com/tec

point, the question of whether the observed $[Ca^{2+}]_c$ increase was a dihydropyridine-dependent effect arose. So, we measured ACh-mediated $[Ca^{2+}]_c$ in the presence of $3 \mu M$ nifedipine and congruently found that calcium peak amplitudes were unaffected by nifedipine incubation (Fig. 6F and Supplementary Table S2). In contrast, $10 \mu M$ d-tubocurarine significantly blocked the ACh-induced $[Ca^{2+}]_c$ increase (Fig. 6G and Supplementary Table S3). These results demonstrated that beating myotubes exhibited characteristics compatible with a skeletal muscle fiber nature, namely, (1) d-tubocurarine-sensitive and Na^+ -dependent inward currents generated by the muscle end plate physiological neurotransmitter ACh, (2) ACh-elicited cytosolic Ca^{2+} transients that are also blocked by d-tubocurarine, and (3) caffeine-elicited $[Ca^{2+}]_c$ transients compatible with sarcoplasmic reticular Ca^{2+} release mediated by RyR1 receptors.

Myogenicity of ECM-based cultures as compared to previous differentiation protocols

Although several reports have addressed myogenicity of dermal cells, quantitative data are often lacking. Due to the impressive, widespread contractility observed on ECM-based cultures, we were interested in performing a quantitative comparison with previously published differentiation protocols. To this end, we chose the protocol based on the

use of 5-azacytidine as an inducer of myogenic differentiation.¹⁶ Parallel differentiation cultures were set up and direct comparison was performed by RT-qPCR and immunofluorescence analyses (at day 1 vs. day 12 of differentiation, Figure 7). As expected, mRNAs for *Pax7*, *MyoD1*, *Myog*, *MyH2*, and *MyH3* were clearly overexpressed in ECM-based cultures as compared to 5-azacytidine-based cultures (Fig. 7A). Immunofluorescence analyses demonstrated a major increase in MyHC(+) myotubes when the ECM was used as a substrate, although there was no significant difference on *Myog* levels (Fig. 7B–D). These results pointed to a faster generation of dermis-derived myotubes on the ECM as compared to 5-azacytidine-based cultures.

Long-term evolution of ECM-based cultures

While satellite cell-derived myotubes grown on Matrigel show great resilience *in vitro*,¹⁸ we observed that ECM-based, dermis-derived cultures, which were derived from complex cellular mixtures, degraded over time (Fig. 8). To characterize this phenomenon, we investigated expression of myogenic mRNAs *Myog* and *MyH2* over a 28-day period of differentiation. Interestingly, myogenin peaked at day 7, while adult myosin expression levels reached their highest at day 14, both of them decreasing sharply afterward (Fig. 8A). Of note, muscle degeneration is concomitant with fatty

infiltration *in vivo*, and a PDGFR α + precursor cell population, which resides in muscle, but is distinct from satellite cells, seems to be responsible for this phenomenon.³¹ For these reasons, we checked *PPAR* γ , *AdipoQ*, and *FABP4* adipogenic gene expression during the same time frame. Strikingly, adipogenic genes peaked at day 14 to 21, concomitant with loss of myogenic gene expression (Fig. 8A). Accordingly, adipocytes were visible by Oil Red O staining by day 7, and abundantly so after day 21 (Fig. 8B). Adipocytes matured in culture over time, with increased fusion of cytoplasmic lipid vesicles. Moreover, quantitative analyses of Oil Red O and trygliceride content showed a sustained increase in culture over time (Fig. 8C, D). In summary, these results are consistent with degradation of the muscle constructs *in vitro* (Fig. 8E) that is coincident in time with the appearance of fat tissue.

Discussion

In this study, we improved previously published protocols to engineer the skeletal muscle from dermal precursor cells.^{16,17} Underlying this improvement in muscle quantity and quality (at least *in vitro*), the use of a Matrigel-like platform might have been critical.³² Muscle organoids have been previously derived from primary neonatal rodent myoblasts suspended in a 1:6 solution of Matrigel: Collagen type I.³³ However, several issues remain unresolved.

For a start, the nature and origin of the discrete population of myogenic precursor cells present in primary dermospheres is still unclear. We have shown that *Panniculus carnosus* (PC), a vestigial muscle in mammals that is often neglected by the literature,¹⁷ is present in murine dermal cell preparations. PC muscle derives from Pax7+ cells, as demonstrated when these progenitors were genetically traced both at the E9.5 (multipotent stem cells of the dermomyotome) and E11.5 (cells restricted to the myogenic lineage) developmental stages.³⁴ On the other hand, skeletal muscle regeneration consists of the fusion of myoblasts for *de novo* myotube formation, generated not only by satellite cells, but also by a number of other cell types such as bone marrow-derived mesenchymal stromal cells, muscle side population cells, and pericytes.³⁵ In murine models, PC has been shown to possess a higher regenerative activity than most skeletal muscles, with significantly smaller fiber diameters, increased heterogeneity of the fiber size, and a high percentage of centrally nucleated myofibers in the absence of focal injury. Further, PC myofibers present the highest rate of bone marrow-derived cell incorporation.³⁶ An enticing possibility that requires further investigation is that the myogenic precursors in PC originate in the bone marrow, and that bone marrow-derived cells underlie the phenomena observed when dermospheres were put under myogenic stimulation.

A second question that remains unanswered is the origin of the fatty infiltration that we observed. Adipogenic differentiation is detected in isolated myofibers, suggesting that satellite cells or other progenitors that reside in that same niche contribute to fat formation.³⁷ Furthermore, the existence of fibro/adipogenic progenitors (FAP) *in vivo*, which are perivascular localized and distinct from satellite cells, has been postulated.³¹ It is therefore plausible that such FAPs might also be present in other interstitial tissues such as the dermis, although *PPAR* and *FABP* detection may not directly

reflect the presence of FAPs, but truly relate to fatty infiltration. Since an intact niche is key to the maintenance of the satellite stem cell pool,³⁸ an attractive hypothesis would be that ECM degradation provoked by myotube maturation could alter the balance of the transition from myogenesis to adipogenesis.³⁹ However, experimental evidence for this proposal is currently lacking. In any case, the engineered muscle system presented here represents a major improvement over modeling systems where muscle ageing is mimicked by making use of high passage myoblast cell lines.⁴⁰

The generalized contractile phenotype we observed was highly reminiscent of that described for chicken myogenic cultures grown on Matrigel, in the absence of innervation.¹⁸ In contrast, human myotubes in monolayer culture present sparse spontaneous contractions that may be improved by motor neuron innervation.⁴¹ For this reason, cocultures of spinal cord explants with myofibers have long been performed to achieve functional innervation and contractile behavior.⁴² More recently, neuromuscular junctions have been engineered *in vitro* from human ESC-derived cocultures.^{43,44} Given the fact that the very same ECM/dermal precursor combination we used in this article has been shown to efficiently generate neural progeny,^{20,21} the following question arose: are *in vitro* engineered myotubes innervated by motor neurons present in dermis-derived cultures? The most plausible answer is no, since no neurons were present in the original dermal cell starting culture and myotube contractions are visible very early, only a few days after differentiation starts. On the other hand, we detected nicotinic ACh receptor (nAChR) clusters on myotubes (Supplementary Fig. S2), reminiscent of those seen in neuromuscular junctions; in fact, stimulation of these receptors with ACh generates inward ACh currents and [Ca²⁺]_c signals very similar to those found in control skeletal muscle.³⁰ However, clusters of nAChR are present in extrajunctional areas of tissue-cultured embryonic muscle.⁴⁵ Furthermore, prepatterned nAChR clusters are known to be required for twitching of developing myotubes, through autocrine activation.^{46,47} Alternatively, non-neuronal cells present in the dermis could be the source of ACh in these cultures.⁴⁸

Ideally, the engineered muscle of human (not murine) origin should be employed to test novel therapeutics. It might follow that, since SKPs are also present in human beings, engineered human muscle could also be produced in a similar fashion. Our data suggest that myogenic precursors are present early after isolation, possibly related with the existence of muscle fragments in the original disaggregated cell mixture. These myogenic precursors could thus originate in the PC, a vestigial organ in humans. Although further research is needed to ascertain this point, if muscle-derived progenitors are eventually required for this process, then human skin should be obtained from the limited areas of the body that present this vestigial muscle.⁴⁹ First of all, mouse lineage-tracing experiments should be performed that shed further light on the cell lineage originating dermis-derived muscle. Secondly, if PC-derived myogenic precursors are traced in the murine models, a confirmation of mouse data should be obtained by using human PC-derived cells. This might prove difficult because of limited PC availability in the human body and the necessity to perform full-thickness skin biopsy that reaches up to the fascia. A promising approach might be isolation of stem cells from human cadavers as

recently reported.⁵⁰ Independently of the potential difficulties in extending this model to human cells, we present a robust model, genetically unmodified, that may be of use to model a number of muscular diseases using genetically modified mice as a source of skin cells. Furthermore, the unique ability to model fatty infiltration as seen after natural muscle atrophy should be of great use to test novel pharmacological approaches to age-related fragility.

Acknowledgments

We thank Charles Lawrie for critical reading of the manuscript. We thank investigators for monoclonal antibodies A4.1025 and F1.652 (H.M. Blau), F5D (W.E. Wright), Pax7 (A. Kawakami), RV-C2 and TI1 (S. Schiaffino), which were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242). Research in A.I.'s laboratory and a postdoctoral contract for P.G.-P. was supported by grants from FIS and INNFACTO programs (PI10/02871 and IPT-300000-2010-17, provided by Ministerio de Ciencia e Innovación) and Diputación Foral de Gipuzkoa (OF 53/2011 and OF 98/2012). A.I. was supported by the "Programa I3SNS" (CES09/015) from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and by Osakidetza-Servicio Vasco de Salud (Spain). A.L.M. received research support by the Association Francaise contre les Myopathies (Ref. 12642), the Spanish Ministry of Health (FIS PS09-00660), the Ilundain Foundation, Isabel Gemio Foundation, Diputación Foral de Gipuzkoa (DFG09/001), and SAIOTEK (SAIO12-PE12BN008). A.A. was supported by ISCIII (CA00/01506; Ministerio de Economía y Competitividad) and Instituto Biodonostia. M.G. was supported by FIS (PS09-00660) and by Ilundain foundation. M.M., J.F.P., J.C.F.-M., and A.G.G. were supported by (1) SAF 2010-21795, Ministerio de Economía y Competitividad (Spain); (2) RENEVAS-RETICS-RD06/0026, ISCIII (Spain); and (3) CABICYC, UAM/Bioibérica (Spain). We thank the continued support of Fundación Teófilo Hernando of Madrid (Spain).

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* **93**, 23, 2013.
- Ryall, J.G., Schertzer, J.D., and Lynch, G.S. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology* **9**, 213, 2008.
- Rando, T.A. Recent advances in the pathogenesis and treatment of neuromuscular diseases. *Curr Opin Neurol* **25**, 586, 2012.
- Mercuri, E., Pichiecchio, A., Allsop, J., Messina, S., Pane, M., and Muntoni, F. Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: past, present, and future. *J Magn Reson Imaging* **25**, 433, 2007.
- Vasli, N., and Laporte, J. Impacts of massively parallel sequencing for genetic diagnosis of neuromuscular disorders. *Acta Neuropathol* **125**, 173, 2013.
- Greenberg, S.A., and Walsh, R.J. Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part I: genetic determinants of inherited disease and their laboratory detection. *Muscle Nerve* **31**, 418, 2005.
- Darabi, R., Arpke, R.W., Irion, S., Dimos, J.T., Grskovic, M., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C. Human ES- and iPSC-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell* **10**, 610, 2012.
- Tedesco, F.S., Gerli, M.F., Perani, L., Benedetti, S., Ungaro, F., Cassano, M., Antonini, S., Tagliafico, E., Artusi, V., Longa, E., Tonlorenzi, R., Ragazzi, M., Calderazzi, G., Hoshiya, H., Cappellari, O., Mora, M., Schoser, B., Schneiderat, P., Oshimura, M., Bottinelli, R., Sampaolesi, M., Torrente, Y., Broccoli, V., and Cossu, G. Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Sci Trans Med* **4**, 140ra89, 2012.
- Pontes Soares, C., Midlej, V., de Oliveira, M.E., Benchimol, M., Costa, M.L., and Mermelstein, C. 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. *PLoS one* **7**, e38147, 2012.
- Vandenburgh, H.H., Karlisch, P., and Farr, L. Maintenance of highly contractile tissue-cultured avian skeletal myotubes in collagen gel. *In Vitro Cell Dev Biol* **24**, 166, 1988.
- Stern-Straeter, J., Riedel, F., Bran, G., Hormann, K., and Goessler, U.R. Advances in skeletal muscle tissue engineering. *In vivo* (Athens, Greece) **21**, 435, 2007.
- Klumpp, D., Horch, R.E., Kneser, U., and Beier, J.P. Engineering skeletal muscle tissue—new perspectives *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Mol Med* **14**, 2622, 2010.
- Tedesco, F.S., and Cossu, G. Stem cell therapies for muscle disorders. *Curr Opin Neurol* **25**, 597, 2012.
- Gago, N., Perez-Lopez, V., Sanz-Jaka, J.P., Cormenzana, P., Eizaguirre, I., Bernad, A., and Izeta, A. Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells* (Dayton, Ohio) **27**, 1164, 2009.
- Hunt, D.P., Jahoda, C., and Chandran, S. Multipotent skin-derived precursors: from biology to clinical translation. *Curr Opin Biotechnol* **20**, 522, 2009.
- Qiu, Z., Miao, C., Li, J., Lei, X., Liu, S., Guo, W., Cao, Y., and Duan, E.K. Skeletal myogenic potential of mouse skin-derived precursors. *Stem Cells Dev* **19**, 259, 2010.
- Wakabayashi, M., Ito, Y., Hamazaki, T.S., and Okochi, H. Efficient myogenic differentiation of murine dermal Sca-1 (-) cells via initial aggregation culture. *Tissue Eng Part A* **16**, 3251, 2010.
- Hartley, R.S., and Yablonka-Reuveni, Z. Long-term maintenance of primary myogenic cultures on a reconstituted basement membrane. *In Vitro Cell Dev Biol* **26**, 955, 1990.
- Rosenblatt, J.D., Lunt, A.I., Parry, D.J., and Partridge, T.A. Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev Biol* **31**, 773, 1995.
- Garcia-Parra, P., Cavaliere, F., Maroto, M., Bilbao, L., Obieta, I., Lopez de Munain, A., Alava, J.I., and Izeta, A. Modeling neural differentiation on micropatterned substrates coated with neural matrix components. *Front Cell Neurosci* **6**, 10, 2012.
- Garcia-Parra, P., Maroto, M., Cavaliere, F., Naldaiz-Gastesi, N., Alava, J.I., Garcia, A.G., Lopez de Munain, A., and Izeta, A. A neural extracellular matrix-based method for *in vitro* hippocampal neuron culture and dopaminergic differentiation of neural stem cells. *BMC Neurosci* **14**, 48, 2013.
- Dubowitz, V., and Brooke, M.H. *Muscle Biopsy: A Modern Approach*. London: Saunders, 1973.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego, Calif) **25**, 402, 2001.

24. Anderson, L.V., and Davison, K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am J Pathol* **154**, 1017, 1999.
25. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85, 1981.
26. Horn, R., and Marty, A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* **92**, 145, 1988.
27. Watsky, M.A., and Rae, J.L. Resting voltage measurements of the rabbit corneal endothelium using patch-current clamp techniques. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**, 106, 1991.
28. Smith, S.R., Gawronska-Kozak, B., Janderova, L., Nguyen, T., Murrell, A., Stephens, J.M., and Mynatt, R.L. Agouti expression in human adipose tissue: functional consequences and increased expression in type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 2914, 2003.
29. Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., Osumi, N., Okano, H., and Fukuda, K. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* **170**, 1135, 2005.
30. Endo, M. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* **89**, 1153, 2009.
31. Natarajan, A., Lemos, D.R., and Rossi, F.M.V. Fibro/adipogenic progenitors. A double-edged sword in skeletal muscle regeneration. *Cell Cycle* **9**, 2045, 2010.
32. Kuraitis, D., Giordano, C., Ruel, M., Musaro, A., and Suuronen, E.J. Exploiting extracellular matrix-stem cell interactions: a review of natural materials for therapeutic muscle regeneration. *Biomaterials* **33**, 428, 2012.
33. Shansky, J., Chromiak, J., Del Tatto, M., and Vandenberg, H. A simplified method for tissue engineering skeletal muscle organoids *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol* **33**, 659, 1997.
34. Lepper, C., and Fan, C.M. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis* **48**, 424, 2010.
35. Tedesco, F.S., Dellavalle, A., Diaz-Manera, J., Messina, G., and Cossu, G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* **120**, 11, 2010.
36. Brazelton, T.R., Nystrom, M., and Blau, H.M. Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells. *Dev Biol* **262**, 64, 2003.
37. Shefer, G., and Yablonka-Reuveni, Z. Reflections on lineage potential of skeletal muscle satellite cells: do they sometimes go MAD? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **17**, 13, 2007.
38. Chakkalakal, J.V., Jones, K.M., Basson, M.A., and Brack, A.S. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* **490**, 355, 2012.
39. Boontheekul, T., Hill, E.E., Kong, H.-J., and Mooney, D.J. Regulating myoblast phenotype through controlled gel stiffness and degradation. *Tissue Eng* **13**, 1431, 2007.
40. Sharples, A.P., Player, D.J., Martin, N.R., Mudera, V., Stewart, C.E., and Lewis, M.P. Modelling *in vivo* skeletal muscle ageing *in vitro* using three-dimensional bioengineered constructs. *Aging Cell* **11**, 986, 2012.
41. Delaporte, C., Dautreux, B., and Fardeau, M. Human myotube differentiation *in vitro* in different culture conditions. *Biol Cell* **57**, 17, 1986.
42. Askanas, V., and Engel, W.K. A new program for investigating adult human skeletal muscle grown aneurally in tissue culture. *Neurology* **25**, 58, 1975.
43. Guo, X., Gonzalez, M., Stancescu, M., Vandenberg, H.H., and Hickman, J.J. Neuromuscular junction formation between human stem cell-derived motoneurons and human skeletal muscle in a defined system. *Biomaterials* **32**, 9602, 2011.
44. Umbach, J.A., Adams, K.L., Gundersen, C.B., and Novitch, B.G. Functional neuromuscular junctions formed by embryonic stem cell-derived motor neurons. *PloS one* **7**, e36049, 2012.
45. Fambrough, D.M. Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Physiol Rev* **59**, 165, 1979.
46. Bandi, E., Bernareggi, A., Grandolfo, M., Mozzetta, C., Augusti-Tocco, G., Ruzzier, F., and Lorenzon, P. Autocrine activation of nicotinic acetylcholine receptors contributes to Ca²⁺ spikes in mouse myotubes during myogenesis. *J Physiol* **568**, 171, 2005.
47. Bernareggi, A., Luin, E., Formaggio, E., Fumagalli, G., and Lorenzon, P. Novel role for prepatterned nicotinic acetylcholine receptors during myogenesis. *Muscle Nerve* **46**, 112, 2012.
48. Wessler, I., and Kirkpatrick, C.J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* **154**, 1558, 2008.
49. Greenwood, J.E. Function of the panniculus carnosus—a hypothesis. *Vet Rec* **167**, 760, 2010.
50. Latil, M., Rocheteau, P., Chatre, L., Sanulli, S., Memet, S., Ricchetti, M., Tajbakhsh, S., and Chretien, F. Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nat Commun* **3**, 903, 2012.

Address correspondence to:
 Ander Izeta, BSc, PhD
 Tissue Engineering Laboratory
 Instituto Biodonostia
 Hospital Universitario Donostia
 Paseo Dr. Begiristain s/n
 San Sebastian 20014
 Spain

E-mail: ander.izeta@biodonostia.org

Adolfo López de Munain, MD, PhD
 Neuroscience Area
 Instituto Biodonostia
 Hospital Universitario Donostia
 Paseo Dr. Begiristain s/n
 San Sebastian 20014
 Spain

E-mail: adolfo.lopezdemunainarregui@osakidetza.net

Received: February 28, 2013

Accepted: April 17, 2013

Online Publication Date: June 24, 2013

Supplementary Data

Supplementary Materials and Methods

Immunofluorescence and microscopy

Primary antibodies used were anti-MyoD1 (Dako; used at 1:50 dilution), anti-myogenin (Myog) (F5D; 1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB), anti-myosin heavy chain (MyHC) (A4.1025, all fibers; 1:50; DSHB), anti-troponin T (TnT) (RV-C2; 1:50; DSHB), and anti-SERCA1 (Thermo Scientific; 1:50).

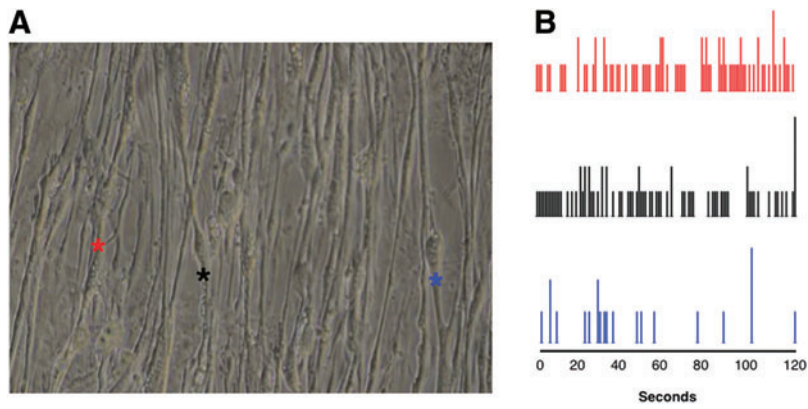
Gene expression

The expression of the following genes was studied: *Pax7* (Mm01354484_m1), *MyoD1* (Mn00440387_m1), *myogenin* (Mm00446194_m1), *MyH2* (Mm01332564_m1), *MyH3* (Mm01332463_m1), *RyR1* (Mm01175211_m1), *RyR2* (Mm00465877_m1), *PPARG* (Mm01184322_m1), *AdipoQ*

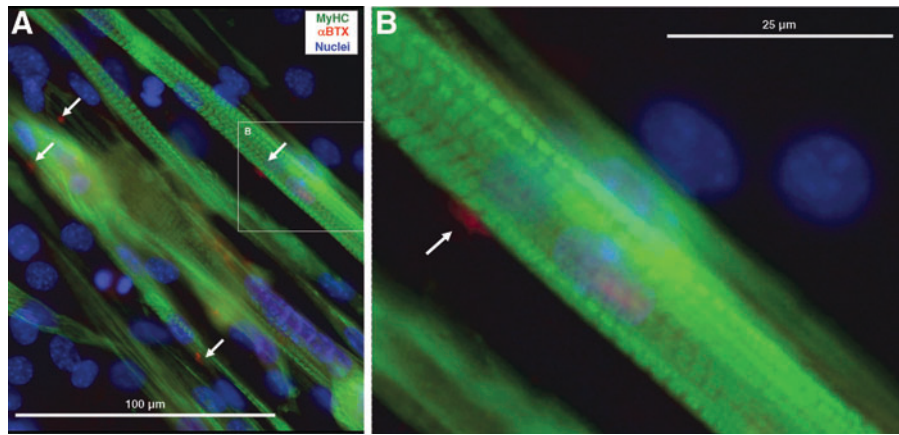
(Mm00456425_m1), and *FABP4* (Mm00445878_m1). As endogenous controls, *GAPDH* (Mm99999915_g1) and *TBP* (Mm00446973_m1) were used.

Western blot

The following primary antibodies were used: anti-Pax7 (DSHB; 1:500), anti-MyoD1 (Dako; 1:1000), anti-Myog (F5D, DSHB; 1:500), anti-MyHC (A4.1025, all fibers; DSHB; 1:1000), anti-embryonic Myosin (F1.652, DSHB; 1:1000), anti-cardiac troponin I type 3 (TNNT3) (TI1, DSHB; 1:1000), and anti-GAPDH (20357, Santa Cruz Biotechnologies; 1:1000). As secondary antibodies, we made use of a polyclonal rabbit horseradish peroxidase (HRP) conjugate anti-mouse IgG (DakoCytomation; 1:20000) or a polyclonal donkey HRP conjugate anti-goat IgG (DakoCytomation; 1:20000).



SUPPLEMENTARY FIG. S1. Example of twitching myotubes with a contractile phenotype independent from each other. **(A)** A photograph extracted from Movie SM3, where the position of three contractile myofibers is marked by red, black, and blue asterisks. **(B)** Representation of a contractile phenotype of twitching myotubes. Detection of contractions over 122 seconds of video recording is represented by upright lines. The length of the lines indicates repeated twitching. Color code (red, black, and blue lines) is used to represent the same myofibers marked by colored asterisks in **(A)**.



SUPPLEMENTARY FIG. S2. Localization of nicotinic acetylcholine receptors in twitching myotubes. Immunofluorescence detection for MyHC (green) and staining for α -Bungarotoxin (α -BTX, conjugated to Texas red; arrows), a toxin that binds specifically to the nicotinic acetylcholine receptors, were performed on differentiated myotubes. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Scale bars, 100 μ m (A), 25 μ m (B).

SUPPLEMENTARY TABLE S1. NUMERICAL VALUES OBSERVED FOR FLUORESCENCE PEAK AMPLITUDE AFTER STIMULATION WITH ACh, NICOTINE, HISTAMINE, AND CAFFEINE

		<i>ACh (100 μM)</i>	<i>Nicotine (30 μM)</i>	<i>Histamine (100 μM)</i>	<i>Caffeine (20 mM)</i>
Peak amplitude (AUF)	Cell type 1	1.0 \pm 0.13	0.86 \pm 0.18	0.19 \pm 0.04	0.69 \pm 0.13
	Cell type 2	0.32 \pm 0.12	0.4 \pm 0.15	1.0 \pm 0.27	0.003 \pm 0.002

AUF, arbitrary units; ACh, acetylcholine.

SUPPLEMENTARY TABLE S2. NUMERICAL VALUES OBSERVED FOR FLUORESCENCE PEAK AMPLITUDE
AFTER STIMULATION WITH ACh AND NIFEDIPINE

	<i>ACh (100 μM; 15-s)</i>	<i>ACh (100 μM; 15-s) Nifedipine (3 μM)</i>	<i>ACh (100 μM; 15-s) Wash-out</i>
Peak amplitude (AUF)	1.0 \pm 0.24	0.96 \pm 0.22	1.0 \pm 0.23

SUPPLEMENTARY TABLE S3. NUMERICAL VALUES
OBSERVED FOR FLUORESCENCE PEAK AMPLITUDE
AFTER STIMULATION WITH ACh
AND TUBOCURARINE

	<i>ACh (100 μM; 30-s)</i>	<i>ACh (100 μM; 15-s) tubocurarine (10 μM)</i>
Peak amplitude (AUF)	1.0 \pm 0.06	0.32 \pm 0.08

SUPPLEMENTARY MOVIE S1. Twitching myotubes show a generalized contractile phenotype. Myotubes showed a contractile phenotype after 5 days' differentiation that was gradually extended to the whole tissue-engineered construct. Recording was performed for 9 s. Magnification: $\times 100$.

SUPPLEMENTARY MOVIE S2. High-magnification view of twitching myotubes. At differentiation day 6, myotubes contract synchronously. Fatty infiltration starts to be visible. Recording was performed for 4 s. Magnification: $\times 400$.

SUPPLEMENTARY MOVIE S3. Occasionally, twitching myotubes show a contractile phenotype independent from each other. Three independently contractile myofibers are visible in this field captured at differentiation day 7, as depicted in Figure S1. Recording was performed for 2 min 2 s. Magnification: $\times 200$.

SUPPLEMENTARY MOVIE S4. Challenge of cytosolic calcium transient in a myotube visualized through detection of Fura-2AM probe levels. At differentiation day 7, cells of a twitching myotube culture were loaded with Fura-2AM probe and a pulse of $100\ \mu\text{M}$ ACh was applied to the culture supernatant. Fura-2 AM was excited alternatively at 340 ± 10 and 387 ± 10 nm and emitted fluorescence was collected through a 540 ± 20 nm emission filter. Fluorescence images were generated at 1-s intervals. Recording was performed for 5 min 12 s. Magnification: $\times 400$.

Identification and Characterization of the Dermal Panniculus Carnosus Muscle Stem Cells

Neia Naldaiz-Gastesi,^{1,2,3} María Goicoechea,^{2,3} Sonia Alonso-Martín,⁴ Ana Aiastui,^{2,3} Macarena López-Mayorga,⁵ Paula García-Belda,^{3,6} Jaione Lacalle,^{1,2,7} Carlos San José,⁸ Marcos J. Araúzo-Bravo,^{9,10} Lidwine Trouilh,^{11,12,13} Véronique Anton-Leberre,^{11,12,13} Diego Herrero,¹⁴ Ander Matheu,^{10,15} Antonio Bernad,¹⁴ José Manuel García-Verdugo,^{3,6} Jaime J. Carvajal,⁵ Frédéric Relaix,⁴ Adolfo Lopez de Munain,^{2,3,16,17} Patricia García-Parra,^{1,2,3,*} and Ander Izeta^{1,18,*}

¹Tissue Engineering Laboratory, Bioengineering Area

²Neuroscience Area

Instituto Biodonostia, San Sebastián 20014, Spain

³CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III, Madrid 28029, Spain

⁴INSERM U955-E10, Université Paris Est, Faculté de Médecine, IMRB U955-E10, Creteil 94000, France

⁵Molecular Embryology Team, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Sevilla 41013, Spain

⁶Laboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, Valencia 46980, Spain

⁷Faculty of Medicine and Nursing, UPV-EHU, San Sebastián 20014, Spain

⁸Animal Facility and Experimental Surgery

⁹Computational Biology and Systems Biomedicine

Instituto Biodonostia, San Sebastián 20014, Spain

¹⁰KERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao 48013, Spain

¹¹INSA, UPS, INP, LISBP, Université de Toulouse, 31077 Toulouse, France

¹²INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, 31400 Toulouse, France

¹³CNRS, UMR5504, 31400 Toulouse, France

¹⁴Immunology and Oncology Department, Spanish National Center for Biotechnology (CNB-CSIC), Madrid 28049, Spain

¹⁵Cellular Oncology Group, Oncology Area, Instituto Biodonostia, San Sebastián 20014, Spain

¹⁶Faculty of Medicine and Nursing, Department of Neurosciences, UPV-EHU, San Sebastián 20014, Spain

¹⁷Department of Neurology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián 20014, Spain

¹⁸Department of Biomedical Engineering, School of Engineering, Tecnun-University of Navarra, San Sebastián 20009, Spain

*Correspondence: pgarcia@nanogune.eu (P.G.-P.), ander.izeta@biodonostia.org (A.I.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.002>

SUMMARY

The dermal *Panniculus carnosus* (PC) muscle is important for wound contraction in lower mammals and represents an interesting model of muscle regeneration due to its high cell turnover. The resident satellite cells (the bona fide muscle stem cells) remain poorly characterized. Here we analyzed PC satellite cells with regard to developmental origin and purported function. Lineage tracing shows that they originate in *Myf5*⁺, *Pax3/Pax7*⁺ cell populations. Skin and muscle wounding increased PC myofiber turnover, with the satellite cell progeny being involved in muscle regeneration but with no detectable contribution to the wound-bed myofibroblasts. Since hematopoietic stem cells fuse to PC myofibers in the absence of injury, we also studied the contribution of bone marrow-derived cells to the PC satellite cell compartment, demonstrating that cells of donor origin are capable of repopulating the PC muscle stem cell niche after irradiation and bone marrow transplantation but may not fully acquire the relevant myogenic commitment.

INTRODUCTION

The dermal *Panniculus carnosus* (PC) muscle sits below the dermal fat layer and on top of the subcutaneous adipose tissue and fascia (Wojciechowicz et al., 2013). It is a fast-twitch muscle of vestigial nature in humans (Novakov et al., 2008), but otherwise ubiquitous in mammals. The PC has generally smaller fibers than other muscles with increased size heterogeneity and higher than usual regenerative myofibers (Brazelton et al., 2003). Being mainly composed of type II fibers, the PC muscle is thought to provide rodent loose skin with twitching and thermoregulation capacities (Greenwood, 2010), as well as promoting contraction (Watts et al., 1958) and supporting revascularization (Hughes and Dann, 1941) of full-thickness excisional wounds. Besides a long-sought clarification of its

functional role, a better understanding of PC in animal models and humans would be instrumental for plastic surgery and subcutaneous drug delivery studies alike (McDonald et al., 2010). However, this unique muscle remains ill characterized. From the stem cell biology viewpoint, specific data on non-limb muscle satellite cells (the bona fide muscle stem cells) are scarce (Randolph and Pavlath, 2015). PC satellite cell biology may be particularly interesting as a model system due to the accessibility, dispensability for survival, and increased regeneration rate of this muscle. In addition, the PC is distinctively positioned to understand the physiological role (if any) of hematopoietic stem cell (HSC) fusion to myofibers and their differentiation after transplantation (Ferrari et al., 1998), a little studied phenomenon that may be related to exposure of fused HSC-derived nuclei to *MyoD*-expressing



myofibers (Dellavalle et al., 2011). In the absence of injury, the rate of bone marrow-derived cell incorporation to PC is highly significant when compared with the physiologically irrelevant rates achieved by other muscle groups (Brazelton et al., 2003; Corbel et al., 2003; Sherwood et al., 2004b). The reasons underlying the increased incorporation of non-resident cells to PC remain unclear but may be related to increased cellular turnover in the PC.

The exact developmental origin of PC satellite cells has yet to be determined. Throughout development of the trunk and limb muscles, there is continuity between fetal muscle “founder” cells and adult satellite cells, as the latter appear to derive from the central dermomyotome of the somite (Gros et al., 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005; Schienda et al., 2006). Specifically, at the embryonic day 10.5 (E10.5) central dermomyotome in mice, $En1^+$ cells generate muscle together with interscapular brown fat bundles and dermis (Atit et al., 2006). These data were confirmed by follow-up of $Pax7^{CE-\beta Gal^+}$ cells traced at E9.5 that labeled the PC (Lepper and Fan, 2011). However, the specific contribution of these early embryonic precursors to the adult PC satellite cell pool remains unknown. In this work, we have analyzed the PC muscle stem cells with regard to developmental origin and purported function, as well as the contribution of bone marrow-derived cells to the PC satellite cell pool after bone marrow transplantation.

RESULTS

Dorsal PC Satellite Cells Belong to the $Myf5^+$ Cell Lineage and Express $Pax3/Pax7$ during Development

The PC muscle sits below dermal adipose tissue in the mouse and is composed of striated fibers, as shown by the expression of $Mrf4$ (alkaline phosphatase [AP])⁺ (Kassar-Duchossoy et al., 2004) and sarcomeric myosin heavy chain (MyHC) (Figures 1A and 1B). The dorsal PC is known to arise from dermomyotomal precursors, but no lineage tracing study has yet addressed the origin of the canonical satellite cells in this muscle. Since a majority of adult muscle satellite cells derive from $Myf5^+$ progenitors (Biresi et al., 2013; Gayraud-Morel et al., 2012; Kuang et al., 2007) and express $Pax3/Pax7$ at later stages, the use of $Myf5$, $Pax3$, and $Pax7$ cell lineage-tracing models may help to dissect the cellular contribution at successive developmental stages (Figure 1C). To determine the developmental origin of PC, we crossed Cre recombinase-expressing transgenic lines with $R26YFP$ and $ROSA^{mTmG}$ reporter mouse strains and pursued in situ localization of reporter-expressing cells by performing immunofluorescence analyses in dorsal skin sections. As expected, PC fibers expressed the fluorescent reporters when cells were

marked by the $Myf5^{Cre^{Sor}}$, $Pax3^{Cre/+}$, and $Pax7^{CreERT2/+}$ lineage-tracing constructs (Figures 1D–1F). By transmission electron microscopy (TEM), we confirmed that PC satellite cells were located below the basal lamina and presented electron-dense nuclei with highly condensed chromatin patches and relatively small and undifferentiated cytoplasm (Figure 1G, asterisk). In situ, PC satellite cells of adult skin express MYF5 but no detectable PAX3, as determined by the expression of surrogate marker nLacZ (nuclear localized LacZ; Figures 1H and 1I). As canonical satellite cells, PC satellite cells are $PAX7^+$ (Figure 1J, higher-magnification image shown in inset 1J') and derive from the $Myf5^+$ lineage (Figure 1K). However, we were concerned with the reportedly widespread expression of $R26YFP$ when crossed with the $Myf5^{tm3(cre)Sor}$ mouse model (Eppig et al., 2015 and data not shown). To clarify tracing of $Myf5^+$ cell lineage, we generated and crossed a Cre-expressing mouse ($B195AP-Cre$) that marked a more restricted subset of $Myf5^+$ cells (Figure S1; more data on this strain are presented below). The more restricted $Myf5$ lineage-tracing strain confirmed detection of $EYFP^+$ cells in a satellite cell position, located between the plasmalemma and the basement membrane of the PC myofibers (Figure 1L). In summary, the lineage-tracing studies shown here confirm that, similar to other trunk muscles, PC satellite cells originate in $Myf5^+$, $Pax3/Pax7^+$ cell populations.

Muscle Cell Turnover Increases in Response to Injury to the PC with No Detectable Contribution of PC Satellite-Derived Cells to the Wound Bed

PC muscle is thought to be particularly regenerative, as determined by fiber morphology and the higher incorporation of bone marrow-derived cells compared with other muscles by cell-fusion events (Brazelton et al., 2003). To help us understand the determinants of PC turnover in homeostasis and response to wounding, we crossed $Pax7^{CreERT2/+}$ mice with the $ROSA^{mTmG}$ reporter line to trace the $Pax7$ -derived lineage by EGFP expression over the short term after tamoxifen (TMX) induction (Figure 2A). Full-thickness skin-punch wounds (that included the epidermis, dermis, dermal fat, and PC layers; Figure 2B) were performed and histological sections of the wounded area analyzed at days 5 and 10 post injury (Figures 2C and 2D). In the negative control (absence of TMX), no EGFP⁺ fiber was detected in the PC (Figures 2E and 2H). After TMX injection but in the absence of injury, $Pax7$ lineage tracing was induced and significant expression of the reporter gene under the control of $Pax7$ was found within fibers, most likely as a result of the incorporation of $Pax7$ -derived (EGFP⁺) cells to PC myofibers (Figures 2F, 2I, 2K, and 2L). In response to wounding, EGFP⁺ myofibers further increased (Figures 2G, 2J, and 2M) indicating that, while the PC seems to be markedly regenerative even under homeostatic

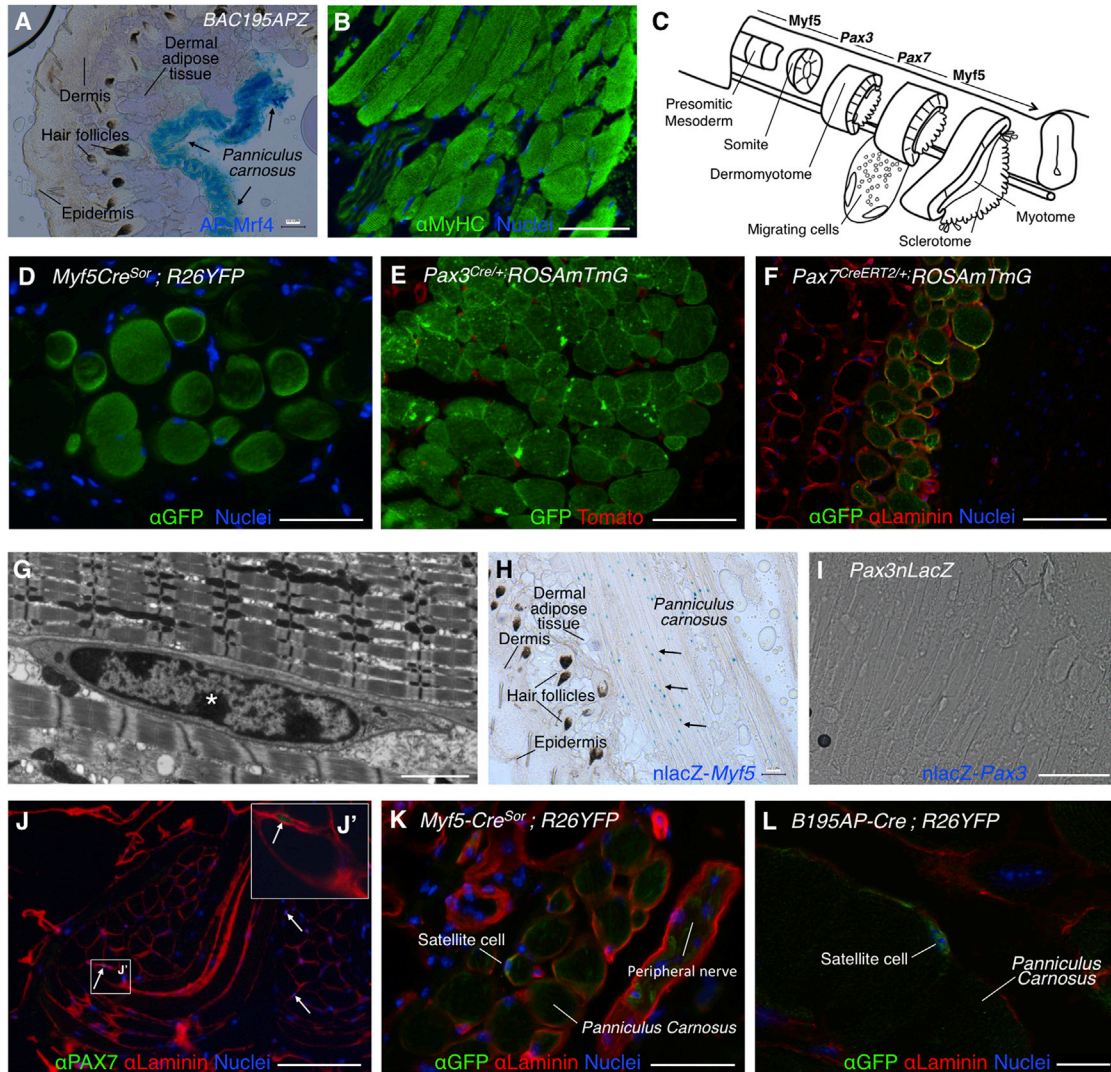


Figure 1. Elucidation of the Developmental Origin of PC Muscle and Satellite Cells

(A and B) Structure and localization of the PC. Histological sections of dorsal skin showing the presence of AP-*Mrf4*⁺ fibers (in *B195APZ* mice) (A) and striated MyHC⁺ fibers (in wild-type mice) (B).

(C) Schematic representation of embryonic muscle development from presomitic mesoderm to myotome formation (modified from Buckingham and Rigby, 2014). Sequential expression of *Myf5* (at the PSM), *Pax3*, *Pax7*, and again *Myf5* (at the somite) transcription factors is depicted at the top.

(D) *Myf5*⁺ lineage traced by immunofluorescence with anti-GFP antibody of *Myf5Cre^{SOR};R26YFP* dorsal skin sections.

(E) *Pax3*⁺ lineage traced by fluorescence of GFP and Tomato in *Pax3^{Cre/+}* dorsal skin sections.

(F) *Pax7*⁺ lineage traced by immunofluorescence with anti-GFP and anti-Laminin antibodies of *Pax7^{CE}* dorsal skin sections.

(G) TEM image of PC satellite cell ultrastructure from ultrathin skin sections. Asterisk indicates condensed chromatin patch.

(H) Histological section of dorsal skin showing the localization of *nlacZ-Myf5*⁺ cells (arrows) (in *B195APZ* mice).

(I) In *Pax3nLacZ* mice, no staining of the PC was observed indicating that PC satellites are *nlacZ-Pax3*-negative cells.

(J) Immunofluorescence with anti-PAX7 antibody demonstrates *Pax7*⁺ cells (arrows) in a satellite cell position underlying Laminin⁺ basement membrane. (J') Higher-magnification inset.

(K) Satellite cell marked by anti-GFP antibody in *Myf5Cre^{SOR};R26YFP* mice.

(L) Satellite cell marked by anti-GFP antibody in *B195AP-Cre;R26YFP* mice. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars represent 100 μm in all panels with the exception of (G) (2 μm) and (L) (10 μm). See also Figure S1.

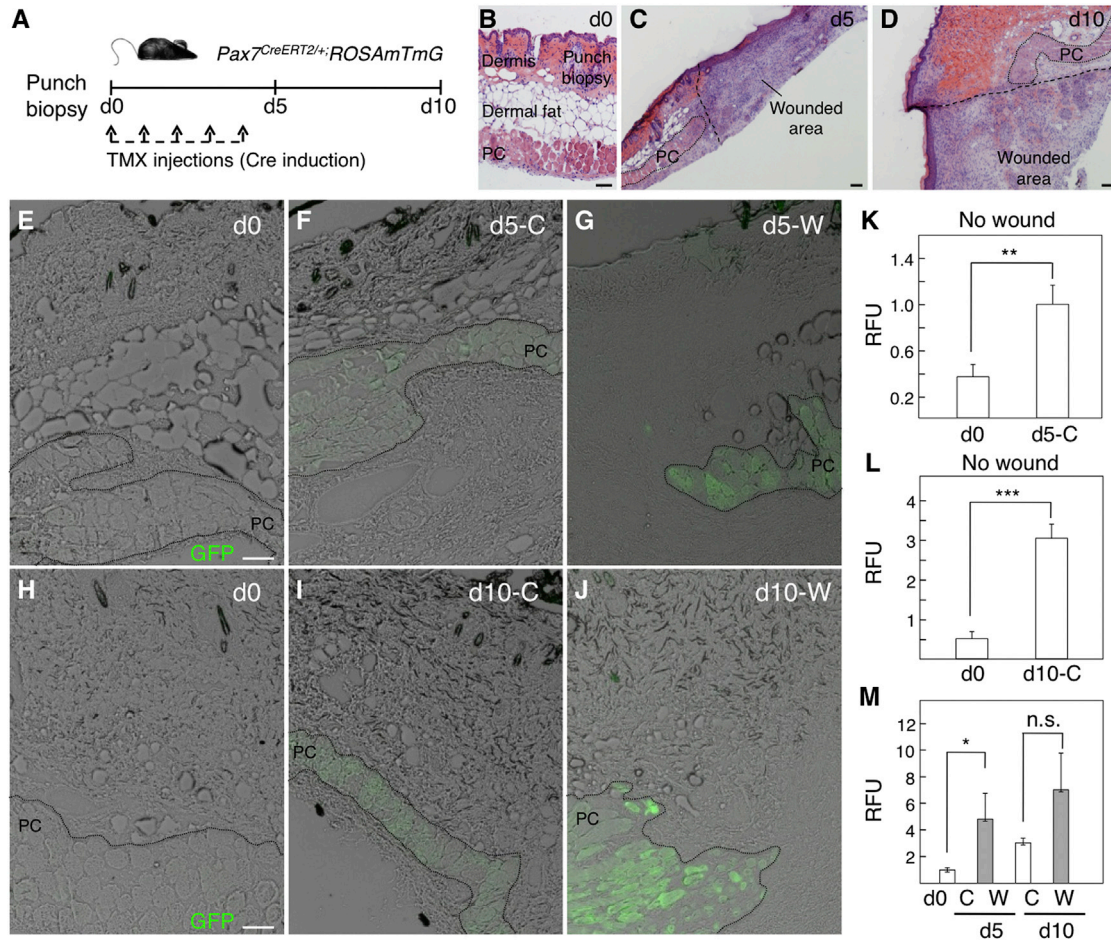


Figure 2. Characterization of the PC Regenerative Capacity in Homeostasis and in Short-Term Response to Wounding

(A) Outline of experimental design.

(B–D) Dorsal skin sections stained with H&E show the punch biopsy at day (d) 0 (B), and the wounded area at day 5 (C) and day 10 (D) post injury.

(E–J) GFP fluorescence in histological sections showing a control (C) area at day 0 (E and H), day 5 (F), and day 10 (I), and showing a wounded (W) area at day 5 (G) and day 10 (J).

(K–M) Quantification of the relative fluorescence units (RFU) present in the PC area. Comparisons between RFU of day 0 and day 5 in a control area (K), between day 0 and day 10 in a control area (L), and between control areas at days 0, 5, and 10 and wounded areas at days 5 and 10 (M) are shown. Bars represent means \pm SD in which the RFU were calculated in ImageJ from one to seven independent sections (N = 3 mice; n = 1 experiment). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; n.s., not significant.

Scale bars, 100 μ m.

conditions, the insult induced a further increase in cell turnover within the PC and the formation of new fibers.

A putative role of activated PC satellite cell progeny in wound contraction has been suggested (Munz et al., 1999), although to our knowledge direct contribution of PC-derived cells to the newly formed granulation tissue has not been experimentally observed. To test whether the PC satellite cell progeny contributes to the wound bed, we induced *Pax7^{CreERT2/+};ROSA^{mTmG}* mice with TMX 1 month in advance to ensure that all PC satellites were traced by *EGFP* expression (Figure 3A), and full-thick-

ness punch biopsies were performed as before (Figures 3B–3D). In this long-term assay, no contribution of PC satellite cell-derived (*EGFP⁺*) cell was evident in the wound bed up to day 10 post injury (Figures 3E–3L). Since regenerative fibers may be distinguished by the expression of embryonic forms of myosin (Schiaffino et al., 2015), staining with anti-MyHC3 antibody (DiMario et al., 1991) confirmed the existence of numerous regenerative myofibers in the PC (Figure S2). These results indicated that PC satellite cells are committed to muscle regeneration upon skin and muscle wounding, and that their progeny does not contribute

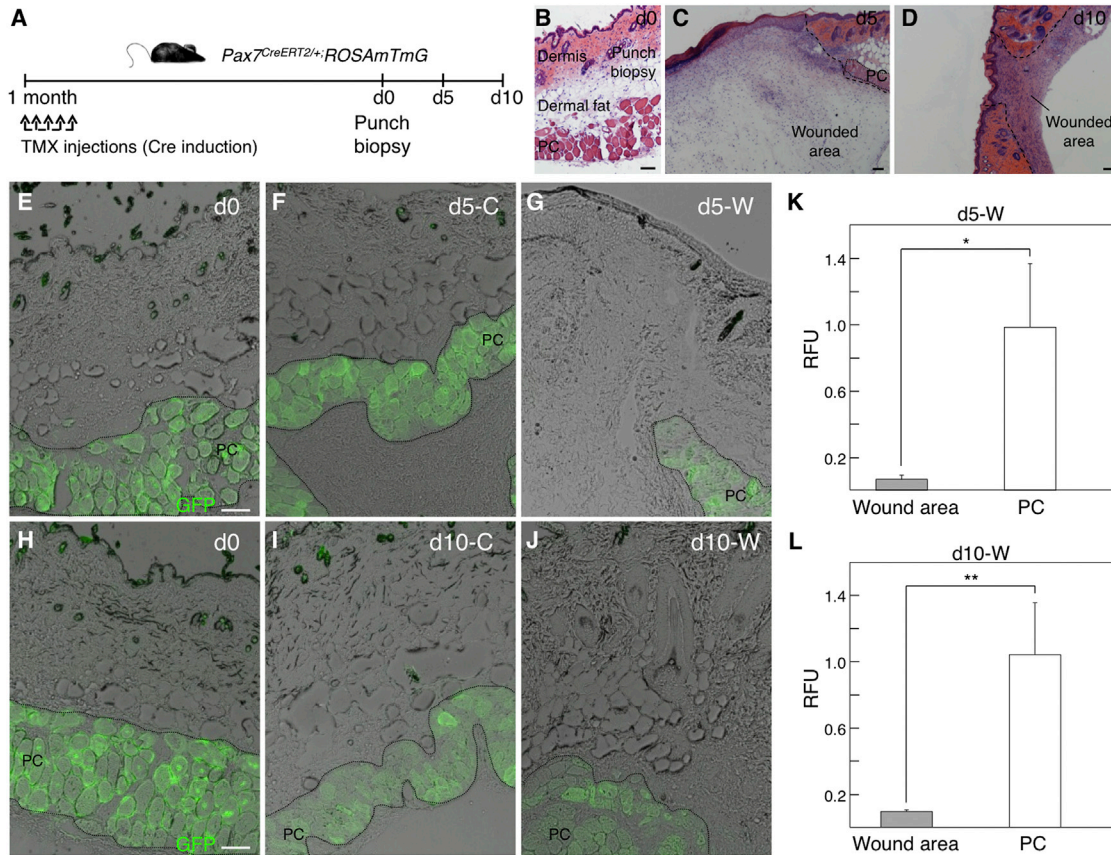


Figure 3. No Detectable In Vivo Contribution of PC-Derived Satellite Cells to the Dermal Compartment in Homeostasis or in Long-Term Response to Wounding

(A) Outline of experimental design. d, day; TMX, tamoxifen.

(B–D) Dorsal skin sections stained with H&E show the punch biopsy at day 0 (B), and the wounded area at day 5 (C) and day 10 (D) post injury.

(E–J) GFP fluorescence in histological sections showing a control (C) area at day 0 (E and H), day 5 (F), and day 10 (I), and showing a wounded (W) area at day 5 (G) and day 10 (J).

(K and L) Quantification of the relative fluorescence units (RFU) present in the PC and wound areas. Comparisons between RFU at PC and wound (W) areas at days 5 (K) and 10 (L) are shown. Bars represent means \pm SD in which the RFU were calculated in ImageJ from two to seven independent sections (N = 3 mice; n = 1 experiment). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Scale bars, 100 μ m. See also [Figure S2](#).

to the wound bed and thus presents no obvious role in promoting full-thickness wound contraction.

Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to the PC Satellite Cell Compartment

An intriguing possibility unresolved by previous studies was that bone marrow-derived cells, which engraft in significant numbers into PC muscle in the absence of injury ([Brazelton et al., 2003](#)), could contribute to the adult PC satellite cell pool. BMI1 is a transcription factor that is expressed in most adult stem cells, including satellite cells of skeletal muscle ([Robson et al., 2011](#)). To analyze whether bone marrow-derived cells contributed to the PC

satellite cell pool, we used recipient *Bmi1-Cre;YFP* mice (i.e., animals expressing YFP in satellite cells) that had been irradiated and successfully transplanted with donor RFP⁺ bone marrow cells from *Act-RFP* mice ([Figure 4A](#); [Valiente-Alandi et al., 2015](#)). As expected, animals transplanted with bone marrow showed a sizable contribution of RFP⁺ cells to the PC myofibers (6.95% positive fibers), which was within the expected range ([Figures 4B and 4C](#); [Brazelton et al., 2003](#)). Importantly, the contribution of donor cells to the satellite cell compartment had not been previously analyzed. We detected cells of donor origin in a satellite position (RFP⁺; [Figure 4D](#)) in the PC muscle of transplant recipients. To shed light on their functional

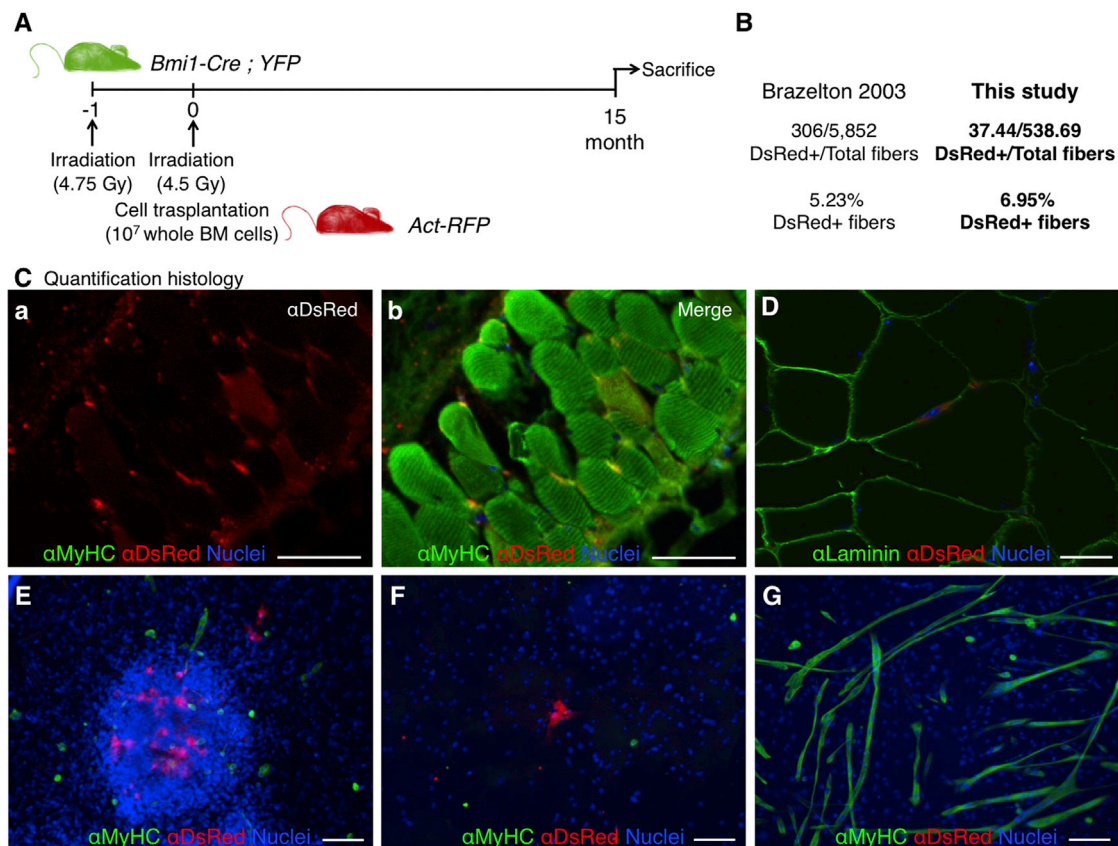


Figure 4. Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to PC Fibers 15 Months after Bone Marrow Transplantation

(A) Outline of experimental design. Mice expressing YFP in *Bmi1*⁺ cell lineage were transplanted with RFP⁺ bone marrow (Valiente-Alandi et al., 2015).
 (B) Quantification of DsRed-positive bone marrow-derived cell incorporation into PC in this study yielded results similar to those of Brazelton et al. (2003), i.e., higher than usual in vivo incorporation.
 (C) Immunofluorescence detection of donor-derived RFP⁺ fibers with anti-DsRed and sarcoplasmic anti-myosin heavy-chain (MyHC, all fibers) antibodies showing the red channel (a) and the merged channels (b).
 (D) Histological sections of dorsal skin showing a DsRed⁺ cell in a satellite cell position below Laminin⁺ basement membrane.
 (E–G) The lack of contribution of bone marrow-derived cells to striated muscle differentiation in vitro was demonstrated by immunofluorescence with anti-DsRed and sarcoplasmic anti-myosin heavy-chain (MyHC, all fibers) antibodies. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue).
 Scale bars, 100 μm.

status, we took advantage of the fact that robust striated muscle derivation (in vitro and in vivo) is obtained from dermis-derived sphere cultures (Garcia-Parra et al., 2014; Qiu et al., 2010; Wakabayashi et al., 2010). In fact, we previously hypothesized that those cultures expanded the PC satellite cells (Garcia-Parra et al., 2014). In vitro culture of dermal sphere cells from the RFP⁺ bone marrow-transplanted mice in myogenic conditions demonstrated no contribution of donor bone marrow cell progeny to the formed myotubes (Figures 4E–4G). These results indicated that cells of donor origin are capable of repopulating the muscle stem cell niche but may not fully acquire the relevant myogenic commitment. However, a better understanding of the process of myotube derivation from dermis-derived cultures was needed to ascertain their apparent loss of functionality.

standing of the process of myotube derivation from dermis-derived cultures was needed to ascertain their apparent loss of functionality.

PC Satellite Cell Progeny Is Enriched in Dermal Precursor Sphere Cultures

Because the identity of the myogenic cell in dermal precursor sphere cultures remains uncertain, we examined dermal spheres at the ultrastructural level by TEM (Figures 5A–5C). At day 7 of proliferation culture, two distinct cell subpopulations were observed: a majority of cells presented vacuoles (Figure 5A, black asterisks) while a second, minor population (10%–15%) did not (Figure 5A, white asterisks).

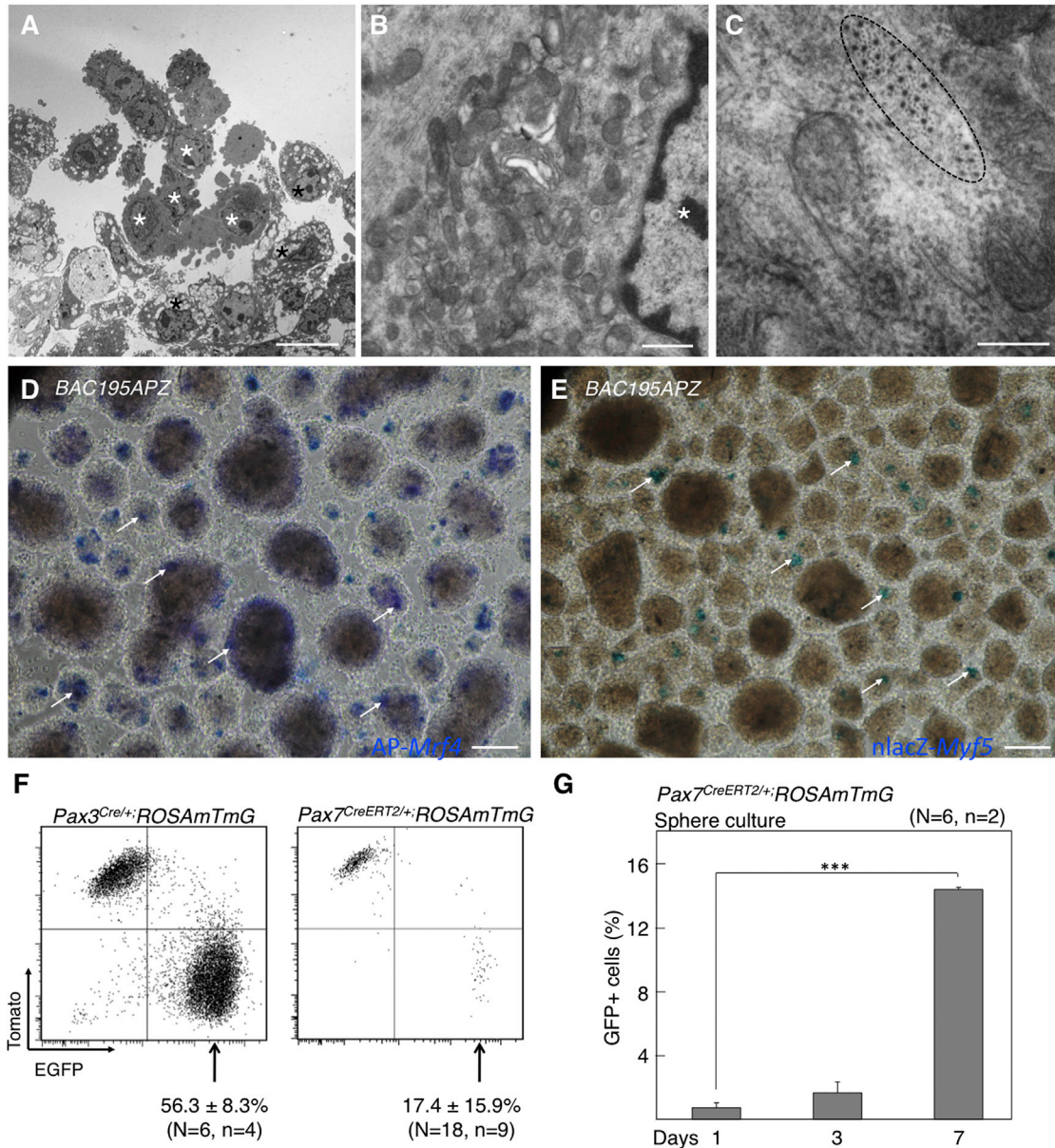


Figure 5. PC Satellite Cell Progeny Is Enriched in Dermal Precursor Sphere Cultures

(A–C) TEM images of dermal spheres. Cells with distinctive morphologies are marked by black and white asterisks. Actomyosin filaments are encircled in (C).

(D and E) Detection of *AP-Mrf4*⁺ (D) and *nlacZ-Myf5*⁺ (E) cells in dermal sphere cultures. Positive cells are marked by arrows.

(F) Flow cytometry analyses of mTomato- and mEGFP-expressing cells from *Pax3^{Cre}* and *Pax7^{CE}* mice. Data represent mean ± SD. The experiments were independently replicated as specified (N, mice; n, experiments).

(G) Percentage of GFP⁺ cells by flow cytometry at 1, 3, and 7 days of dermosphere cultures. Bars represent means ± SD. ***p < 0.001. Scale bars represent 10 mm in (A), 500 nm in (B), 200 nm in (C), and 100 μm in (D) and (E). See also [Figures S3](#) and [S4](#).

Vacuole-rich cells had a phenotype consistent with immature fibroblasts (Figure 5B). In contrast, low-vacuole cells (white asterisks) were more rounded, had less heterochromatic nuclei, and presented abundant perinuclear mitochondria and undilated rough ER, consistent with a

myogenic fate (Mauro, 1961; Nag and Foster, 1981). Accordingly, actomyosin filaments could only be seen in the latter cells (Figure 5C).

To understand their origin and in vitro expansion, we analyzed dermal myogenic precursors in *B195APZ* mice



that express nLacZ and cytoplasmic AP driven by the full *Myf5* and *Mrf4* regulatory regions, respectively (Carvajal et al., 2001). At day 7 of proliferative culture, AP⁺ and β-Gal⁺ cells were detected in dermal spheres (Figures 5D and 5E; arrows). Furthermore, lineage-tracing studies of *Pax3*⁺ and *Pax7*⁺ cells demonstrated their presence in dermal sphere cultures (Figure 5F; but see below with regard to *Pax3*⁺ cells). To test for a possible enrichment of PC satellite-derived cells during sphere culture, we used the inducible *Pax7* mouse model and quantified *Pax7*⁺ cells at different times of sphere proliferation (Figure 5G). There was at least 15-fold enrichment in the proportion of GFP (*Pax7*)⁺ cells in the 7 days of sphere culture, indicating that dermal myogenic precursors have an advantage over other sphere cells in survival and/or proliferation rates. We also looked at the capacity for myotube derivation of PC-derived satellite cells compared with limb muscle (tibialis anterior [TA])-derived cells (Figure S3A). For this comparison, it must be taken into account that the vast amount of non-myogenic cells in dermis-derived cultures dilutes the number of PC satellite cells, which is about 15% at day 7 of proliferation culture (Figure 5G). In contrast, the number of satellite cells in myspheres is much greater (about 70% [Sarig et al., 2006]). Real-time qPCR analysis for mRNA expression of myogenic genes showed a significant (approximately 3-fold) upregulation of myogenic genes in differentiated cultures from TA compared with PC (Figure S3B), which indicates that PC-derived satellite cells have a myogenic capacity similar to that of TA-derived satellite cells. Finally, the contribution of PC satellite cells to myotubes was quantified in differentiation culture. The percentage of mono- and multinucleated cells derived from the *Pax7*⁺ lineage was quantified at days 1, 3, and 7 of differentiation, demonstrating significant incorporation of GFP⁺ cells into the developing myotubes (Figure S3C). In summary, a significant enrichment of PC satellite cell progeny that retained myogenic capacity was detected in dermis-derived sphere cultures.

PC Satellite Cell Progeny Is the Only Cell Population Responsible for Dermis-Derived Myogenesis In Vitro

Dermis-derived sphere cultures are highly heterogeneous (Etxaniz et al., 2014). To confirm the identity of the myogenic progenitor, we placed dermal spheres (unsorted cultures) into striated muscle differentiation conditions (Figure S4). After 7-day unsorted differentiation culture of *BAC195APZ* spheres, all myotubes were *Mrf4*(AP)⁺ (Figure S4A). *Myf5*(β-Gal)⁺ cells appeared as mononucleated myoblasts or juxtaposed to differentiating myotubes (Figure S4B). Lineage tracing of the *Myf5Cre^{Sor}*, *Pax3^{Cre/+}*, *B195AP-Cre*, and *Pax7^{CreERT2/+}* constructs showed in all cases a contribution of these cell lineages to dermis-derived myotubes (Figures S4C–S4F). Importantly, no MyHC⁺ myo-

tubes negative for any of the reporter genes were detected, indicating that they all derived from PC satellite cells.

To study whether perivascularly localized cells present in the dermis or PC muscle also contribute to striated muscle derivation, we traced the perivascular cells by chondroitin sulfate proteoglycan 4 (*Cspg4*, coding for NG2) expression (Figure S4G). This construct traced interstitial cells within the PC muscle (Figure S4Ga) that did not give EYFP⁺ myotubes in unsorted cultures (Figure S4Gb) or after sorting of positive and negative EYFP fractions (Figures S4Gc and S4Gd). To analyze this in a more quantitative manner, mRNA was extracted from fluorescence-activated cell sorting (FACS)-sorted cell fractions and the relative expression of myogenic genes was quantified by qRT-PCR (Figure S4Ge). As expected, the myogenic marker mRNAs were preferentially upregulated in the *Cspg4*⁻ cell fraction, indicating no contribution of perivascular cells to dermal myogenesis.

To confirm the contribution of PC satellite cells to dermal myogenesis, we sorted by FACS the positive and negative cell populations in *Myf5Cre^{Sor}*, *Pax3^{GFP/+}*, *B195AP-Cre*, and *Pax7^{CreERT2/+}* constructs (Figure 6). MyHC⁺ myotubes appeared only in the marker-positive cell fractions (Figures 6A–6C), as confirmed by the relative expression of myogenic genes by qRT-PCR (Figure S5). Of note, *Pax3*⁺ dermal precursor cells are detected as GFP^{low} cells in *Pax3^{GFP/+}* mice (Djian-Zaouche et al., 2012) (Figure 6Da). Dermal GFP⁻, GFP^{low}, and GFP^{high} cell fractions of *Pax3^{GFP/+}* mice were isolated and only the GFP⁻ cell fraction generated myotubes, with no contribution of dermal precursor (GFP^{low}) cells to the myogenic differentiation (Figures 6Db–6Dd). These data suggested that dermal myogenic precursors derive from *Myf5*⁺ *Pax3/Pax7*⁺ satellite cells of the PC. To further substantiate this claim, transcriptomic analyses were performed and, once again, the results suggested that dermal myogenic precursor cells were of muscle origin (Figures S6 and S7 and accompanying description).

Ablation of PC Satellite Cells Abrogates Dermis-Derived Myogenesis In Vitro

The previous results strongly suggested that distinct dermal precursors, possibly PC satellite cells, were responsible for dermis-derived myogenesis. To unambiguously demonstrate the origin of dermal myogenic precursors, we specifically ablated PC satellite cells in vivo through crossing the *Pax7^{CreERT2/+}* construct with *R26R^{GFP-DTA/+}* mice (Ivanova et al., 2005). Upon TMX-mediated *Cre* induction (Figure 6E), diphtheria toxin fragment A (DTA) expression is activated in these mice, resulting in specific ablation of the *Pax7*⁺ cell lineage. As expected, DTA-mediated ablation of the *Pax7*⁺ cells resulted in no MyHC⁺ myotube formation (Figures 6F–6I). Overall, these results demonstrated

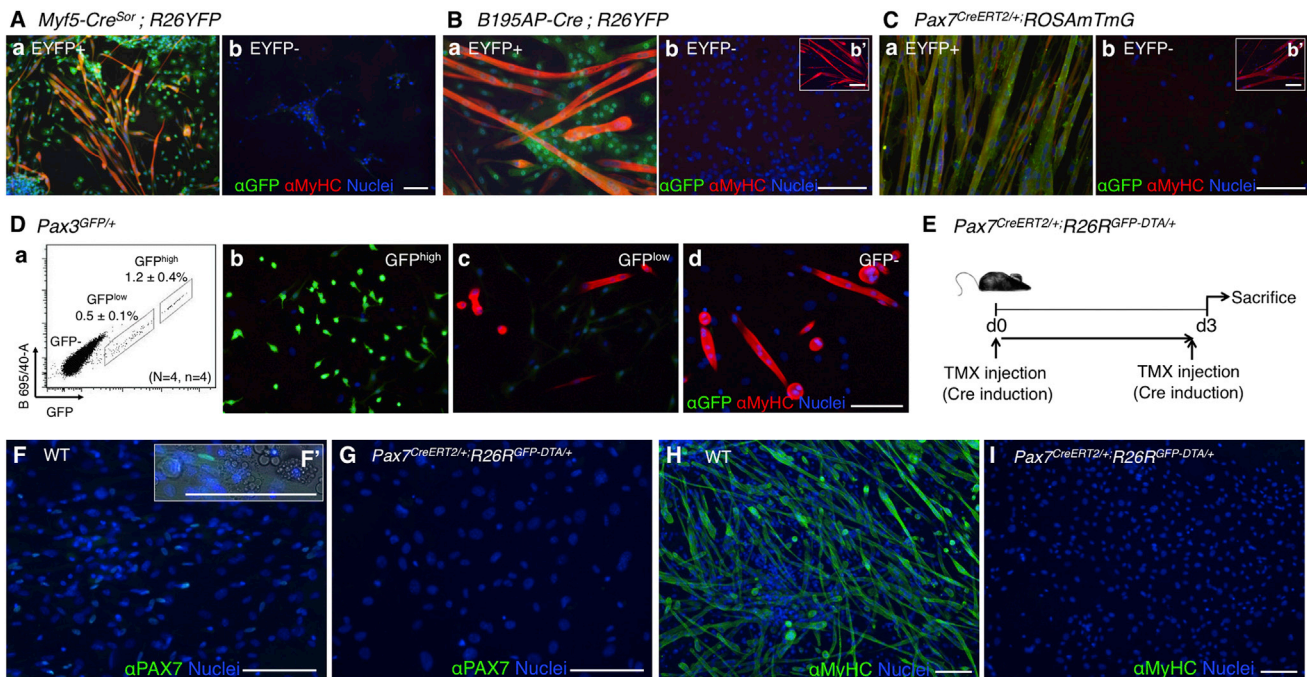


Figure 6. Ablation of Muscle Satellite Cells In Vivo Abrogates In Vitro Dermis-Derived Myotube Formation

(A–C) Contribution of FACS-sorted cell fractions of *Myf5*^{SOR} (A) (EYFP⁺ [a], EYFP[−] [b]), *B195AP* (B) (EYFP⁺ [a], EYFP[−] [b]), and *Pax7*^{CE} (C) (EYFP⁺ [a], EYFP[−] [b]) to striated muscle differentiation was measured by immunofluorescence with anti-GFP (for EYFP expression) and sarcolemmal anti-myosin heavy-chain (MyHC, all fibers) antibodies.

(D) Flow cytometry analysis of dermal spheres in *Pax3*^{GFP/+} mice (a) showed two distinct cell populations according to GFP expression levels. Data represent mean ± SD (N, mice; n, experiments). (b–d) Contribution of FACS-sorted cell fractions (GFP^{high} [b], GFP^{low} [c], and GFP[−] [d]) to striated muscle differentiation was measured by immunofluorescence with anti-GFP and sarcoplasmic anti-myosin heavy-chain (MyHC, all fibers) antibodies.

(E) Outline of experimental design. d, day.

(F–I) Contribution of wild-type (WT) and *Pax7*^{CE-DTA}-derived cells to striated muscle differentiation was measured by immunofluorescence with anti-PAX7 (F and G; higher-magnification inset in F'), and sarcoplasmic anti-myosin heavy-chain (MyHC, all fibers) (H and I) antibodies. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue).

Scale bars, 100 μm. See also [Figures S5–S7](#).

that dermis-derived myogenesis originates from the PC satellite cell population.

In Vivo Contribution of *B195AP*⁺ Cells to Injury-Induced Skeletal Muscle Regeneration

Dermis-derived precursor cells are able to engraft into injured skeletal muscle (both after freeze-crush injury and cardiotoxin [CTX]-induced damage) and survive up to 20 weeks post injection ([Qiu et al., 2010](#); [Wakabayashi et al., 2010](#)). To confirm that *Myf5*⁺ dermal cells were myogenic in vivo ([Figure 7](#)), we injected unsorted dermal cells of the *B195AP-Cre* model crossed with *R26YFP* in the CTX injury model ([Figure 7A](#)). One week after injection, one out of three mice injected with *B195AP*⁺ cells showed 28 ± 3 EYFP⁺ regenerated myofibers, while in the other two no EYFP⁺ fiber was detected ([Figure 7B](#) and data not shown). Most EYFP⁺ cells localized in the interstitial spaces

of skeletal muscle and a minority was positioned underneath the basement membrane, suggesting repopulation of the satellite cell compartment. Therefore, PC satellite cell-derived *B195AP*⁺ cells were able to regenerate injured skeletal muscle and thus might represent the in vivo myogenic cell population that had been previously described in the mouse dermis.

DISCUSSION

An important barrier for the use of satellite cells in regenerative medicine, for instance in the field of muscular dystrophies, is the lack of understanding of how to maintain isolated satellite cells in culture such that they are of therapeutic use ([Aziz et al., 2012](#)). The PC muscle seems to have high regenerative activity ([Brazelton et al., 2003](#)) and is not

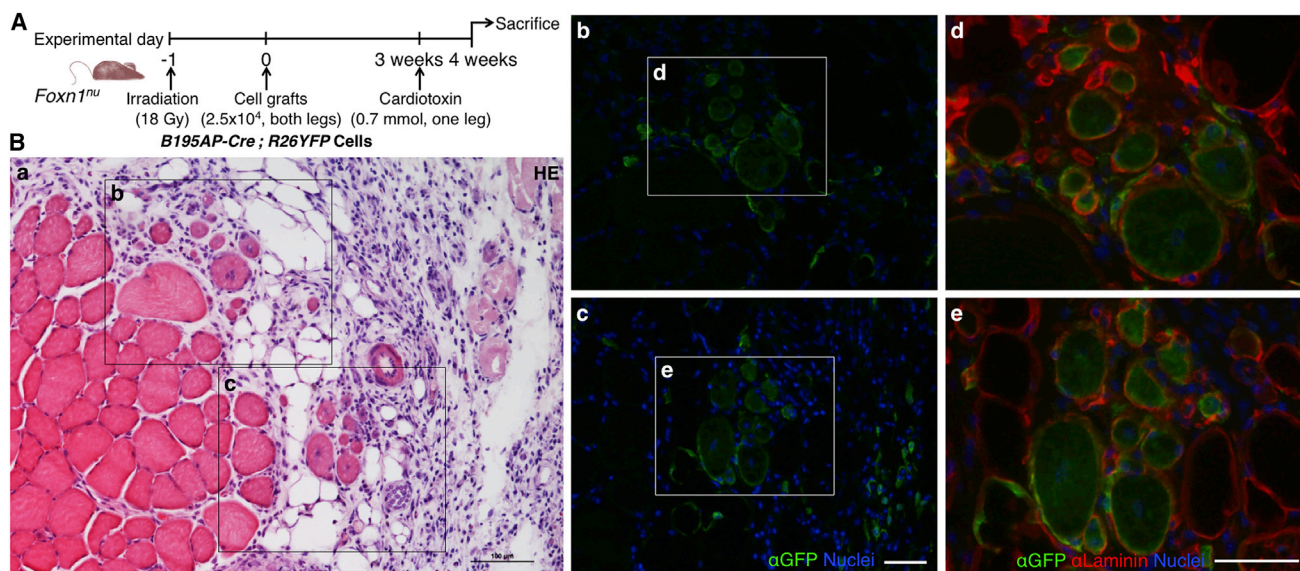


Figure 7. In Vivo Contribution from *B195AP*⁺ Cells to Striated Muscle Regeneration

(A) Outline of experimental design.

(B) Histological analysis of the in vivo regenerative potential of grafted cells. (a) Tibialis anterior muscle section stained with H&E showing the localization of the other panels. (b and c) Regenerative muscle fibers, defined by centrally located nuclei (blue), showed EYFP expression, as detected with anti-GFP antibody (green). (d and e) Higher-magnification pictures of EYFP⁺ myofibers (green) and Laminin (red). Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars, 100 μ m.

only accessible but also dispensable and, as such, can be repeatedly biopsied. For these reasons the PC may be considered as a good muscle for the study of satellite cell biology. In this article we unravel unique aspects of PC muscle biology and describe the origin and role of satellite cells upon skin and muscle wounding.

In response to full-thickness skin wounding, we show an increase in muscle regeneration but no contribution of the *Pax7*-derived cell lineage to the myofibroblasts in the wound bed. This is relevant because a putative role of PC muscle in facilitating the rapid healing (by second intention) observed in rodents has been hypothesized (Greenwood, 2010; Volk and Bohling, 2013). At the wound edge, skNAC, a factor regulating postnatal muscle regeneration (Park et al., 2010), is upregulated in the adjacent PC fibers (Munz et al., 1999), and Tap63⁺ cells appear in both the PC and newly formed granulation tissue (Bamberger et al., 2005). Tap63 has been linked to dermal stem cell function (Su et al., 2009), and contraction of the granulation tissue supports rapid healing (Billingham and Medawar, 1955; Brunius et al., 1968; Watts et al., 1958). Our lineage-tracing data demonstrate no contribution of *Pax7*⁺ lineage-derived cells, i.e., activated satellite cells or components of the regenerated myofibers into the granulation tissue, although we cannot discard the contribution from other cell lineages present in PC muscle. In the TA muscle irradiation/CTX model, which is a

more standardized muscle injury model, we see that the dermis-derived cells are able to regenerate myofibers, as expected for transplanted satellite cells in such a model.

Previous reports had shown an increased contribution of bone marrow-derived cells (possibly HSCs) to PC muscle (Brazelton et al., 2003; Corbel et al., 2003). This incorporation is unique in that it is highly divergent to other muscle groups (Camargo et al., 2003; Ferrari et al., 1998, 2001; Ferrari and Mavilio, 2002; Sherwood et al., 2004a; Sherwood et al., 2004b; Wagers et al., 2002). However, the donor bone marrow cells, even if able to engraft into the PC satellite cell niche, were unable to generate myotubes from dermis-derived sphere cultures. This may be due to several reasons, but it is tempting to speculate that the engrafted cells failed to reach full conversion to the satellite cell fate, as previously shown in other systems (Cossu, 2004; Lapidus et al., 2004). The relevance of circulating HSC fusion into heart and skeletal muscle are unclear, but the phenomenon keeps arising in the literature (Quijada and Sussman, 2015), and occurs also in human muscle (Stromberg et al., 2013). Based on these results we propose the PC as the most appropriate system to further understand the role of mobilized cells that engraft in skeletal muscle, a research area that has been neglected possibly because of the extreme rarity of the fusion events in the muscle groups that are most often analyzed. Determining the identity of the homing factor(s) that facilitate an



increased engraftment of mobilized cells into the PC in comparison with other skeletal muscles might be exploited for therapeutic use (Asakura, 2012). Potential candidates include the SDF-1/CXCR4 axis (Cheng et al., 2015), although it is important to note that as the PC is signaling for mobilized cell engraftment in the absence of injury, the nature of the signal might be different.

Regarding the developmental origin of PC satellite cells, we have shown that this muscle is no different to other trunk muscles in that it originates from *Myf5*⁺, *Pax3*/*Pax7*⁺ progenitors. This will help in respect of comparability with studies performed in satellite cells from other trunk muscles. Finally, for many years it has been known that a small population of dermal cells, of unknown origin, presents myogenic properties (reviewed by White and Grounds, 2003). Our results unequivocally demonstrate that PC satellite cells are the myogenic precursor cells of murine dermis. The present article and other recent data showing that dermis-derived neural stem cells arise from the Schwann cell lineage (Etzaniz et al., 2014; Gresset et al., 2015) urge us to interpret with caution some of the multipotency wrongly attributed to tissue-resident precursors.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mouse Strains

Eight-week-old mice were used in all experiments. Strains used are detailed in Table S1. Animal experimentation was approved by Biodonostia Animal Care Committee (San Sebastian, Spain) in accordance with Spanish Royal Decree 53/2013, European Directive 2010/63/EU and other relevant guidelines.

Pax7^{CE};*ROSAmTmG* Induction by Tamoxifen Injection

Pax7^{CE/+} mice and control (*ROSAmTmG*^{+/-}) littermates were intraperitoneally injected (2.5 μ L/g mouse) with 20 mg/mL TMX (T5648, Sigma-Aldrich) diluted in corn oil (C8267, Sigma-Aldrich) (Dellavalle et al., 2011), for 3 days at postnatal days 14 (P14), P16, and P35, and euthanized at 7–8 weeks.

Skin Punch

Pax7^{CreERT2/+};*ROSAmTmG* and control *ROSAmTmG* adult mice were intraperitoneally injected with 2 mg TMX for five consecutive days, 4 weeks before injury, or during the first five days of muscle regeneration. Following general anesthesia, the mouse's dorsal skin was shaved and cleaned with povidone and alcohol 70% before proceeding with the skin punch. Full-thickness wounds extended to the depth of the superficial fascia (removing the PC) on either side of the midline were made with a dermal biopsy punch (4 mm diameter; Stiefel) (Wang et al., 2013). By holding the skin with forceps the skin was pushed to one side to avoid damage to back muscles, and two holes were punched simultaneously. The recovered skin was frozen as a control for histological or RNA

analysis. The wounds were protected with a sheet of sterile gauze (Tegaderm 4 \times 4 cm) kept until the end of the experiment. Buprenorphine painkiller (Vetergesic 0.3 mg/mL; Soceval) was injected directly after the surgery and again 4–6 hr later, and on the next day. Mice were placed individually in cages allowing free access to food and water ad libitum. After wounding, animals were carefully monitored to avoid infection and suffering. Skins were finally recovered 5 and 10 days after injury. As controls, uninjured skins from the same animals were taken (n = 3 animals per condition).

Isolation, Proliferation, and Striated Muscle Differentiation of Dermal Precursor Cells

Precursor cells were isolated from dorsal back skin and imaged by fluorescence as described by García-Parra et al. (2012). Dermal sphere expansion was performed in proliferation medium (Neurobasal A [Gibco] supplemented with 2% B27 [Gibco], 200 mM 1% L-glutamine [Sigma-Aldrich], and 1% penicillin/streptomycin, supplemented with 2% low serum growth supplement [Gibco], 40 ng/mL epidermal growth factor [R&D Systems], and 80 ng/mL basic fibroblast growth factor [FGF2; R&D]). For differentiation, extracellular matrix-coated glass coverslips were prepared as described by Garcia-Parra et al. (2014). Primary spheres were gently disaggregated with a 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich) and resuspended in proliferation medium without added growth factors plus 10% fetal bovine serum (ATCC), before plating onto coated coverslips at a density of 80,000 cells/cm². Every 2 days, half of the medium was replenished.

Depletion of Dermal Satellite Cells

Pax7^{CreERT2/+};*R26R*^{GFP-DTA/+} and control *R26R*^{GFP-DTA/+} mice were intraperitoneally injected with 10 mg TMX as previously described (Lepper et al., 2011). Forty-eight hours later, dorsal skins were recovered for sphere culture, and TA and soleus muscles frozen for histological and RNA analysis (n = 3 animals per condition).

In Vivo Cell Grafting and Muscle Injury

Primary dermospheres at day 7 of proliferation were gently disaggregated with a 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich) and resuspended in PBS. Muscle damage experiments were done according to Boldrin et al. (2012) and Boldrin et al. (2009). Ten-week-old nude *Foxn1*tm mice were anesthetized and both hind limbs were irradiated with 18 Gy at a dose rate of 300 cGy/min. One day later, mice were anesthetized with isoflurane and received 2.5×10^4 unsorted *Myf5Cre*^{SOR};*R26YFP* (pooled from n = 3 mice) or *B195AP-Cre*;*R26YFP* (n = 3 mice) cells into both TA muscles using a 26-gauge Hamilton syringe. Three weeks after transplantation, right TA muscles of anesthetized host mice were injected with 0.7 mmol cardiotoxin (Sigma, C9759) while PBS was administered to the contralateral muscle. Controls were age-matched mice that were non-irradiated and received PBS. Engrafted muscles were removed 4 weeks after cell injection and processed for histological analysis. Seven-micrometer serial transverse cryosections were cut at intervals of 100 μ m throughout the entire muscles. Sections were stained with H&E and by immunofluorescence staining using antibodies as detailed in Supplemental Experimental Procedures. The mean number of donor origin regenerated myofibers was



calculated by counting the number of EYFP⁺ centrally nucleated fibers in three intervals of 100- μ m serial sections.

Assessment of Statistical Significance

Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism software. A one-way ANOVA with subsequent pairwise multiple comparison procedures (Bonferroni's test) was used to assess statistical significance of the results from qRT-PCR experiments. Student's t test was used to assess statistical significance of the results from *Pax7*(GFP)⁺ cell quantification experiments. Asterisks in figures represent statistical significance of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$.

ACCESSION NUMBERS

Transcriptomic data of dermal cell fractions are deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al., 2002) under accession number GEO: GSE67693.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Results, Supplemental Experimental Procedures, seven figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.002>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.N.G. performed most of the experimental work, with the help of M.G., J.L., and P.G.P. C.S.J. helped perform in vivo cell transplantation experiments. S.A.M. and F.R. were responsible for inducible *Pax7* lineage-tracing experiments. A.A. performed qRT-PCR analyses. J.J.C. generated *B195AP-Cre*-expressing mice and together with M.L.M. characterized this transgenic line. P.G.B. and J.M.G.V. performed ultrastructural analyses. L.T., V.A.L., and M.J.A.B. did the transcriptomics and their corresponding analyses, respectively. D.H. and A.B. performed bone marrow transplantation experiments. A.M. and A.L.M. provided helpful guidance, reagents, and suggestions. N.N.G. and A.I. wrote the manuscript, which was approved by all authors prior to submission. P.G.P. and A.I. directed all experimental work.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank investigators for monoclonal antibodies A4.1025 (H.M. Blau) and F5D (W.E. Wright), which were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA). Special thanks to G. Cossu for critical reading of the manuscript. We are also grateful to F. Costantini, C.-M. Fan, C. Lepper, M.J. Sánchez-Sanz, H. Sakai, and S. Tajbakhsh for kindly providing study materials; S. Lamarre of the GeT-Biochip facility for help in the microarray data; D. Ortiz de Urbina, J.C. Mazabuel, and A. Guisasaola for help with irradiation protocol; and A. Aduriz, A. Pavón, and M. P. López-Mato for help with FACS analyses. This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; PS09/00660, PI13/02172, and PI14/7436), Gobierno Vasco (SAIO12-PE12BN008) from Spain and the European Union (POCTEFA-INTERREG IV A program; REF BIO13/BIOD/006

and REF BIO13/BIOD/009). N.N.G. received a studentship from the Department of Education, University and Research of the Basque Government (PRE2013-1-1168). P.G.P. received fellowships from the Department of Health of the Basque government (2013011016), EMBO (Short-Term; ASTF 542–2013), and Boehringer Ingelheim Fonds. M.L.M. and J.J.C. were supported by a Marie Curie Career Integration Grant from the European Commission (PEOPLE-CIG/1590). A.I. was supported by the Programa I3SNS (CES09/015) from ISCIII and by Osakidetza-Servicio Vasco de Salud (Spain). M.G. and S.A.M. contributed equally to this work.

Received: April 7, 2015

Revised: August 1, 2016

Accepted: August 1, 2016

Published: September 1, 2016

REFERENCES

- Asakura, A. (2012). Skeletal muscle-derived hematopoietic stem cells: muscular dystrophy therapy by bone marrow transplantation. *J. Stem Cell Res Ther. (Suppl 11)*, 005.
- Atit, R., Sgaier, S.K., Mohamed, O.A., Taketo, M.M., Dufort, D., Joyner, A.L., Niswander, L., and Conlon, R.A. (2006). Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev. Biol.* 296, 164–176.
- Aziz, A., Sebastian, S., and Dilworth, F.J. (2012). The origin and fate of muscle satellite cells. *Stem Cell Rev.* 8, 609–622.
- Bamberger, C., Hafner, A., Schmale, H., and Werner, S. (2005). Expression of different p63 variants in healing skin wounds suggests a role of p63 in reepithelialization and muscle repair. *Wound Repair Regen.* 13, 41–50.
- Billingham, R.E., and Medawar, P.B. (1955). Contracture and intussusceptive growth in the healing of extensive wounds in mammalian skin. *J. Anat.* 89, 114–123.
- Biressi, S., Bjornson, C.R., Carlig, P.M., Nishijo, K., Keller, C., and Rando, T.A. (2013). Myf5 expression during fetal myogenesis defines the developmental progenitors of adult satellite cells. *Dev. Biol.* 379, 195–207.
- Boldrin, L., Zammit, P.S., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2009). Mature adult dystrophic mouse muscle environment does not impede efficient engrafted satellite cell regeneration and self-renewal. *Stem Cells* 27, 2478–2487.
- Boldrin, L., Neal, A., Zammit, P.S., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2012). Donor satellite cell engraftment is significantly augmented when the host niche is preserved and endogenous satellite cells are incapacitated. *Stem Cells* 30, 1971–1984.
- Brazelton, R., Nystrom, M., and Blau, H. (2003). Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells. *Dev. Biol.* 262, 64–74.
- Brunius, U., Zederfeldt, B., and Ahren, C. (1968). Healing of skin incisions with intact subcutaneous muscle closed by non-suture technique. A tensiometric and histologic study in the rat. *Acta Chir. Scand.* 134, 187–193.
- Buckingham, M., and Rigby, P.W.J. (2014). Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev. Cell* 28, 225–238.



- Camargo, F.D., Green, R., Capetanaki, Y., Jackson, K.A., and Goodell, M.A. (2003). Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.* *9*, 1520–1527.
- Carvajal, J.J., Cox, D., Summerbell, D., and Rigby, P.W.J. (2001). A BAC transgenic analysis of the *Mrf4/Myf5* locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development. *Development* *186*, 1857–1868.
- Cheng, M., Huang, K., Zhou, J., Yan, D., Tang, Y.L., Zhao, T.C., Miller, R.J., Kishore, R., Losordo, D.W., and Qin, G. (2015). A critical role of Src family kinase in SDF-1/CXCR4-mediated bone marrow progenitor cell recruitment to the ischemic heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* *81*, 49–53.
- Corbel, S.Y., Lee, A., Yi, L., Duenas, J., Brazelton, T.R., Blau, H.M., and Rossi, F.M. (2003). Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat. Med.* *9*, 1528–1532.
- Cossu, G. (2004). Fusion of bone marrow-derived stem cells with striated muscle may not be sufficient to activate muscle genes. *J. Clin. Invest.* *114*, 1540–1543.
- Dellavalle, A., Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, A., Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S., et al. (2011). Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat. Commun.* *2*, 499.
- DiMario, J.X., Uzman, A., and Strohman, R.C. (1991). Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (MDX) mouse skeletal muscle. *Dev. Biol.* *148*, 314–321.
- Djian-Zaouche, J., Campagne, C., Reyes-Gomez, E., Gadin-Czerw, S., Bernex, F., Louise, A., Relaix, F., Buckingham, M., Panthier, J.J., and Aubin-Houzelstein, G. (2012). Pax3(GFP), a new reporter for the melanocyte lineage, highlights novel aspects of PAX3 expression in the skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* *25*, 545–554.
- Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* *30*, 207–210.
- Eppig, J.T., Blake, J.A., Bult, C.J., Kadin, J.A., and Richardson, J.E. (2015). The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Res.* *43*, D726–D736.
- Etzaniz, U., Perez-San Vicente, A., Gago-Lopez, N., Garcia-Dominguez, M., Iribar, H., Aduriz, A., Perez-Lopez, V., Burgoa, I., Irizar, H., Munoz-Culla, M., et al. (2014). Neural-competent cells of adult human dermis belong to the Schwann lineage. *Stem Cell Rep.* *3*, 774–788.
- Ferrari, G., and Mavilio, F. (2002). Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? *Neuromuscul. Disord.* *12 (Suppl 1)*, S7–S10.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* *279*, 1528–1530.
- Ferrari, G., Stornaiuolo, A., and Mavilio, F. (2001). Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature* *411*, 1014–1015.
- García-Parra, P., Cavaliere, F., Maroto, M., Bilbao, L., Obieta, I., López de Munain, A., Alava, J.I., and Izeta, A. (2012). Modeling neural differentiation on micropatterned substrates coated with neural matrix components. *Front. Cell Neurosci.* *6*, 10.
- García-Parra, P., Naldaiz-Gastesi, N., Maroto, M., Padin, J.F., Goicoechea, M., Aiastui, A., Fernandez-Morales, J.C., Garcia-Belda, P., Lacalle, J., Alava, J.I., et al. (2014). Murine muscle engineered from dermal precursors: an in vitro model for skeletal muscle generation, degeneration, and fatty infiltration. *Tissue Eng. Part C Methods* *20*, 28–41.
- Gayraud-Morel, B., Chretien, F., Jory, A., Sambasivan, R., Negroni, E., Flamant, P., Soubigou, G., Coppee, J.Y., Di Santo, J., Cumanò, A., et al. (2012). Myf5 haploinsufficiency reveals distinct cell fate potentials for adult skeletal muscle stem cells. *J. Cell Sci.* *125*, 1738–1749.
- Greenwood, J.E. (2010). Function of the panniculus carnosus—a hypothesis. *Vet. Rec.* *167*, 760.
- Gresset, A., Couplier, F., Gerschenfeld, G., Jourdon, A., Matesic, G., Richard, L., Vallat, J.M., Charnay, P., and Topilko, P. (2015). Boundary caps give rise to neurogenic stem cells and terminal glia in the skin. *Stem Cell Rep.* *5*, 278–290.
- Gros, J., Manceau, M., Thome, V., and Marcelle, C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* *435*, 954–958.
- Hughes, A.F.W., and Dann, L. (1941). Vascular regeneration in experimental wounds and burns. *Br. J. Exp. Pathol.* *22*, 9–14.
- Ivanova, A., Signore, M., Caro, N., Greene, N.D., Copp, A.J., and Martinez-Barbera, J.P. (2005). In vivo genetic ablation by Cre-mediated expression of diphtheria toxin fragment A. *Genesis* *43*, 129–135.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., and Tajbakhsh, S. (2004). *Mrf4* determines skeletal muscle identity in *Myf5:Myod* double-mutant mice. *Nature* *431*, 466–471.
- Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomès, D., and Tajbakhsh, S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* *19*, 1426–1431.
- Kuang, S., Kuroda, K., Grand, F.L., and Rudnicki, M. (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* *129*, 999–1010.
- Lapidos, K.A., Chen, Y.E., Earley, J.U., Heydemann, A., Huber, J.M., Chien, M., Ma, A., and McNally, E.M. (2004). Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* *114*, 1577–1585.
- Lepper, C., and Fan, C.-m. (2011). Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis* *48*, 424–436.
- Lepper, C., Partridge, T.a., and Fan, C.-M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* *138*, 3639–3646.
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *9*, 493–495.
- McDonald, T.A., Zepeda, M.L., Tomlinson, M.J., Bee, W.H., and Ivens, I.A. (2010). Subcutaneous administration of biotherapeutics: current experience in animal models. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *12*, 461–470.



- Munz, B., Wiedmann, M., Lochmuller, H., and Werner, S. (1999). Cloning of novel injury-regulated genes. Implications for an important role of the muscle-specific protein skNAC in muscle repair. *J. Biol. Chem.* *274*, 13305–13310.
- Nag, A.C., and Foster, J.D. (1981). Myogenesis in adult mammalian skeletal muscle in vitro. *J. Anat.* *132*, 1–18.
- Novakov, S.S., Yotova, N.I., Petleshkova, T.D., and Muletarov, S.M. (2008). Sternalis muscle—a riddle that still awaits an answer short communication. *Folia Med.* *50*, 63–66.
- Park, C.Y., Pierce, S.A., von Drehle, M., Ivey, K.N., Morgan, J.A., Blau, H.M., and Srivastava, D. (2010). skNAC, a Smyd1-interacting transcription factor, is involved in cardiac development and skeletal muscle growth and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 20750–20755.
- Qiu, Z., Miao, C., Li, J., Lei, X., Liu, S., Guo, W., Cao, Y., and Duan, E.K. (2010). Skeletal myogenic potential of mouse skin-derived precursors. *Stem Cells Dev.* *19*, 259–268.
- Quijada, P., and Sussman, M.A. (2015). Circulating around the tissue: hematopoietic cell-based fusion versus transdifferentiation. *Circ. Res.* *116*, 563–565.
- Randolph, M.E., and Pavlath, G.K. (2015). A muscle stem cell for every muscle: variability of satellite cell biology among different muscle groups. *Front. Aging Neurosci.* *7*, 190.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* *435*, 948–953.
- Robson, L.G., Di Foggia, V., Radunovic, A., Bird, K., Zhang, X., and Marino, S. (2011). *Bmi1* is expressed in postnatal myogenic satellite cells, controls their maintenance and plays an essential role in repeated muscle regeneration. *PLoS One* *6*, e27116.
- Sarig, R., Baruchi, Z., Fuchs, O., Nudel, U., and Yaffe, D. (2006). Regeneration and transdifferentiation potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. *Stem Cells* *24*, 1769–1778.
- Schiaffino, S., Rossi, A.C., Smerdu, V., Leinwand, L.A., and Reggiani, C. (2015). Developmental myosins: expression patterns and functional significance. *Skeletal Muscle* *5*, 22.
- Schienda, J., Engleka, K.A., Jun, S., Hansen, M.S., Epstein, J.A., Tabin, C.J., Kunkel, L.M., and Kardon, G. (2006). Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 945–950.
- Sherwood, R.I., Christensen, J.L., Conboy, I.M., Conboy, M.J., Rando, T.A., Weissman, I.L., and Wagers, A.J. (2004a). Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell* *119*, 543–554.
- Sherwood, R.I., Christensen, J.L., Weissman, I.L., and Wagers, A.J. (2004b). Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* *22*, 1292–1304.
- Stromberg, A., Jansson, M., Fischer, H., Rullman, E., Hagglund, H., and Gustafsson, T. (2013). Bone marrow derived cells in adult skeletal muscle tissue in humans. *Skeletal Muscle* *3*, 12.
- Su, X., Paris, M., Gi, Y.J., Tsai, K.Y., Cho, M.S., Lin, Y.L., Biernaskie, J.A., Sinha, S., Prives, C., Pevny, L.H., et al. (2009). Tap63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. *Cell Stem Cell* *5*, 64–75.
- Valiente-Alandi, I., Albo-Castellanos, C., Herrero, D., Arza, E., Garcia-Gomez, M., Segovia, J.C., Capecchi, M., and Bernad, A. (2015). Cardiac *Bmi1*(+) cells contribute to myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Res. Ther.* *6*, 205.
- Volk, S.W., and Bohling, M.W. (2013). Comparative wound healing—are the small animal veterinarian’s clinical patients an improved translational model for human wound healing research? *Wound Repair Regen.* *21*, 372–381.
- Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* *297*, 2256–2259.
- Wakabayashi, M., Ito, Y., Hamazaki, T.S., and Okochi, H. (2010). Efficient myogenic differentiation of murine dermal Sca-1 (-) cells via initial aggregation culture. *Tissue Eng.* *16*, 3251–3259.
- Wang, X., Ge, J., Tredget, E.E., and Wu, Y. (2013). The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nat. Protoc.* *8*, 302–309.
- Watts, G.T., Grillo, H.C., and Gross, J. (1958). Studies in wound healing: II. The role of granulation tissue in contraction. *Ann. Surg.* *148*, 153–160.
- White, J.D., and Grounds, M.D. (2003). Harnessing the therapeutic potential of myogenic stem cells. *Cytotechnology* *41*, 153–164.
- Wojciechowicz, K., Gledhill, K., Ambler, C.A., Manning, C.B., and Jahoda, C.A. (2013). Development of the mouse dermal adipose layer occurs independently of subcutaneous adipose tissue and is marked by restricted early expression of FABP4. *PLoS One* *8*, e59811.

Stem Cell Reports, Volume 7

Supplemental Information

Identification and Characterization of the Dermal Panniculus Carnosus

Muscle Stem Cells

Neia Naldaiz-Gastesi, María Goicoechea, Sonia Alonso-Martín, Ana Aiastui, Macarena López-Mayorga, Paula García-Belda, Jaione Lacalle, Carlos San José, Marcos J. Araúzo-Bravo, Lidwine Trouilh, Véronique Anton-Leberre, Diego Herrero, Ander Matheu, Antonio Bernad, José Manuel García-Verdugo, Jaime J. Carvajal, Frédéric Relaix, Adolfo Lopez de Munain, Patricia García-Parra, and Ander Izeta

SUPPLEMENTAL RESULTS

Transcriptomic analyses confirm the myogenic identity of *Myf5*⁺ dermal precursor cells. To understand if myogenic precursors arise during dermal sphere culture or where otherwise present in the original dissociated tissue sample, transcriptomic analyses were performed in *Myf5*^{Sor} positive cell-derived sphere cultures and the appearance of myogenic genes at day 7 of proliferation culture as compared to day 0 was analyzed (Figure S6). A principal component analysis (PCA) of gene expression data of 78 arrays corresponding to 35 cell different populations (as detailed in Table S2) showed that all dermis-derived samples (myogenic and non-myogenic) clustered together with known myogenic samples but also with fibroblasts and adipocytes (Figure S6A). Pairwise comparisons showed that, of the 4,735 genes differentially expressed between these samples, 52 probes (15 genes) were associated with the GO category "Satellite Cell" and 154 probes (63 genes) classified under "Striated Muscle Cell Differentiation". Analyses of these myogenic probes/genes showed that activated satellite/immature myoblast markers such as *Musk* (DeChiara et al., 1996), *Myod1*, *Shh* (Voronova et al., 2013), *Igfbp5* (Sharples et al., 2011) and *Bmp4* (Dahlqvist et al., 2003; Ono et al., 2011) were preferentially expressed at day 0 sphere cultures. In contrast, committed/differentiated myoblast genes such as *Cdh2* (Lovett et al., 2006), *Rara/Rarb* (Halevy and Lerman, 1993), *Myh3*, *Kcnh1* (Rozwadowska et al., 2013; Stern-Straeter et al., 2009) and *Myf6* (Sambasivan et al., 2013) were upregulated at day 7 (Figure S6, B-C). These data suggested that activated PC satellite cells were expanding and differentiating in dermal sphere cultures.

Dermal myogenic fractions branched together and separate from non-myogenic (*Cspg4*⁺) fraction when hierarchical clustering of samples was performed using the correlation metric and the average linkage method (Figure S7A). To further discriminate, differentially expressed genes with a FC>2 in a log2 scale between myogenic and non-myogenic (*Cspg4*⁺) dermal samples were determined. As expected, key myogenic factors such as *Myod1*, *Myf6*, *Ttn* and *Myog* were downregulated in the dermal non-myogenic fraction (*Cspg4*⁺) when compared to the dermal myogenic fractions (Figure S7B). Furthermore, of the 1,476-3,397 genes upregulated when compared to *Cspg4*⁺ dermal cells, the dermal myogenic and other myogenic samples obtained from public databases shared 1,000 genes (Figure S7C). Finally, gene set enrichment analysis (GSEA) of molecular signatures showed two muscle development categories among the significant GSEA-enriched terms (Figure S7D). In all, transcriptomic data are compatible with dermal myogenic precursor cells being of muscle origin.

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

Generation of the new *B195AP-Cre* line. The *B195APZ* BAC construct was modified by recombineering (Swaminathan et al., 2001) with modifications as described previously (Carvajal et al., 2008). BAC clones were transferred into DY380 cells (kindly provided by Neil Copeland, National Cancer Institute-Frederick, Frederick, Maryland), which carry the temperature-inducible lambda-recombinase system. Briefly, 250bp homology arms were generated by PCR and joined to *Cre*. The construct was electroporated into electrocompetent DY380 cells carrying the *B195APZ* construct and used to replace the *nlacZ* gene by the *Cre* gene. Pools of 20-30 clones were screened by PCR and positive pools further diluted to single cells in order to identify correctly targeted clones. Full details on the targeting constructs can be obtained on request. BAC DNA was prepared using the QIAGEN Maxiprep kit (Qiagen) as described previously (Carvajal et al., 2001), dialyzed against BAC microinjection buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 100mM NaCl), diluted to 1.6 ng/ml in BAC microinjection buffer and used to inject day 0 fertilized mouse eggs from CBA/Ca × C57Bl/6 crosses. For the generation of this new line, experimentation was performed according to United Kingdom Home Office Regulations and current Spanish legislation (RD53/2013) on animal experimentation.

Skin histology for immunofluorescence. Murine dorsal skin fragments of approximately 0.5 cm² were excised, and were directly embedded in OCT (Sakura) and frozen in isopentane (Merck) cooled in liquid nitrogen or pre-fixed in fixative solution (Histofix; Histolab) at 4°C overnight. Fixed samples were immersed in 5% sucrose at 4°C for 5 hours and in 30% sucrose at 4°C overnight. The next day, samples were embedded in OCT, and immediately frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen. Seven µm cryostat transverse sections were fixed in cold methanol for 3 min or in 4% paraformaldehyde 10 min, incubated in 0,1% Triton in PBS for 20 minutes, and followed by 10% goat serum for 30 min or with 10% BSA solution 1 hour. Primary antibodies were incubated for 1h at RT or O/N at 4°C, and then incubated with secondary antibodies (see supplementary data) for 1h at RT. The samples were stained with Hoechst, washed 3 times with phosphate buffered saline (PBS) and once with distilled water and with milliQ water, and then mounted with Fluoro-Gel (Electron Microscopy Sciences). The samples were examined under epifluorescence microscope (Eclipse TS100) or Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

Immunofluorescence and microscopy. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; Electron Microscopy Sciences) for 10 min at room temperature (RT) and then they were permeabilized/blocked by using 0.3% Triton X-100 in PBS (PBST) plus 5% normal donkey serum (Sigma-Aldrich) for 1h at RT. Cells were incubated with the appropriate primary antibody diluted in PBST for 2h at RT (as detailed below). After that, cells were incubated for 1h at RT with the appropriate secondary antibody diluted in PBST (detailed in Supplementary data). Prior to mounting in Vectashield (Vector Laboratories), cells were counterstained with 10 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) for 2 min at RT. Fluorescence images were obtained by using a Nikon Eclipse 80i microscope coupled to Nikon Digital Sight and analyzed with Nikon NIS-Elements Advance Research software. Primary antibodies used were anti-myogenin (Myog) (F5D; 1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB), anti-myosin heavy chain (MyHC) (A4.1025, all fibers; 1:50; DSHB), goat anti-GFP (GFP) (ab6673; 1:500; Abcam), chicken anti-GFP (GFP) (ab13970; 1:500; Abcam), anti-DsRed (DsRed) (632496; 1:100; Clontech) and anti-Laminin (L9393, Sigma-Aldrich). Secondary antibodies used were donkey anti-goat Alexa Fluor 488 (A11055; 1:500; Invitrogen), donkey anti-mouse Alexa Fluor 555 (A31570; 1:500; Invitrogen), donkey anti-rabbit Alexa Fluor 555 (A31572; 1:500; Invitrogen), Alexa fluor 594-conjugated goat anti-rabbit (A11012) and goat anti-chicken DyLight® 488 (ab96947; 1:500; Abcam).

Transmission electron microscopy (TEM). After fixation in 3.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences), cell cultures were washed in 0.1 M PBS (pH 7.4) and treated with 2% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences) in 0.1 M PBS (pH 7,4) for 2h at RT. Samples were rinsed, dehydrated through increasing ethanol solutions and stained in 2% uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences) at 70% ethanol. Dehydrated cell cultures were embedded in araldite (Fluka). Semithin sections (1.5µm-thick) were cut with a diamond knife and stained with 1% toluidine blue solution (Sigma-Aldrich), re-embedded for ultrathin (70 nm-thick) sectioning, and examined under a Tecnai-Spirit Electron Transmission Microscope (TEM) coupled to a Morada TEM CCD camera (Soft Imaging System).

β-Galactosidase reporter gene staining and Alkaline Phosphatase reporter gene staining. LacZ staining was performed using the β-Galactosidase Reporter Gene Staining Kit (GALS; Sigma-Aldrich). Skin fragments were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 40 min at 4°C. After

incubation in X-gal solution for 3h at 37°C, samples were washed, dehydrated with increasing sucrose concentration (10-20%) for 3 hours, embedded in OCT and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane (Merck). Sixty cryostat sections were cut, mounted in glycerol and examined under the microscope. Alkaline Phosphatase (AP) reporter gene staining was performed using the Alkaline Phosphatase Blue Membrane Substrate Solution (AB0300-1KT; Sigma-Aldrich). Skin fragments were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS O/N at 4°C, rinsed twice in PBS supplemented with 2 mM MgCl₂ (PBSMg), and washed in PBSMg for 10 minutes. Endogenous phosphatases were inactivated by incubation for 1 hour in PBSMg at 65°C. Samples were washed in ice-cold AP-buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) and AP-buffer, transferred to AP-staining buffer and stained for 40 min in the dark at 4°C. The reaction was stopped by washing the tissue samples in ice-cold PBS in the dark at 4°C for 16 hours, dehydrated with increasing sucrose concentration (10-20%) for 3 hours, embedded in OCT and frozen as above. Sixty cryostat sections were cut, mounted in glycerol and examined under the microscope. For β -Galactosidase staining on whole-mount mouse embryos, these were fixed overnight in Mirsky's fixative (National Diagnostics) at 4°C, washed three times in PBSA (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free phosphate-buffered saline)/0.02% Nonidet P-40 for 20 min at room temperature, placed in 7-10 ml of X-gal solution [5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆ • 3H₂O, 2 mM MgCl₂, 0.02% Nonidet P-40, 0.4 mg/ml X-Gal in PBSA] for 2–6 h (depending on stage) at 37°C, and post-fixed in Mirsky's fixative.

Flow cytometry and cell sorting. Cultured spheres were dissociated with 0.25% Trypsin-EDTA (Sigma) for 5 min at 37°C, PBS-washed, filtered through a 70 μ m cell strainer, counted, and resuspended in PBS without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺, with BSA 0.5%, 25mM HEPES and 5mM EDTA (sorting buffer; pH=7.2). For flow cytometry assays of YFP, data were acquired on a BD FACSCantoA flow cytometer using blue excitation and collecting fluorescent signals on the 530/30 (YFP) band pass filter. Tomato and GFP expression data were acquired on BD FACSAria III cell sorter using blue and yellow-green excitation and collecting fluorescent signals on the 530/30 (GFP) and 610/20 (TdTomato) band pass filters. Data acquisition was done for both assays with FACSDiva Software using control littermate mice to adjust setting parameters. Sample data were analyzed excluding doublets and non-viable cells (To-Pro-3 positive cells), with BD FACS diva software and FlowJo. Data are represented as dot plots showing green fluorescence (EYFP or EGFP) vs. orange fluorescence (autofluorescence).

Syndecan-4-based cell sorting. Cultured dermospheres were pelleted and dissociated with 0.25% Trypsin-EDTA (Sigma) for 5 min at 37°C, PBS-washed, filtered through a 70 µm cell strainer, and counted. Cells were blocked with PBS with BSA 1% and FBS 10% for 10 min at room temperature. The primary antibody, Biotin Rat Anti-Mouse Syndecan-4 (IgG2a) (550351; 1µg/test; BD Biosciences), and isotype, Biotin Rat IgG2a,κ Isotype Control (553928; 1µg/test; BD Biosciences) were added and incubated for 30 min at 4°C. The cells were washed with PBS with BSA 1%, incubated with APC Streptavidin (554067; 0.2mg/ml; BD Biosciences) for 30 min at 4°C, washed again, and re-suspended in PBS without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺, with BSA 0.5%, 25mM HEPES and 5mM EDTA (sorting buffer; pH=7.2) onto 5 ml polypropylene tubes. Auto-fluorescence was adjusted with the *wt* mice. PMT settings were established on live singlets by using unstained cells. Non-specific bindings were evaluated with the corresponding isotypic controls used at the same concentration, same isotype and same fluorophore that the antibody of interest. Sorting experiments were done on a FACSAria III cell sorter (BD Biosciences), at low sheath pressure (20 psi) using 100 µm nozzle. Sorting procedures were done excluding dead cells (with either 7AAD or Sytox Green) and doublets; sorted cells were collected on proliferation medium without serum.

Gene expression. Total RNA was extracted from cells by miRNeasy Mini kit (Qiagen) and converted into complementary DNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis was carried out using Taqman gene expression assays in the 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Each cDNA sample was amplified in triplicates. The cycling conditions were 95°C/10 min followed by 40 cycles at 95°C/15 s, 60°C/1 min in a reaction mixture that contained 1x Taqman Universal PCR Master Mix and 1x Assay Mix in a final volume of 20µl. The relative quantity of the gene targets was determined by the 2^{ΔΔCt} method (Livak and Schmittgen, 2001) using Tbp as a housekeeping control.

Transcriptomic analysis. Total RNA was extracted (DNA-free) from FACS-sorted cells pooled from 8-10 animals per strain, by using miRNeasy Micro Kit (217084, Qiagen). RNAs were controlled using Nanodrop ND-1000 and Bioanalyzer 2100 Expert from Agilent, then 25 ng of RNA was used as input for labeled cRNA synthesis with the Low Input Quick Amp Labeling Kit (5190-2305, Agilent

Technologies) and the One-color microarray-based gene expression protocol, according to manufacturer's instructions. Labeled cRNAs were hybridized to Agilent SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray Kit (G4852A, Agilent Technologies). The slides were scanned on a Tecan scanner MS200 and analyzed by Feature Extraction V.11.5.1.1.

Molecular signature enrichment analysis. The molecular signatures were taken from the gene set collection C5 of the version 3.0 of the Molecular Signatures Database (MSigDB) (Subramanian et al., 2005). The significance of the gene set of the different expressed genes was analyzed using an enrichment approach based on the hypergeometric distribution. The significance (p-value) of the gene set enrichment was calculated using the hypergeometric distribution. The multitest effect influence was corrected through controlling the false discovery rate using the Benjamini-Hochberg correction at a significance level $\alpha=0.05$.

SUPPLEMENTAL FIGURES AND LEGENDS

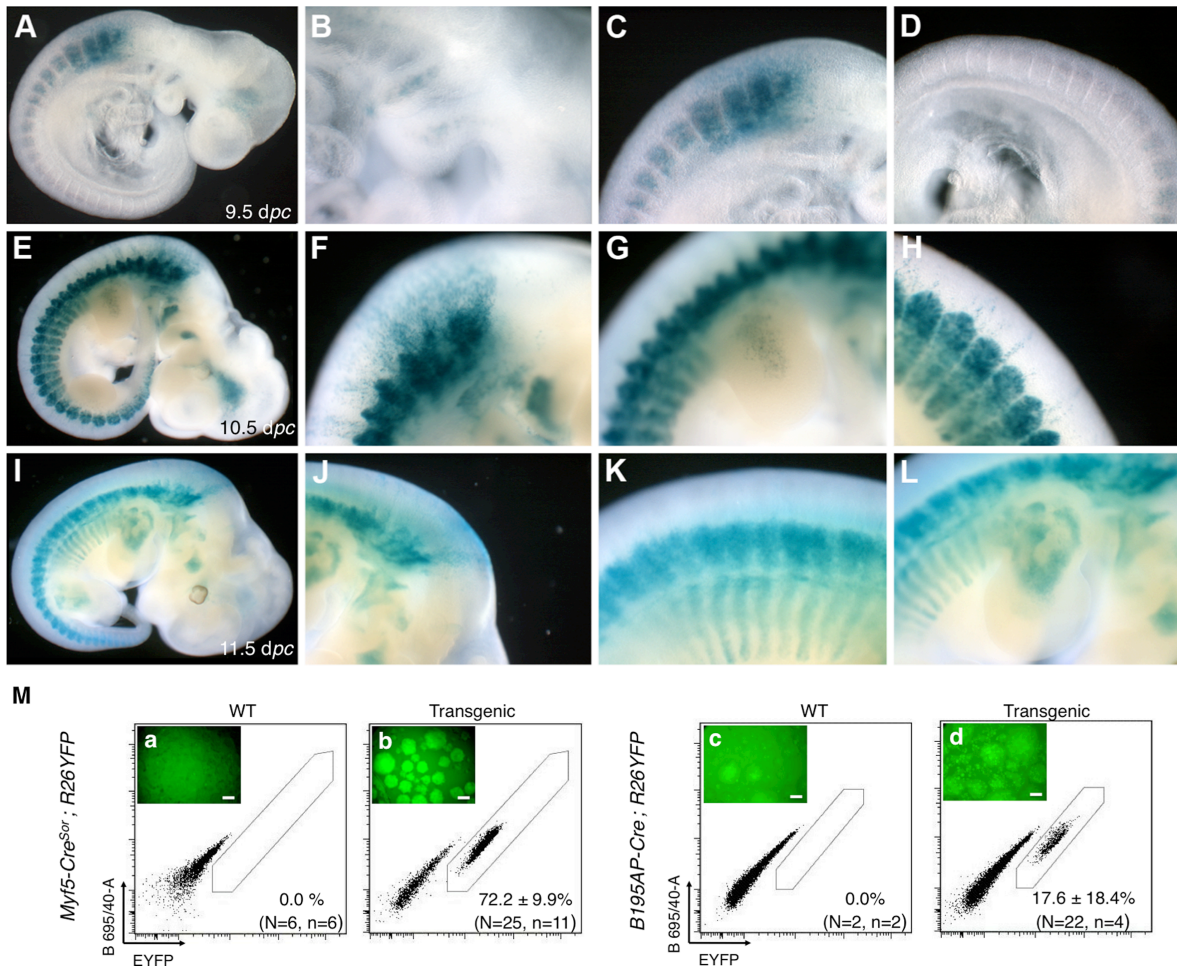


Figure S1. Time course of embryos carrying the *Myf5* reporter construct *B195AP-Cre* crossed with the *R26LACZ* strain, related to Figure 1. Representative mouse embryos (A, E, I) and close-ups from the same embryos (B-D, F-H, J-L) at 9.5dpc (A-D), 10.5dpc (E-H) and 11.5dpc (I-L). (A) β-Galactosidase staining can be detected at the known sites of *Myf5* expression at 9.5dpc, including the (B) mandibular and hyoid arches, (C) cervical somites and (D) the remaining somites with the exception of the 3 or 4 most recently formed; this apparent delay is likely caused by the time required to generate high levels of CRE protein in order to recombine the *R26LACZ* locus. (E) At 10.5dpc *Myf5*⁺ cells can be detected in all muscle progenitor cells known to express *Myf5* at this stage, including all somites, branchial arches, hypoglossal chord and brain. (F) Interestingly, large numbers of *Myf5*⁺ cells appear to migrate dorsally, into non-typical skeletal muscle locations. (G) *Myf5*⁺ cells are also clearly visible in the forelimbs. (H) Migrating cells are not restricted to cervical positions but appear throughout the embryo but at positions always dorsal to the somites; note

that while migration in cervical positions does not follow any apparent pattern, migration at more caudal positions follows straight lines. (I) By 11.5dpc, most *Myf5*⁺ cells are restricted to defined skeletal muscle locations such as the thoracic muscles, fore and hindlimb muscles, mandibular and hyoid arch derivatives. (J, K) Cells continue to migrate dorsal to the somites. (L) Detail of *Myf5*⁺ cells in the forelimb. (M) Comparative analysis of EYFP⁺ cells by fluorescence and quantification by flow cytometry in dermal spheres isolated from *Myf5*^{SOR} and *B195AP* lineage tracing models. Left panels (a, c) show WT animal controls and right panels (b, d) transgenic animals. Insets, fluorescence images of dermal sphere cultures showing EYFP expression restricted to the transgenic animals. (Scale bars, 100 μm). Numbers represent mean±SD. The experiments were independently replicated as specified (N=mice; n=experiments).

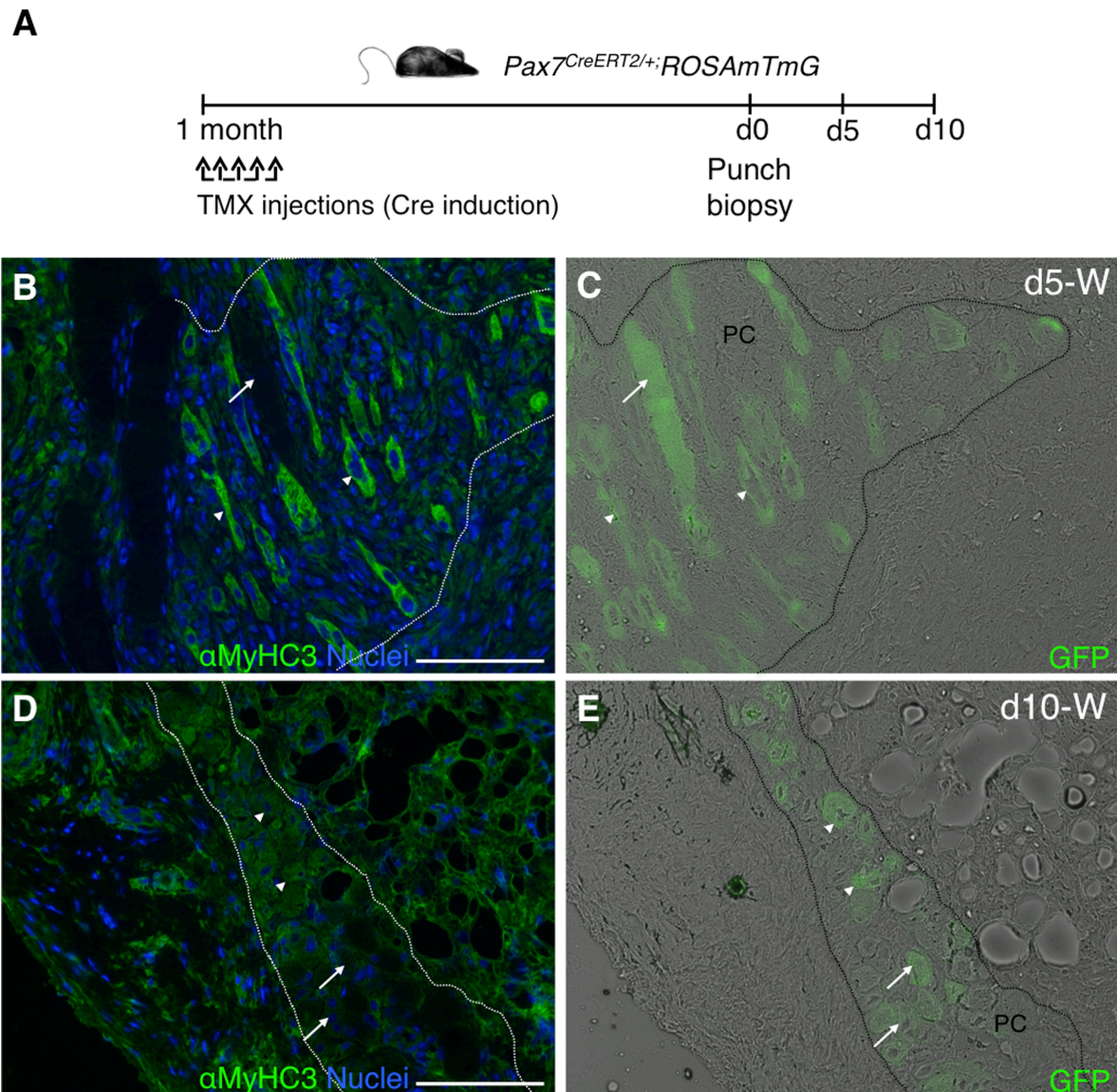


Figure S2. Presence of regenerative fibers in the *Panniculus carnosus* after wounding, related to Figure 3. (A) Outline of experimental design for the long-term induction of *Pax7* expression before punch biopsy is performed. (B-E) Histological sections of injured dorsal skin at day 5 (B-C) and at day 10 (D-E) post-wounding, were analyzed by immunofluorescence with anti-MyHC3 antibody showing regenerative fibers (B, D) and the GFP fluorescence showing *Pax7*-derived fibers (C,E). GFP+ MyHC3- cells are marked by arrows and GFP+ MyHC3+ cells are marked by arrowheads. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars, 100 μ m.

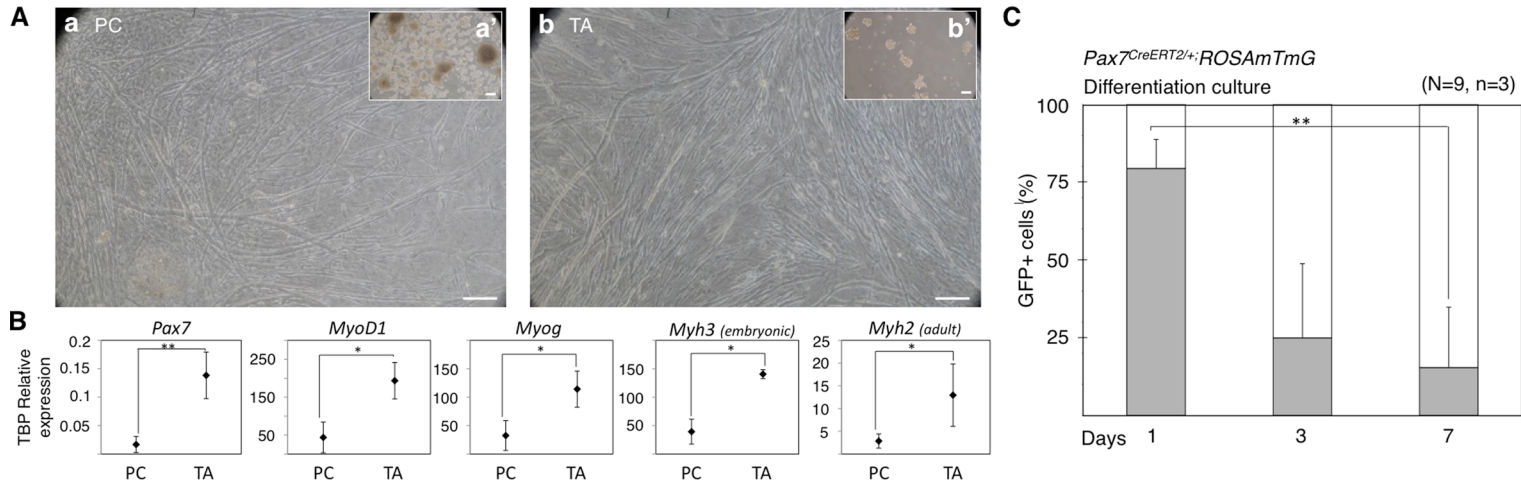


Figure S3. Comparison of limb muscle (TA)-derived and dermal muscle (PC)-derived myogenic differentiation cultures, related to Figure 5. (A) Morphologic aspects of sphere cultures of cells isolated from dermal PC muscle (a') and TA muscle (b'), and differentiated cultures of dermal PC (a) and TA muscle (b). (B) Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis for mRNA expression of myogenic markers *Pax7*, *MyoD1*, *Myogenin* (*Myog*), *MyH3* (embryonic *MyHC*), and *MyH2* (adult *MyHC*) in differentiated cultures from PC and TA. Expression is shown relative to *Tbp* and it is represented as the mean±SD of three independent mice. (C) Percentage of GFP+ mono- (grey bars) and multinucleated cells (white bars) at days 1, 3, and 7 of differentiation, as detected by immunofluorescence. Bars represent mean±SD. The experiments were independently replicated as specified (N=mice; n=experiments) (brackets: **=p<0.01; *=p<0.05).

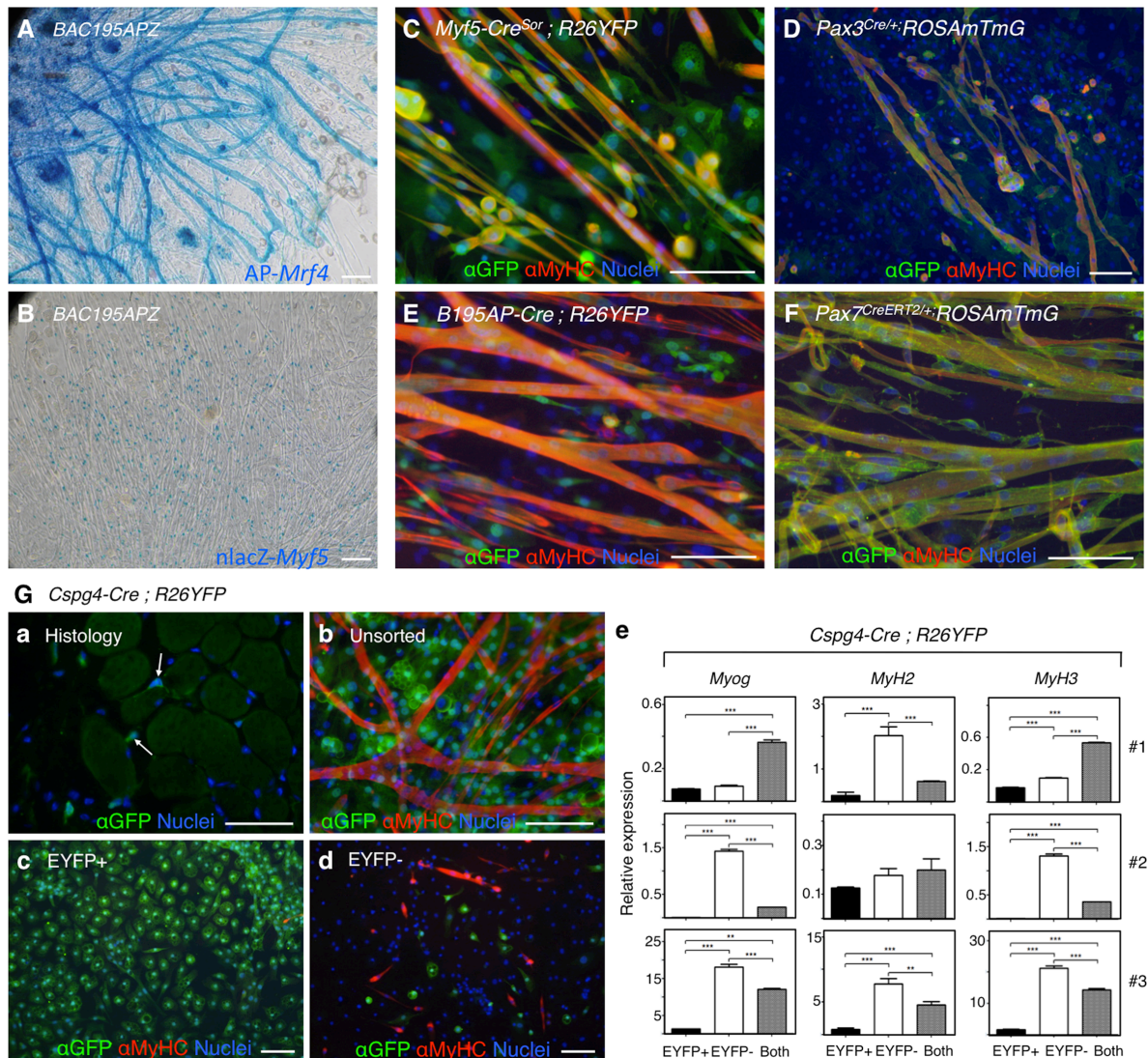


Figure S4. PC satellite cell progeny gives rise to dermis-derived myotubes, related to Figure 5. (A-B) Detection of AP-Mrf4⁺ (panel A) and nlacZ-Myf5⁺ (panel B) cells in differentiation cultures. (C-F) Contribution of Myf5^{SOR} (panel C), Pax3^{Cre} (panel D), B195AP-Cre (panel E), and Pax7^{CE} (panel F)-derived cells to striated muscle was determined by immunofluorescence with anti-GFP (for EYFP expression), and sarcoplasmic anti-myosin heavy chain (MyHC, all fibers) antibodies. (G) Contribution of Cspg4^{Cre}-derived cells to striated muscle. (a) *In situ* localization of Cspg4-derived cells in a histological section of dorsal skin by immunofluorescence with anti-GFP antibody. (b-d) Contribution of unsorted Cspg4^{Cre}-derived cells (panel b) and FACS-sorted cell fractions [EYFP+ (panel c), EYFP- (panel d)] to striated muscle differentiation was measured by immunofluorescence with anti-GFP (for EYFP expression), and sarcoplasmic anti-myosin heavy chain (MyHC, all fibers) antibodies. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue). (e)

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis for mRNA expression of myogenic markers *Myogenin (Myog)*, *MyH2 (adult MyHC)* and *MyH3 (embryonic MyHC)* from differentiated cultures of sorted cell fractions, "Both" fraction representing the mixture of EYFP+ and EYFP- sorted populations in the same percentages as in the original unsorted population. Expression is shown relative to the unsorted fraction (not shown). Bars represent mean±SD of a single experiment in which mRNA from eight mice was pooled (brackets: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Scale bars in all immunofluorescence panels, 100 μm.

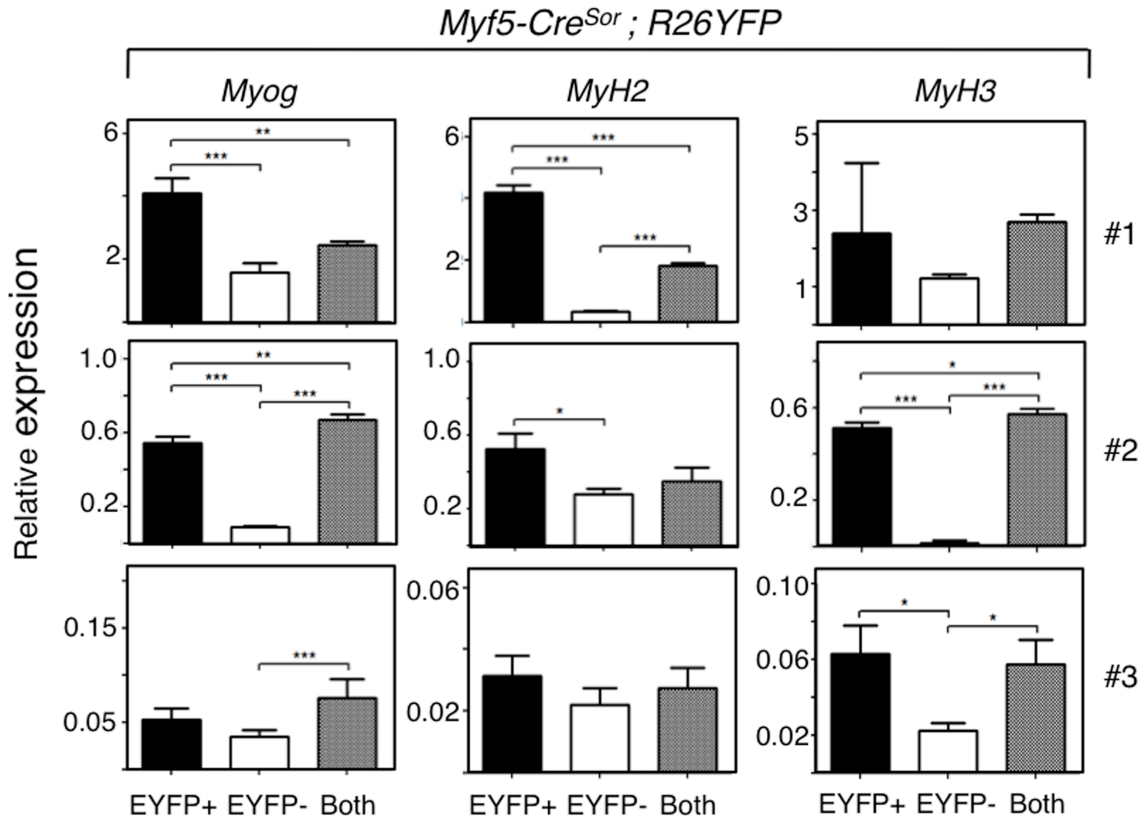
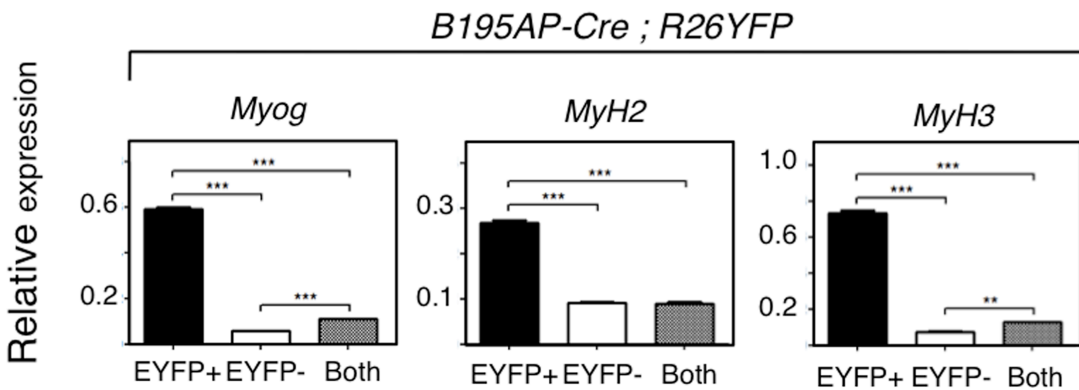
A**B**

Figure S5. Quantitative contribution from *Myf5^{SOR}* and *B195AP*-traced cell lineages to striated muscle derivation, related to Figure 6. (A-B) Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis for mRNA expression of myogenic markers *Myogenin* (*Myog*), *MyH2* (*adult MyHC*) and *MyH3* (*embryonic MyHC*) from differentiated cultures of sorted cell fractions and "Both" fraction [representing the mixture of EYFP+ and EYFP- sorted populations in the same percentages as represented in the original cell population]. Expression is shown relative to the unsorted cell fraction (not shown). Chart bars represent mean \pm SD of three independent experiments (#1, #2, #3) in which mRNA from at least four mice was pooled (brackets: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

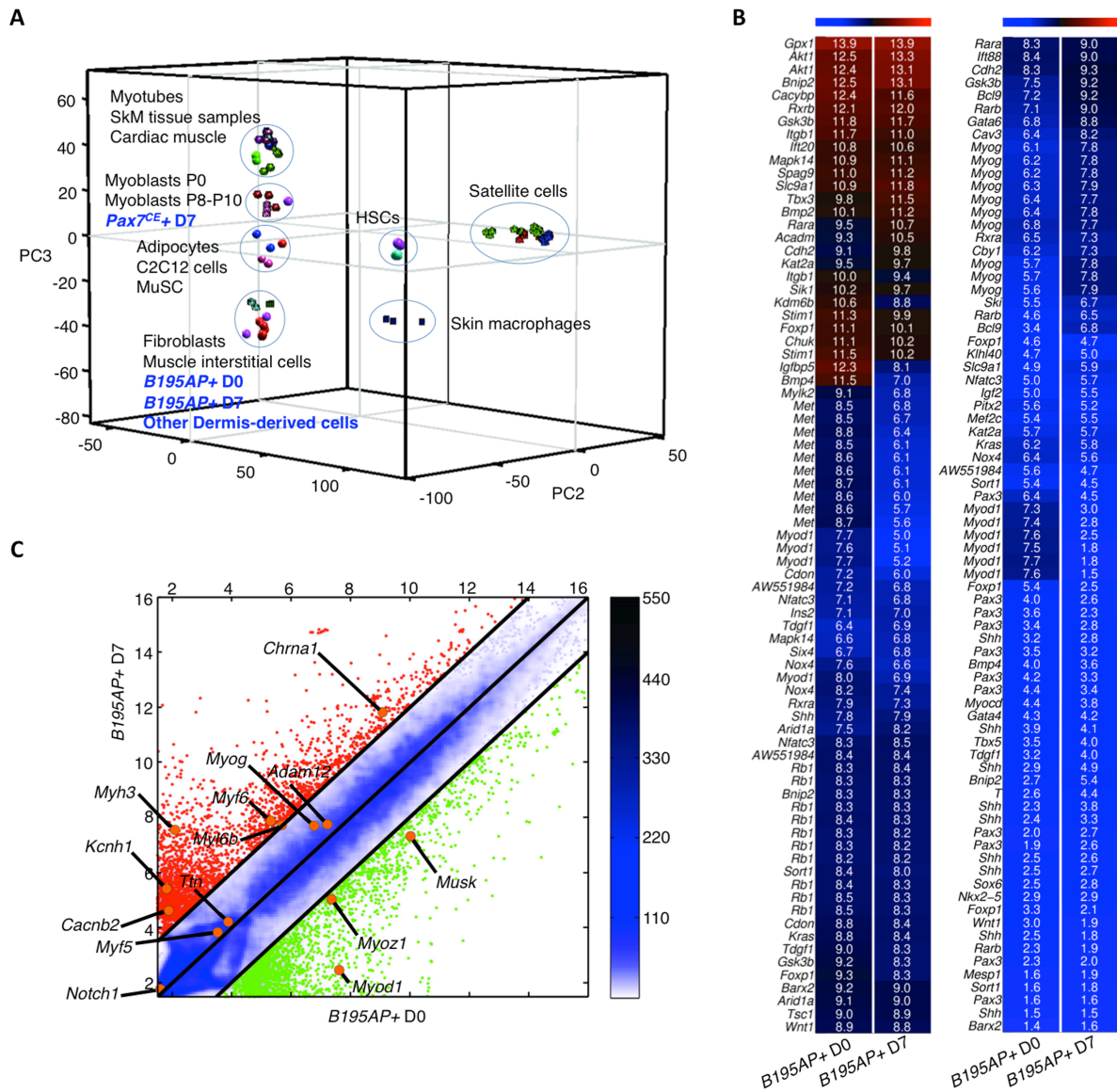


Figure S6. Transcriptomic analysis of *Myf5*⁺ dermal myogenic precursors, related to Figure 6.

Total RNAs from FACS-sorted dermal *B195AP*(+/-) and *Pax7*^{CE}(+/-) cell fractions were isolated at days 0 and 7 of proliferation culture. Total RNAs from dermal *Myf5*^{SOR}(+/-), *B195AP*(+/-) and *Cspg4*(+/-) cell fractions as well as from CD1 control mice were isolated. Since Syndecan-4 (*Sdc4*), a well-known satellite cell marker (Cornelison et al., 2001; Tanaka et al., 2009) was enriched in *Myf5*-EYFP⁺ cells (data not shown), *Myf5*^{SOR}(+/-), *B195AP*(+/-), *Cspg4*(+/-), and CD1 control mice cells were fractionated using this marker as well. Microarray analyses were compared to database samples as detailed in Table S2. (A) Principal Component Analysis (PCA) of gene expression data. The 1st principal component (PC1) captures 47% of the gene expression variability. PC2 and PC3

capture 13 and 7.3% of the variability, respectively. (B) Heat maps showing the expression levels of the 154 probes (63 genes) associated with the GO category "striated muscle cell differentiation" in the *B195AP+* cells at day 0 (D0) and day 7 (D7). (C) Pairwise scatter plot of *B195AP+* cells at day 0 (D0) and day 7 (D7). The positions of some myogenic markers (*Myod1*, *Myoz1*, *Musk*, *Adam12*, *Myog*, *Ttn*, *Myf5*, *Notch1*, *Chrna1*, *Myl6b*, *Myf6*, *Myh3*, *Cacnb2*, and *Kcnh1*) are shown as orange dots. The color bar to the right indicates the scattering density. The gene expression levels are log₂ scaled.

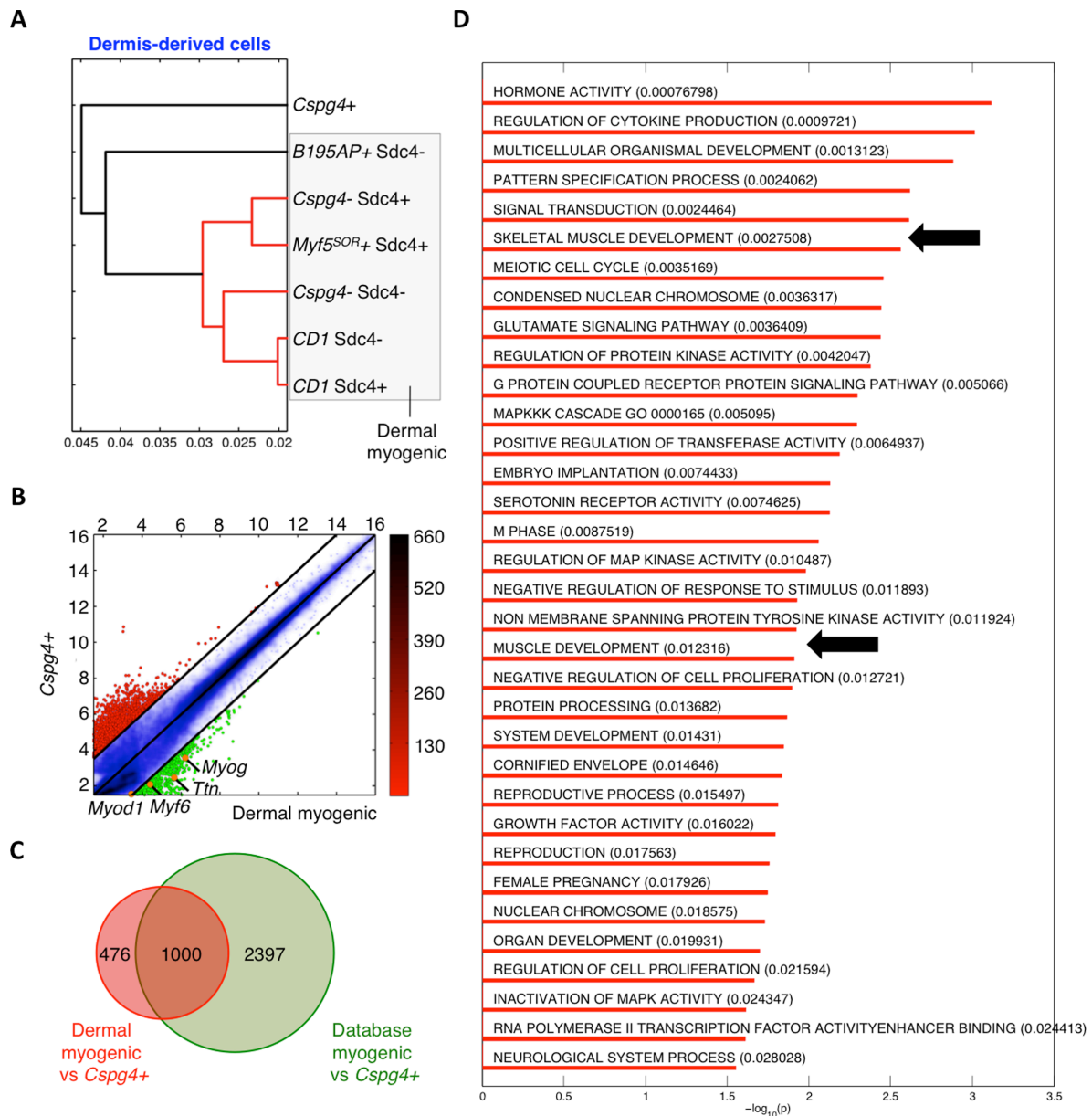


Figure S7. Transcriptomic analysis of dermal myogenic and non-myogenic precursor cell fractions, related to Figure 6. Total RNAs from dermal *Myf5^{SOR}*(+/-), *B195AP*(+/-) and *Cspg4*(+/-) cell fractions as well as from *CD1* control mice were isolated. Since Syndecan-4 (*Sdc4*), a well-known satellite cell marker (Cornelison et al., 2001; Tanaka et al., 2009) was enriched in *Myf5*-EYFP+ cells (data not shown), cells were fractionated using this marker as well. Microarray analyses were compared to database samples as detailed in Table S2. (A) Hierarchical clustering of samples performed using the correlation metric and the average linkage method. (B) Pairwise scatter plot. Genes upregulated in ordinates sample compared with abscissas samples are shown

in red circles; those downregulated are shown in green. The positions of some myogenic markers (*Myod1*, *Myf6*, *Ttn*, *Myog*) are shown as orange dots. The color bar to the right indicates the scattering density. The gene expression levels are log₂ scaled. (C) Venn diagram showing overlap among (i) genes upregulated between dermal myogenic and *Cspg4+* cell fractions, and (ii) database myogenic and *Cspg4+* cell fractions. (D) Plot bar of the -log₁₀(p) of the significant GSEA-enriched terms (p-values given in parentheses). Arrows point to muscle-related GSEA terms.

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table S1. Mouse strains used in this study, related to Figures 1-7.

Abbreviated name	Full name	JAX stock number ¹	Charles River strain code ²	Harlan order code ³	Reference
<i>B195AP^{Cre}</i>	<i>BAC195AP-Cre</i>				This study
<i>B195APZ</i>	<i>BAC195APZ</i>				(Carvajal et al., 2001)
<i>Bmi1^{CreER/+}</i>	<i>B6;129-Bmi1^{tm1(cre/ERT)Mrc/J}</i>	010531			(Sangiorgi and Capecchi, 2008)
<i>CD1</i>	<i>CrI:CD1(ICR)</i>		022		
<i>Cspg4^{Cre}</i>	<i>B6;FVB-Tg(Cspg4-cre)1Akik/J</i>	008533			(Zhu et al., 2008)
<i>Foxn1^{nu}</i>	<i>Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}</i>			069(nu) 070(nu/+)	(Pantelouris, 1968)
<i>Myf5^{CreSOR}</i>	<i>B6.129S4-Myf5tm3(cre)Sor /J</i>	007893			(Tallquist et al., 2000)
<i>Pax3^{Cre/+}</i>	<i>B6;129-Pax3tm1(cre)Joe/J</i>	005549			(Engleka et al., 2005)
<i>Pax3^{GFP/+}</i>					(Relaix et al., 2005)
<i>Pax3^{IRESnLacZ/+}</i>					(Relaix et al., 2003)
<i>Pax7^{CreER2/+}</i>	<i>B6;129-Pax7tm2.1(cre/ERT2)Fan/J</i>	012476			(Lepper et al., 2009; Lepper and Fan, 2011; Lepper et al., 2011)
<i>ROSA^{mTmG}</i>	<i>Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J</i>	007676			(Muzumdar et al., 2007)
<i>R26R</i>	<i>FVB.129S4(B6)-Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}/J</i>	009427			(Soriano, 1999)
<i>R26R^{GFP-DTA/+}</i>	<i>Gt(ROSA)26Sor^{tm1(DTA)jmb}/J</i>	006331			(Ivanova et al., 2005)
<i>R26YFP</i>	<i>B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J</i>	006148			(Srinivas et al., 2001)

¹ <http://jaxmice.jax.org>

² <http://www.criver.com>

³ <http://www.harlan.com>

Supplemental Table S2. Arrays used for transcriptomic analyses, related to Figures S6 and S7.

GSM #	Description	Reference
GSM990708	Cardiomyocytes - 129SvEv/C57BL/6 wild type mice cardiomyocytes 16hr after PBS injection.	(Zhang et al., 2012)
GSM990709		
GSM990710		
GSM997165	Myoblastic - C2C12 myoblastic cell line.	(Davidovic et al., 2013)
GSM997166		
GSM1541931	Myoblasts P0 - C57BL/6J mice primary myoblasts in proliferation conditions at passage 0.	Carrió and Suelves, unpublished
GSM1541932		
GSM1541933		
GSM1541934	Myoblasts Prolif - C57BL/6J mice primary myoblasts in proliferation conditions at passage 8-10.	
GSM1541935		
GSM1541936		
GSM1541937	Myotubes D1 - C57BL/6J mice primary myotubes differentiation conditions at day 1.	
GSM1541938		
GSM1541939		
GSM1541940	Myotubes D2 - C57BL/6J mice primary myotubes differentiation conditions at day 2.	
GSM1541941		
GSM1541942		
GSM1541943	Myotubes D4 - C57BL/6J mice primary myotubes differentiation conditions at day 4.	
GSM1541944		
GSM1541945		
GSM1541949	Skeletal Muscle - NOD/ShiLtj mice skeletal muscle.	
GSM1541946	Quadriceps - 129Sv/C57BL/6J mice quadriceps muscle.	
GSM1541947		
GSM1541948		
GSM856087	MuSC - C57BL/6J DMD/MDX mice FACS sorted cells, CD34+/a7-integrin+/Sca1-.	Roy M Williams, unpublished
GSM856083	Muscle Interstitial - C57BL/6J DMD/MDX mice FACS sorted cells, CD34+/a7-integrin+/Sca1+.	
GSM856084		
GSM1253022	Skeletal Muscle AR97Q - C57BL/6J AR-97Q mice skeletal muscle.	(Iida et al., 2015)
GSM1253023		
GSM1253024		
GSM1299431	Satellite Young 1 - C57BL/6 2 month aged mice FACS sorted satellite cells.	(Sousa-Victor et al., 2014)
GSM1299432		
GSM1299433		
GSM1299438	Satellite Young 2 - C57BL/6 2 month aged mice FACS sorted satellite cells.	
GSM1299439		
GSM1299440		
GSM1299452	Satellite Young 3 - C57BL/6 2 month aged mice FACS sorted satellite cells.	
GSM1299453		
GSM1299454		
GSM1299458	Satellite WTbmi1 4 - FVB wild type 2 month aged mice FACS sorted satellite cells.	

GSM1299459		
GSM1299460		
GSM1299441		
GSM1299442	Satellite Old 2 - C57BL/6 23 month aged mice FACS sorted satellite cells.	
GSM1299443		
GSM1299455		
GSM1299456	Satellite Adu 3 - C57BL/6 6 month aged mice FACS sorted satellite cells.	
GSM1299457		
GSM1299434		
GSM1299435	Satellite Ger 1 - C57BL/6 28 month aged mice FACS sorted satellite cells.	
GSM1299436		
GSM1299444		
GSM1299445	Satellite Ger 2 - C57BL/6 28 month aged mice FACS sorted satellite cells.	
GSM1220789		
GSM1220790	Fibroblast - C57/Bl6-J mice tail fibroblasts cells.	(Furtado et al., 2014)
GSM1220791		
GSM1037932		
GSM1037933	Adipocytes - 3T3-L1 cultured mature adipocytes treated with physiological saline	(Chew et al., 2014)
GSM1109740		
GSM1109741	HSC-CD41- - Freshly FACS sorted HSCs from mouse bone marrow, Lin-sca1+ckit+flt3-CD41-	(Gekas and Graf, 2013)
GSM1109742		
GSM1109743		
GSM1109744	HSC-CD41+ - Freshly FACS sorted HSCs from mouse bone marrow, Lin-sca1+ckit+flt3-CD41+	
GSM1109745		
GSM1400758		Castellana and Perez-
GSM1400759	Macrophages - CD1 skin resident macrophages	Moreno, unpublished
GSM1400760		

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Carvajal, J.J., Cox, D., Summerbell, D., and Rigby, P.W.J. (2001). A BAC transgenic analysis of the Mrf4 / Myf5 locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development. *Development* 1868, 1857-1868.

Carvajal, J.J., Keith, A., and Rigby, P.W. (2008). Global transcriptional regulation of the locus encoding the skeletal muscle determination genes Mrf4 and Myf5. *Genes & development* 22, 265-276.

Chew, S.H., Okazaki, Y., Nagai, H., Misawa, N., Akatsuka, S., Yamashita, K., Jiang, L., Yamashita, Y., Noguchi, M., Hosoda, K., *et al.* (2014). Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. *Carcinogenesis* 35, 164-172.

Cornelison, D.D., Filla, M.S., Stanley, H.M., Rapraeger, A.C., and Olwin, B.B. (2001). Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol* 239, 79-94.

Dahlqvist, C., Blokzijl, A., Chapman, G., Falk, A., Dannaeus, K., Ibanez, C.F., and Lendahl, U. (2003). Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development* 130, 6089-6099.

Davidovic, L., Durand, N., Khalfallah, O., Tabet, R., Barbry, P., Mari, B., Sacconi, S., Moine, H., and Bardoni, B. (2013). A novel role for the RNA-binding protein FXR1P in myoblasts cell-cycle progression by modulating p21/Cdkn1a/Cip1/Waf1 mRNA stability. *PLoS genetics* 9, e1003367.

DeChiara, T.M., Bowen, D.C., Valenzuela, D.M., Simmons, M.V., Poueymirou, W.T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D.L., Rojas, E., Park, J.S., *et al.* (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85, 501-512.

Engleka, K.A., Gitler, A.D., Zhang, M., Zhou, D.D., High, F.A., and Epstein, J.A. (2005). Insertion of Cre into the Pax3 locus creates a new allele of Splotch and identifies unexpected Pax3 derivatives. *Dev Biol* 280, 396-406.

Furtado, M.B., Costa, M.W., Pranoto, E.A., Salimova, E., Pinto, A.R., Lam, N.T., Park, A., Snider, P., Chandran, A., Harvey, R.P., *et al.* (2014). Cardiogenic genes expressed in cardiac fibroblasts contribute to heart development and repair. *Circulation research* 114, 1422-1434.

Gekas, C., and Graf, T. (2013). CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood* 121, 4463-4472.

Halevy, O., and Lerman, O. (1993). Retinoic acid induces adult muscle cell differentiation mediated by the retinoic acid receptor- α . *Journal of cellular physiology* 154, 566-572.

Iida, M., Katsuno, M., Nakatsuji, H., Adachi, H., Kondo, N., Miyazaki, Y., Tohnai, G., Ikenaka, K., Watanabe, H., Yamamoto, M., *et al.* (2015). Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors. *Human molecular genetics* 24, 314-329.

Ivanova, A., Signore, M., Caro, N., Greene, N.D., Copp, A.J., and Martinez-Barbera, J.P. (2005). In vivo genetic ablation by Cre-mediated expression of diphtheria toxin fragment A. *Genesis* 43, 129-135.

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

Lepper, C., and Fan, C.-m. (2011). Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis* *48*, 424-436.

Lepper, C., Partridge, T.a., and Fan, C.-M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* *138*, 3639-3646.

Lovett, F.A., Gonzalez, I., Salih, D.A., Cobb, L.J., Tripathi, G., Cosgrove, R.A., Murrell, A., Kilshaw, P.J., and Pell, J.M. (2006). Convergence of Igf2 expression and adhesion signalling via RhoA and p38 MAPK enhances myogenic differentiation. *J Cell Sci* *119*, 4828-4840.

Muzumdar, M., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* *605*, 593-605.

Ono, Y., Calhabeu, F., Morgan, J.E., Katagiri, T., Amthor, H., and Zammit, P.S. (2011). BMP signalling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells. *Cell death and differentiation* *18*, 222-234.

Pantelouris, E.M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* *217*, 370-371.

Relaix, F., Polimeni, M., Rocancourt, D., Ponzetto, C., Schafer, B.W., and Buckingham, M. (2003). The transcriptional activator PAX3-FKHR rescues the defects of Pax3 mutant mice but induces a myogenic gain-of-function phenotype with ligand-independent activation of Met signaling in vivo. *Genes & development* *17*, 2950-2965.

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* *435*, 948-953.

Rozwadowska, N., Kolanowski, T., Wiland, E., Siatkowski, M., Pawlak, P., Malcher, A., Mietkiewski, T., Olszewska, M., and Kurpisz, M. (2013). Characterisation of nuclear architectural alterations during in vitro differentiation of human stem cells of myogenic origin. *PLoS One* *8*, e73231.

Sambasivan, R., Comai, G., Le Roux, I., Gomes, D., Konge, J., Dumas, G., Cimper, C., and Tajbakhsh, S. (2013). Embryonic founders of adult muscle stem cells are primed by the determination gene Mrf4. *Dev Biol* *381*, 241-255.

Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature genetics* *40*, 915-920.

Sharples, A.P., Al-Shanti, N., Lewis, M.P., and Stewart, C.E. (2011). Reduction of myoblast differentiation following multiple population doublings in mouse C2 C12 cells: a model to investigate ageing? *Journal of cellular biochemistry* *112*, 3773-3785.

Sousa-Victor, P., Gutarra, S., Garcia-Prat, L., Rodriguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jardi, M., Ballestar, E., Gonzalez, S., Serrano, A.L., *et al.* (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* *506*, 316-321.

Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., William, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC developmental biology* *1*, 4.

Stern-Straeter, J., Bonaterra, G.A., Hormann, K., Kinscherf, R., and Goessler, U.R. (2009). Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. *BMC molecular biology* *10*, 66.

- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 15545-15550.
- Swaminathan, S., Ellis, H.M., Waters, L.S., Yu, D., Lee, E.C., Court, D.L., and Sharan, S.K. (2001). Rapid engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides. *Genesis* *29*, 14-21.
- Tallquist, M.D., Weismann, K.E., Hellstrom, M., and Soriano, P. (2000). Early myotome specification regulates PDGFA expression and axial skeleton development. *Development* *127*, 5059-5070.
- Tanaka, K.K., Hall, J.K., Troy, A.A., Cornelison, D.D., Majka, S.M., and Olwin, B.B. (2009). Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration. *Cell Stem Cell* *4*, 217-225.
- Voronova, A., Coyne, E., Al Madhoun, A., Fair, J.V., Bosiljic, N., St-Louis, C., Li, G., Thurig, S., Wallace, V.A., Wiper-Bergeron, N., *et al.* (2013). Hedgehog signaling regulates MyoD expression and activity. *The Journal of biological chemistry* *288*, 4389-4404.
- Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L.S., Lyu, Y.L., Liu, L.F., and Yeh, E.T. (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* *18*, 1639-1642.
- Zhu, X., Hill, R.A., and Nishiyama, A. (2008). NG2 cells generate oligodendrocytes and gray matter astrocytes in the spinal cord. *Neuron glia biology* *4*, 19-26.

