



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de marcadores de diferenciación y desdiferenciación en la plasticidad regenerativa de miofibras de Ajolote (*Ambystoma mexicanum*)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LIBB Donovan Correa Gallegos

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jesús Chimal Monroy – Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Diana Escalante Alcalde – Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Karlen Gazarian – Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México. Junio, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"I confess that neither the structure of languages, nor the code of governments, nor the politics of various states, possessed attractions for me. It was the secrets of heaven and earth that I desired to learn..."

-Mary Shelley. Frankenstein.

Deseo agradecer el invaluable apoyo técnico de la Maestra en Ciencias Marcia Bustamante Zepeda.

A mis padres, Brenda Gallegos Gonzalez y Javier Correa Nava, por su infinita paciencia, apoyo y cariño incondicional a lo largo de toda mi vida.

A mi hermana, Carla Daniela Correa Gallegos, y a mi sobrina, Sarasvati Padilla Correa.

A Valeria López Salazar “mein Schatz, die Meine Tage erleuchtet”, por tu amor y enseñanzas. De ti he aprendido más de lo que te puedes imaginar y gracias a ti espero con ansias lo que depara el futuro.

Al Dr. Jesús Chimal Monroy por su apoyo y guía durante mi estancia de 6 años en su laboratorio. Así como a todos mis compañeros y amigos de laboratorio tanto actuales; March, Jess (Alias “la abuela”), Robert, Brianda (Alias “el Brayan”) y Eliseo; como los pasados; Beto, Giss, Liz, Claudio, Alejandro, Valentina, Faviel, Sabina, Dante, Karen, Lalo, Silvina; y los anexos; Diego, Blad y Paco; por hacer de estos 6 años los mejores de mi vida.

A mis amigos y entrenadores del Parkour. Uds. siempre han sido una vía de liberación de estrés y frustraciones sin la cual no hubiera sido posible esto.

ÍNDICE

Índice.....	4
Abreviaturas	5
Resumen	6
Introducción	7
Regeneración de la extremidad de urodelos.....	7
Estadios de la regeneración de la extremidad de urodelos.....	7
Bases celulares de la regeneración	9
Desdiferenciación vs activación de células troncales residentes: el caso del músculo en urodelos	10
Regulación del estado de diferenciación durante la regeneración: reactivación de mecanismos embrionarios.....	10
Miogénesis y MRFs	11
Ondas miogénicas en amniotas y anamniotas.....	11
Factores Reguladores Miogénicos (MRFs)	13
Hipótesis	14
Objetivos.....	15
Objetivo general	15
Objetivos particulares.....	15
Materiales y métodos.....	15
Reactivos	15
Animales y cuidados	15
Análisis filogenético del contig107219 (MyoG).....	16
Clonación de MRFs	16
Transcripción de ribosondas.....	17
Histología.....	17
Hibridación in situ (ISH).....	18
Inmunofluorescencia acoplada a ISH (ISHIF)	18
TUNEL	18
Disociación miofibras	19
Transplante de miofibras	19
Procesamiento de imágenes.....	20
Resultados	20
Clonación de fragmentos de los MRFs de <i>Ambystoma mexicanum</i>	20
Patrón de expresión de MRFs durante la regeneración	20
Progenitores MyoG+ y Myf5+ dejan de expresar el marcador de músculo 12/101 y reingresan al ciclo celular.....	22

Evidencia de desdiferenciación de miofibras de <i>A. mexicanum</i>	26
Discusión	30
MRFs durante la regeneración de la extremidad	30
Myf5 como marcador de mioblastos en expansión durante la regeneración	31
MyoG y su posible regulación por Ids en la regeneración	33
Mrf4 no pudo ser detectado por ISH	35
MyoD en la regeneración?	36
Orígenes de progenitores musculares y la expresión de MRFs	37
Evidencia de desdiferenciación en miofibras	39
Reingreso al ciclo celular en miofibras	39
Fragmentación y cambios de expresión de marcadores	40
Conclusión	41
Referencias	42

ABREVIATURAS

A1: Línea celular mioblástica derivada de blastemas del tritón *Notophthalmus viridescens*.

AEC: Apical Epidermal Cap; capa epitelial apical. Centro organizador del blastema que dirige y regula su crecimiento.

bHLH: basic Helix-Loop-Helix; hélice-bucle-hélice básica. Motivo estructural de proteínas que permite el reconocimiento a la secuencia de la caja E en el DNA.

C2C12: Línea celular mioblástica de ratón derivada de la lesión en la extremidad posterior.

CDK: Cyclin-dependent kinases; Cinasas dependientes de ciclinas. Enzimas reguladoras del ciclo celular.

E12/47: Factores transcripcionales ubicuos de la familia de proteínas E.

E2-2: Factor transcripcional ubicuo de la familia de proteínas E.

ECL: External Cell Layer; capa celular externa. Estructura equivalente al dermomiótomo amniota en peces teleósteos.

Fgf8: Fibroblast Growth Factor 8; factor de crecimiento fibroblástico. Mitógeno implicado en diversos sistemas de desarrollo.

HEB/HTF4: Factor transcripcional ubicuo de la familia de proteínas E.

Id: Inhibitor of Differentiation; inhibidor de diferenciación. Regulador negativo de factores transcripcionales de la familia bHLH.

ISH: *In situ* hybridization; hibridación *in situ*. Técnica para detectar la presencia de una secuencia específica de DNA o RNA.

ISHIF: *In situ* hybridization + Immunofluorescence; hibridación *in situ* + Inmunofluorescencia.

ITF-2: Factor transcripcional ubicuo de la familia de proteínas E.

MHC: Myosin Heavy Chain; cadena pesada de la miosina. Proteína implicada en la contracción muscular.

MRF: Myogenic Regulatory Factor; factor regulador miogénico. Factor transcripcional implicado en el programa miogénico.

Mrf4: Myogenic Regulatory Factor 4. Factor transcripcional implicado en la miogénesis.

Msx1/2: Factores transcripcionales involucrados en el desarrollo de diversas estructuras.

Myf5: MYogenic regulatory Factor 5. Factor transcripcional implicado en la miogénesis.

MyoD: Factor transcripcional implicado en la miogénesis.

MyoG: Factor transcripcional implicado en la miogénesis.

p57: Inhibidor de CDKs

Pax3/7: Paired box protein 3/7; Proteínas de caja emparejada 3/7. Factores transcripcionales importantes en el desarrollo temprano.

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; Antígeno nuclear de proliferación celular. Cofactor de la ADN-polimerasa delta, marcador de fase S del ciclo celular.

Pitx2: Pituitary homeobox 2; homeocaja pituitaria 2. Factor transcripcional involucrado en el desarrollo de diversas estructuras.

Rb: Retinoblastoma. Regulador del ciclo celular.

Shh: Sonic Hedgehog. Morfógeno implicado en la morfogénesis de diversas estructuras en el desarrollo.

SWI/SNF: Complejo multiproteico encargado de la remodelación de la cromatina.

Tbx1: T-box protein 1; Proteína caja T 1. Factor transcripcional involucrado en el desarrollo de diversas estructuras.

Twist1: Factor transcripcional de la familia bHLH implicado en la determinación y diferenciación celular.

RESUMEN

Durante la regeneración de la extremidad de *Ambystoma mexicanum*, progenitores indiferenciados de los distintos linajes de los tejidos que conforman la extremidad son reclutados y expandidos en el blastema para regenerar, en forma y función, los tejidos perdidos por la amputación. Dichos progenitores, de manera similar al desarrollo embrionario de la extremidad, deben ser rigurosamente regulados por la interpretación conjunta de señales extrínsecas y factores intrínsecos que modulen el estado de diferenciación. En el caso de los progenitores musculares, nosotros hipotetizamos que los factores reguladores miogénicos (MRFs), derivados

de su función conservada en la regulación del programa miogénico, representan factores intrínsecos esenciales para la regulación del estado de diferenciación. Nuestros resultados correlacionan la expresión de Myf5, un MRF temprano, a células indiferenciadas en proliferación sugiriendo una función en la determinación y expansión de los mioblastos. Mientras que MyoG, un MRF tardío, se expresa tanto en músculo diferenciado como en los progenitores musculares sugiriendo que la función clásica de MyoG, como factor de diferenciación terminal, podría tener una regulación particular durante la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*. Adicionalmente, pudimos evidenciar el reingreso al ciclo celular en miofibras en la extremidad, así como la fragmentación en células mononucleares al trasplantar miofibras a blastemas evidenciando la capacidad latente de las miofibras de *A. mexicanum* para desdiferenciarse, habilidad que ha sido recientemente puesta en duda.

INTRODUCCIÓN

REGENERACIÓN DE LA EXTREMIDAD DE URODELOS

El “Ajolote” (*Ambystoma mexicanum*), al igual que demás anfibios urodelos (anfibios que retienen su cola después de la metamorfosis a diferencia de los anuros: sapos y ranas), como el tritón Americano del este (*Notophthalmus viridescens*) o el tritón de vientre de fuego japonés (*Cynops pyrrhogaster*), tienen la capacidad a lo largo de toda su vida de regenerar sus extremidades cuando éstas son amputadas (A. Kumar & Simon, 2015). Los anuros, en comparación, sólo retienen esta capacidad durante la etapa larvaria y la pierden progresivamente durante la metamorfosis (Beck, Belmonte, & Christen, 2009). La capacidad regenerativa de los urodelos está documentada desde el siglo XVIII en los trabajos de Lazzaro Spallanzani (Tsonis & Fox, 2009), pero no fue hasta 1901 que T. H. Morgan describió los dos procesos básicos que rigen la regeneración: “epimorfosis” y “morfalaxis”, sentando así las bases de la biología regenerativa (Agata, Saito, & Nakajima, 2007). La regeneración de la extremidad de urodelos se considera epimórfica la cual se caracteriza por la formación de un “blastema” en el sitio de corte del cual crecen y se forman las estructuras perdidas. En comparación, la morfalaxis no depende de un blastema sino de la remodelación del organismo entero para regenerar las estructuras perdidas y ocurre comúnmente en invertebrados. El blastema de la extremidad de urodelos se define como la masa celular de apariencia mesenquimática o indiferenciada que se acumula en la parte apical del muñón y es recubierta por un epitelio especializado llamado epitelio de herida o capa epitelial apical (Figura 1).

ESTADIOS DE LA REGENERACIÓN DE LA EXTREMIDAD DE URODELOS

Clásicamente se ha dividido el proceso de regeneración en fases o estadios morfológicamente distinguibles (Figura 1); aunque diversos procesos celulares y moleculares se sobreponen en distintas fases, mecanismos básicos pueden ser asociados a ciertos estadios (Eugen Nacu & Tanaka, 2011; Stocum & Cameron, 2011).

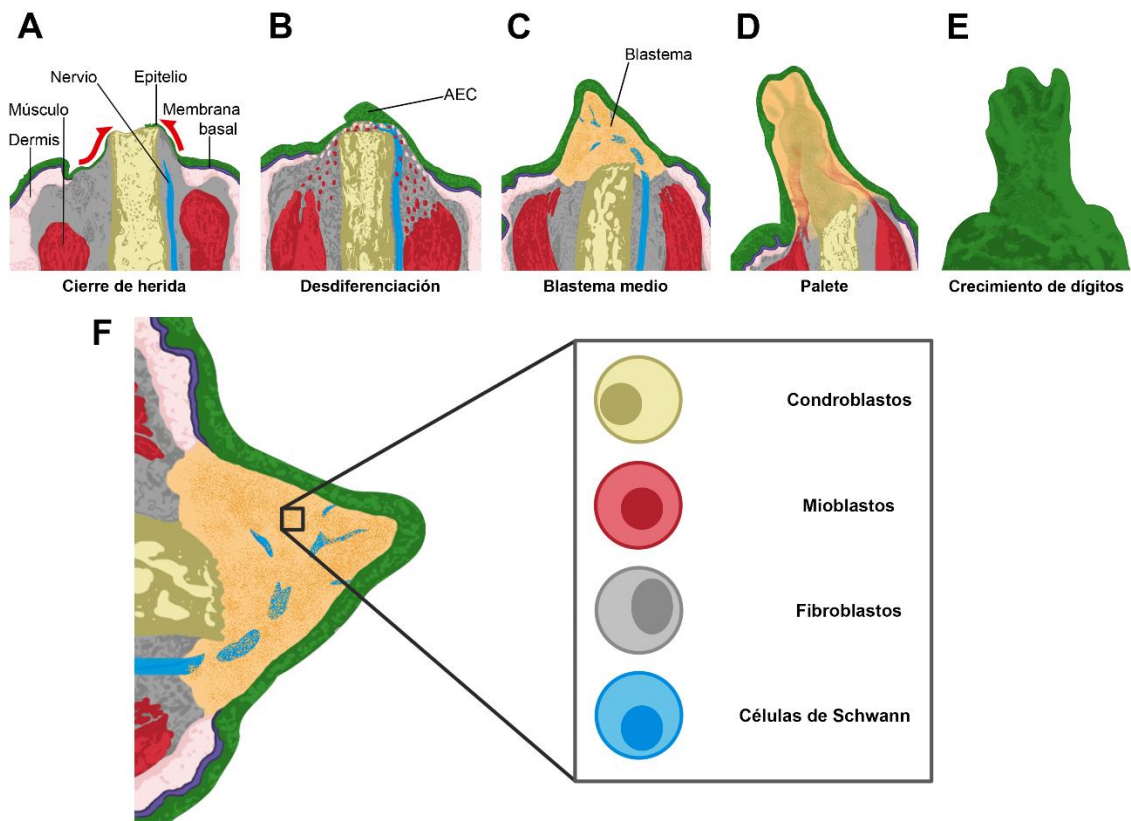


Figura 1. Estadios de la regeneración de la extremidad de urodelos (A-E). Representación de la heterogeneidad celular del blastema (F) AEC = Casquete epitelial apical (Apical Epidermal Cap).

Cierre de herida (**Figura 1 A**): En respuesta a una amputación, semejante a los mamíferos, la sangre forma un coágulo que funciona como una barrera temporal que previene la pérdida de fluido intersticial. Después, los queratinocitos de la epidermis rápidamente (~10 h) comienzan a migrar para cubrir la superficie expuesta (Tank, Carlson, & Connelly, 1976). El epitelio nuevo, a diferencia de epitelios en tejidos adultos, carece de una membrana basal que separe el epitelio del tejido conjuntivo. Esto permite interacciones esenciales para la regeneración entre el epitelio y las células de los tejidos adyacentes (eg. músculo, hueso, dermis, etc.).

Desdiferenciación (**Figura 1 B**): Una vez cerrada la herida, los nervios sensoriales inervan el epitelio, lo que causa su engrosamiento y maduración a un epitelio especializado, llamado epitelio de herida o casquete epitelial apical (AEC por sus siglas en inglés), que funge como un organizador que dirige el crecimiento del blastema (Endo, Bryant, & Gardiner, 2004). En respuesta a las señales derivadas del epitelio de herida, las células del tejido adyacente se liberan de su organización tisular y adquieren un estado semejante a células mesenquimales indiferenciadas capaces de proliferar sustancialmente (E. Hay & Fischman, 1961). Además, células troncales residentes de distintos tejidos (eg. células troncales musculares Pax7+ o “satélites”) son activadas y contribuyen también a la formación del blastema (Morrison, Borg, & Simon, 2010; Morrison, Löff, He, & Simon, 2006). Es decir que, tanto células derivadas por la desdiferenciación del tejido maduro como células troncales residentes activadas migran para generar la masa celular que formará el blastema.

Crecimiento del blastema (**Figura 1 C**): El blastema se puede observar a simple vista como un cono, inicialmente aplanado y más simétrico durante su crecimiento, que cubre la parte apical del muñón. Éste carece de pigmentación e histológicamente se observa un incremento en el

número de células que lo componen (hiperplasia). Es en este estadio cuando la proliferación celular incrementa dramáticamente (E. Hay & Fischman, 1961).

Rediferenciación y crecimiento (**Figura 1 D-E**): Cuando el blastema ha llegado a un tamaño crítico, se comienzan a formar asimetrías en el eje antero-posterior e histológicamente se pueden observar condensaciones condrocíticas que formarán los nuevos elementos esqueléticos, de manera similar a como ocurre durante la morfogénesis de la extremidad (Eugen Nacu & Tanaka, 2011). Se cree que mecanismos que moldean los distintos tejidos de la extremidad durante el desarrollo podrían ser reactivados durante la regeneración. Posteriormente, se forman surcos que forman los interdígitos mientras que los dígitos crecen en secuencia anterior a posterior, opuesto a lo que ocurre en amniotas, que es de posterior a anterior (Fröbisch, 2008). Una vez formados los dígitos (cuatro en extremidades anteriores y cinco en posteriores), la extremidad regenerada es una copia a escala de la extremidad perdida que continuara su crecimiento hasta alcanzar el tamaño adecuado al tamaño del organismo (Stocum & Cameron, 2011).

BASES CELULARES DE LA REGENERACIÓN

Una de las preguntas más relevantes que surgieron al estudiar este y otros sistemas de regeneración fue: ¿De dónde surgen las células que regeneran los tejidos? Actualmente se reconocen tres posibles fuentes de progenitores que pueden ser usadas por los organismos para regenerar distintos tejidos (Jopling, Boue, & Izpisua Belmonte, 2011). Una primera fuente es la activación de **células troncales residentes**, células quiescentes indiferenciadas las cuales pueden reingresar al ciclo celular, proliferar y diferenciarse a uno o más tipos celulares en respuesta a ciertos estímulos (Raveh-Amit, Berzsenyi, Vas, Ye, & Dinnyes, 2013). Ejemplos de sistemas en vertebrados que poseen células troncales residentes que pueden regenerar el tejido es respuesta a un daño incluyen al epitelio del pulmón de mamífero (Chapman et al., 2015), el músculo esquelético de mamífero, peces y anfibios (Cavaco Rodrigues, Christen, Marti, & Izpisua Belmonte, 2012; Lagha et al., 2013; Morrison et al., 2010, 2006; Siegel, Gurevich, & Currie, 2013; Tapan G. Pipalia, Jana Koth, Shukolpa D. Roy, Christina L. Hammond, 2016; Weber, Martindale, Tapscott, & Unguez, 2012), última falange de los dígitos de ratón (J. a. Lehoczky, Robert, & Tabin, 2011; Jessica a. Lehoczky & Tabin, 2015; Rinkevich, Lindau, Ueno, Longaker, & Weissman, 2011), médula espinal en anfibios (Fei et al., 2014; McHedlishvili, Epperlein, Telzerow, & Tanaka, 2007; Muñoz et al., 2014), cerebro, riñón y células ciliadas de la línea lateral de pez cebra (Cruz et al., 2015; Diep et al., 2011; Kroehne, Freudenreich, Hans, Kaslin, & Brand, 2011). La segunda fuente, la **desdiferenciación**, implica el retorno de una célula postmitótica terminalmente diferenciada a un estado “menos diferenciado” dentro de su mismo linaje para poder proliferar antes de rediferenciarse a su mismo tipo celular (Jopling et al., 2011). Ejemplos claros de desdiferenciación que ocurren de forma natural incluyen, osteoblastos de los radios de las aletas caudales de pez cebra (Knopf et al., 2011; Stewart & Stankunas, 2012) y las células de Schwann en la regeneración del axón de mamíferos (Kidd, Ohno, & Trapp, 2013). La tercera fuente es la **transdiferenciación**, o metaplasia, ocurre raramente de forma natural e implica la inicial desdiferenciación de un tipo celular seguido del cambio de linaje durante su diferenciación. El caso emblemático y mejor caracterizado de este proceso sucede durante la regeneración del cristalino de tritón, donde células del epitelio pigmentado del iris dorsal se desdiferencian, proliferan y se diferencian en células del cristalino (Islam et al., 2014). De manera común, ciertos sistemas regenerativos pueden recurrir a más de una fuente de progenitores; por ejemplo, el caso del corazón de mamíferos y peces (González-Rosa, Peralta, & Mercader, 2012; Jopling et al., 2010; K. Kikuchi et al., 2011; Kazu Kikuchi et al., 2010; Santini, Forte, Harvey, & Kovacic, 2016; Senyo et al., 2012; R. Zhang et al., 2013) y el hígado de mamíferos (Español-Suñer et al., 2012; Rodrigo-Torres et al.,

2014; Schaub, Malato, Gormond, & Willenbring, 2014; Tarlow et al., 2014; Wang, Zhao, Fish, Logan, & Nusse, 2015) donde participan tanto células troncales residentes y células desdiferenciadas, por lo que estos mecanismos no son mutuamente excluyentes.

DESDIFERENCIACIÓN VS ACTIVACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES RESIDENTES: EL CASO DEL MÚSCULO EN URODELOS

Tradicionalmente se creía que, durante la regeneración de la extremidad de urodelos, la desdiferenciación era el único o principal mecanismo por el cual se podían obtener progenitores que formaran el blastema (Stocum & Cameron, 2011). Más aún, se creía que las células del blastema eran una población homogénea de progenitores multipotentes, similar al primordio de la extremidad (E. M. Tanaka & Reddien, 2011). No obstante, con la implementación de técnicas de marcaje génico con reporteros fluorescentes en distintos tejidos, se demostró que las células del blastema únicamente participan en regenerar su tejido de origen (Kragl et al., 2009). Esto sugiere que el blastema es, de hecho, una población heterogénea de progenitores tejido específicos (**Figura 1 F**) y que la desdiferenciación no regresa a las células a un estado multipotente embrionario; sino que, a lo sumo, lleva a las células a un estado de progenitores determinados de los distintos linajes celulares presentes en la extremidad (eg. músculo, dermis, cartílago/hueso y células de Schwann). No obstante, estos experimentos no descartan la participación de células troncales residentes en estos tejidos, por lo que la extensión y la importancia de la desdiferenciación en todos los tejidos de la extremidad durante la regeneración en urodelos aún son desconocidas.

Únicamente en el caso de músculo se ha caracterizado la participación de las células troncales residentes durante la regeneración (Morrison et al., 2010, 2006; Sandoval-Guzmán et al., 2014; H. V. Tanaka et al., 2016). Las células “satélite” son células quiescentes que residen en el músculo esquelético, entre el sarcolema de las miofibras y la membrana basal del músculo; estas células expresan el factor Pax7 (Paired box protein 7) y están presentes en todos los vertebrados (Cavaco Rodrigues et al., 2012; Montarras, L’Honoré, & Buckingham, 2013; Morrison et al., 2010, 2006; Siegel et al., 2013; Tapan G. Pipalia, Jana Koth, Shukolpa D. Roy, Christina L. Hammond, 2016; Weber et al., 2012). En respuesta a un daño en las fibras musculares, estas células son activadas, migran, proliferan y se diferencian a mioblastos que se fusionan a miofibras dañadas o forman nuevas miofibras para regenerar el músculo dañado (Montarras et al., 2013). La mayoría de los estudios de células troncales Pax7+ se han realizado en ratón y bajo lesiones químicas o mecánicas donde la arquitectura global, aunque dañada, no se pierda; como es el caso de la amputación de la extremidad donde, además de la función del tejido, también se recupera la forma original. Recientemente, usando diversas construcciones de reporteros génicos tejido específico, para marcar únicamente las miofibras y no las células Pax7+, en distintas especies de urodelos, se mostró que en *N. viridescens* la desdiferenciación de las miofibras es la principal fuente de progenitores musculares en el blastema, mientras que en *A. mexicanum* parece ser la activación de células Pax7+, ya que no se detectó evidencia de desdiferenciación (Sandoval-Guzmán et al., 2014). Por otro lado, en *C. pyrrhogaster* la preferencia por alguna de las fuentes depende del estadio de desarrollo, ya que larvas premetamórficas reclutan preferentemente células Pax7+ mientras que adultos metamórficos optan por la desdiferenciación de las miofibras (H. V. Tanaka et al., 2016).

REGULACIÓN DEL ESTADO DE DIFERENCIACIÓN DURANTE LA REGENERACIÓN: REACTIVACIÓN DE MECANISMOS EMBRIONARIOS

Independientemente de su origen (desdiferenciación/activación de células troncales residentes), el estado de diferenciación de los progenitores debe ser regulado para asegurar la adecuada regeneración de los tejidos. Durante el desarrollo embrionario, esta regulación está dada por la compleja integración espacial y temporal de señales extrínsecas (factores de crecimiento, hormonas, interacciones con la matriz extracelular y célula-célula) y los cambios intrínsecos (genéticos y epigenéticos) de las células que les permite ser o no responsivas a dichas señales. La visión actual en la investigación de la regeneración de la extremidad indica que los mecanismos (extrínsecos e intrínsecos) que moldean la extremidad en el desarrollo embrionario son los mismos mecanismos que son reactivados y permiten la regeneración de la extremidad en estadios adultos (Eugen Nacu & Tanaka, 2011). Por ejemplo, durante el desarrollo de la extremidad, la interacción entre dos centros organizadores (cresta ectodérmica apical y zona de actividad polarizante) mediada por las señales extrínsecas de Sonic Hedgehog (Shh) y el factor de crecimiento fibroblástico 8 (Fgf8) promueven el crecimiento y morfogénesis del primordio (Bénazet & Zeller, 2009); de igual manera se ha mostrado recientemente que la misma integración de las señales de Shh y Fgf8 promueve el crecimiento y morfogénesis en la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum* (Eugeniu Nacu, Gromberg, Oliveira, Drechsel, & Tanaka, 2016). No obstante, aunque se reexpresen durante la regeneración dichos factores extrínsecos, que regulan el estado de diferenciación de los progenitores durante el desarrollo, si no se encuentran presentes los factores intrínsecos que permiten a las células responder a dichas señales, la regeneración se puede dar de forma deficiente. Por ejemplo, la amputación de la extremidad anterior adulta de la rana africana *Xenopus laevis* resulta en la regeneración de un cono cartilaginoso sin musculatura (Beck et al., 2009) y esta regeneración deficiente se correlaciona con el silenciamiento epigenético del locus de Shh durante la metamorfosis (Yakushiji et al., 2007); no obstante, su reactivación no mejora sustancialmente la regeneración (Yakushiji, Suzuki, Satoh, Ide, & Tamura, 2008), indicando que no solo es necesario la presencia de señales extrínsecas sino también que las células que responden a ellas expresen los factores intrínsecos que regularon su diferenciación durante el desarrollo embrionario. Es por esto que se vuelve llamativo estudiar, durante la regeneración de la extremidad, los factores intrínsecos que regulan el estado de diferenciación de manera normal durante el desarrollo de la extremidad. Al igual que las fuentes de progenitores durante la regeneración, los factores intrínsecos que regulan el programa de diferenciación están mejor caracterizados en el músculo esquelético (miogénesis).

MIOGÉNESIS Y MRFS

ONDAS MIOGÉNICAS EN AMNIOTAS Y ANAMNIOTAS

El músculo esquelético es caracterizado por el arreglo de las miofibras que lo conforman; a nivel celular y molecular, las miofibras son sincicios postmitóticos con complejos arreglos miofibrilares esenciales para la función contráctil del músculo (Frontera & Ochala, 2015). La miogénesis es el programa polifacético por el cual progenitores indiferenciados son determinados al linaje muscular generando mioblastos, los cuales proliferan, diferencian y fusionan en las miofibras contráctiles multinucleadas post-mitóticas que formarán el músculo esquelético. Dicho programa se lleva a cabo más de una vez y durante distintos estadios de desarrollo de un organismo (eg. embrión, feto, neonato y adulto) (Murphy & Kardon, 2011). Estas “ondas” miogénicas ocurren en momentos distintos entre especies y no son siempre comparables entre sí (Rossi & Messina, 2014). Por el interés de este trabajo, únicamente se mencionan las ondas miogénicas que forman los grupos musculares del tronco y extremidades, debido a que la miogénesis en músculos de la cara sigue procesos celulares y moleculares marcadamente distintos (Tzahor & Tzahor, 2015).

	Onda miogénica	Origen	Estructura formada	
	Embrionaria (primaria)	1a	DM epaxial/hipaxial	Miotomo
		2a	DM epaxial + miotomo	Músculos dorsales
			DM hipaxial	Músculos ventrales
			Células migratorias del DM hipaxial	Músculos de las extremidades y diafragma
Amniotas	Fetal (secundaria)	Mioblastos fetales Pax7+ de las somitas	Fibras secundarias (rápidas) en todos los grupos musculares	
	Neonatal/Adulta	Células troncales Pax7+ (Satélite) asociadas a las miofibras	Crecimiento (neonatal) y regeneración de miofibras dañadas (adulto)	
Anuros	Embrionaria (1ª)	MPS	Miotomo	
	Larvaria (2ª-3ª)	Somitas	DM + Miotomo epaxial/hipaxial	
		Mioblastos Pax7+ de las somitas	Crecimiento de los músculos del tronco/cola/extremidades	
	Adulta	Células Pax7+	Regeneración de miofibras dañadas (mioblastos ausentes durante la regeneración de la extremidad)	
Urodelos	Embrionaria	¿MPS?	Miotomo	
		Miotomo	Fibras lentas de las somitas	
		Miotomo central	Fibras rápidas de las somitas	
	Larvaria (pedomórfica)	Células troncales Pax7+ (<i>A. mexicanum</i> y <i>C. pyrrhogaster</i>) Desdiferenciación de miofibras (<i>N. viridescens</i>)	¿Crecimiento? Regeneración de la extremidad	
Adulta (metamórfica)	Células troncales Pax7+ (<i>A. mexicanum</i>) Desdiferenciación de miofibras (<i>N. viridescens</i> y <i>C. pyrrhogaster</i>)	Regeneración de la extremidad		
Peces teleosteos	Embrionaria (primaria)	Células adaxiales del MPS	Miotomo primario: fibras lentas y miocitos pioneros	
		Células somíticas laterales	Miotomo primario: fibras rápidas mediales	
	Larvaria (secundaria)	Capa celular externa (ECL), equivalente al DM	Miotomo maduro. Fibras rápidas en todo el cuerpo	
	Adulta	Células Pax7+ de la ECL	Regeneración de miofibras dañadas	

Tabla 1. Ondas miogénicas en Amniotas y Anamniotas. DM: Dermomiotomo. MPS: Mesodermo presomítico.

En amniotas existen cuatro ondas miogénicas: la primera onda miogénica embrionaria inicia en el dermomiotomo de las somitas y concluye con la formación del miotomo (**Tabla 1**). Una segunda onda miogénica embrionaria induce la maduración y crecimiento del miotomo, así como la formación de las fibras primarias (fibras lentas) de los músculos del tronco y las extremidades (**Tabla 1**). La tercera onda miogénica ocurre en estadios fetales, donde mioblastos fetales forman

fibras secundarias (fibras rápidas) alrededor de las primarias, induciendo el crecimiento de los grupos musculares en todo el cuerpo (**Tabla 1**). En estadios perinatales y adultos, las células troncales residentes Pax7+ reingresan al programa miogénico (cuarta onda) para promover el crecimiento muscular en organismos perinatales o la regeneración de miofibras dañadas en adultos (**Tabla 1**) (Comai & Tajbakhsh, 2014; Cossu & Biressi, 2005; Messina & Cossu, 2009; Murphy & Kardon, 2011; Rossi & Messina, 2014).

En los anfibios anuros, la primera onda miogénica incluye la diferenciación de células del mesodermo presomítico para formar el miotomo (**Tabla 1**). A diferencia de los amniotas, el dermomioto se forma después del miotomo durante la segunda onda miogénica (**Tabla 1**). Durante la tercera onda, posiblemente similar a la miogénesis fetal de amniotas, mioblastos Pax7+ en las somitas se expanden y participan en el crecimiento de los grupos musculares del tronco, cola y extremidades (**Tabla 1**). En adultos, igual que en amniotas, células troncales residentes Pax7+ pueden ingresar al programa miogénico para regenerar miofibras dañadas químicamente; no obstante, no son reclutadas al blastema y no pueden regenerar la musculatura perdida por una amputación (**Tabla 1**) (Della Gaspera et al., 2012; Sabillo, Ramirez, & Domingo, 2016; Satoh, Ide, & Tamura, 2005; Yamane & Nishikawa, 2013). Poco se sabe de las posibles ondas miogénicas en urodelos, fuera del contexto de regeneración de la extremidad. Similar a anuros, el miotomo se forma antes del dermomioto, sugiriendo que la primera onda miogénica que forma esta estructura se deriva de células del mesodermo presomítico (**Tabla 1**). En dos posibles ondas miogénicas embrionarias siguientes, las fibras lentas del miotomo se diferencian primero seguidas de las fibras rápidas, similar a la miogénesis fetal de amniotas (**Tabla 1**). No hay evidencia sobre miogénesis durante estadios premetamórficos, pero derivado de la evidencia de estudios de regeneración de la extremidad podemos suponer que, al igual que los amniotas, las células troncales Pax7+ son las responsables del crecimiento de la masa muscular en este estadio (**Tabla 1**). Como ya se describió, durante la regeneración de la extremidad en larvas premetamórficas y adultos metamórficos, tanto células Pax7+ y miofibras pueden proveer de mioblastos al blastema que, presuntivamente, seguirán el programa miogénico para regenerar la masa muscular perdida (**Tabla 1**) (Banfi et al., 2012; Milner & Cameron, 2013; Morrison et al., 2010, 2006; H. V. Tanaka et al., 2016).

En el caso de los peces teleósteos, la miogénesis primaria (embrionaria) finaliza con la formación del miotomo, antes de la formación del dermomioto como en anfibios, a partir de dos ondas; una primera de células del mesodermo presomítico (adaxiales) que formaran miocitos pioneros y fibras lentas en el miotomo primario, y una subsecuente donde células somíticas laterales forman fibras rápidas mediales en el miotomo (**Tabla 1**). La miogénesis secundaria (larvaria), equivalente a la miogénesis embrionaria de amniotas, incluye la migración y diferenciación de células de la capa externa de células de las somitas (ECL, equivalente al dermomioto amniota) generando fibras rápidas en el miotomo secundario y el resto del cuerpo (**Tabla 1**). A diferencia de anfibios y amniotas, la ECL (dermomioto) perdura en estadios post-larvarios, proveyendo de progenitores Pax7+ que participan en el crecimiento y regeneración de los músculos del cuerpo (**Tabla 1**) (Gurevich, Siegel, & Currie, 2014; Rossi & Messina, 2014; Tapan G. Pipalia, Jana Koth, Shukolpa D. Roy, Christina L. Hammond, 2016).

FACTORES REGULADORES MIOGÉNICOS (MRFS)

A pesar de que los programas miogénicos ocurren espacial y temporalmente separados, y estos pueden ser regulados por factores extrínsecos de manera diferente; por ejemplo, la miogénesis del tronco es promovida por las señales de las vías de Wnt, mientras que en la cabeza Wnt inhibe la miogénesis (Comai & Tajbakhsh, 2014); todas las iteraciones del programa miogénico están

estrictamente reguladas por los factores reguladores miogénicos (MRFs). En vertebrados existen cuatro MRFs: Myf5, MyoD, Mrf4 y MyoG. Se sabe que otros factores intrínsecos previos a los MRFs, como Pax3, Pax7, Pitx2 y Tbx1, también son importantes para que se lleve adecuadamente la miogénesis (Buckingham & Relaix, 2015; Comai & Tajbakhsh, 2014), no obstante, estos factores usualmente sólo marcan progenitores comprometidos al linaje muscular sin limitar su destino final. Por ejemplo, células Pax7+ derivadas del músculo esquelético pueden diferenciarse, bajo los estímulos adecuados, en otros tipos celulares de origen somítico como adipocitos y condrocitos (Morrison et al., 2006; Shefer & Yablonka-Reuveni, 2007), indicando que Pax7 no es suficiente para determinar las células al linaje muscular. Más aún, la importancia de dichos factores es contextual dependiendo del grupo de músculo que formarán, por ejemplo, en músculos del tronco, Pax3 marca progenitores mientras que en los músculos extraoculares y branquiales es Pitx2 (Comai & Tajbakhsh, 2014). Por otro lado, los MRFs irreversiblemente determinan y diferencian a los progenitores al linaje miogénico y son vitales en la miogénesis en todos los músculos del cuerpo (Moncaut et al., 2013).

Los MRFs son cuatro factores transcripcionales clase II de la familia bHLH, conformados por tres dominios: un dominio de transactivación N-terminal rico en histidinas y cisteínas (H/C), un dominio con una alfa-hélice anfipática C-terminal y una región central altamente conservada con el dominio bHLH. Mediante el último dominio, los MRFs heterodimerizan con las proteínas ubicuas "E" (HEB/HTF4, E2-2/ITF-2, E12 y E47) y reconocen la secuencia de las "cajas E" (CANNTG) en la región reguladora de los genes blanco. Dentro del mismo dominio, el motivo conservado AT-K (alanina-treonina en la región básica seguida de una lisina en la unión con la hélice I), o "código miogénico", distingue los MRFs de otros factores de la familia bHLH y les confiere la habilidad de activar genes músculo-específicos. Presuntamente, los cuatro MRFs evolucionaron a partir de dos rondas de duplicación de un gen ancestral y la variación en los dominios de transactivación N- y C-terminal les confirieron a cada MRF actividades en cierto grado distintas (Comai & Tajbakhsh, 2014).

Estudios de expresión, depleción y mutantes sencillos o combinados, realizados principalmente en ratón, han definido las relaciones jerárquicas entre los distintos MRFs y su actividad en la regulación del programa miogénico (Buckingham & Rigby, 2014; Comai & Tajbakhsh, 2014; Florian Bentzinger, Wang, & Rudnicki, 2012; Moncaut et al., 2013). Myf5 es el MRFs más temprano en el programa miogénico y, junto con MyoD y parcialmente con MRF4, es el encargado de la determinación de los progenitores al linaje muscular, generando mioblastos los cuales continúan expandiéndose (**Figura 2**). Posteriormente, MyoG y Mrf4, se encargan de la diferenciación terminal de los mioblastos al promover su salida del ciclo celular, su fusión y la inducción de la expresión de genes que codifican proteínas funcionales y estructurales esenciales para la función contráctil de las miofibras, generando así miofibras multinucleadas post-mitóticas (**Figura 2**). A pesar de que los MRFs y sus papeles en la regulación del programa miogénico están altamente conservados en vertebrados (Zhao, Yu, Huang, & Liu, 2014), existe poca evidencia de su participación durante la regeneración de la extremidad de urodelos.

HIPÓTESIS

Nosotros hipotetizamos que, similar a la miogénesis embrionaria/adulta, la determinación y diferenciación de los progenitores musculares en el blastema de la extremidad en regeneración de *A. mexicanum* son reguladas por los MRFs.

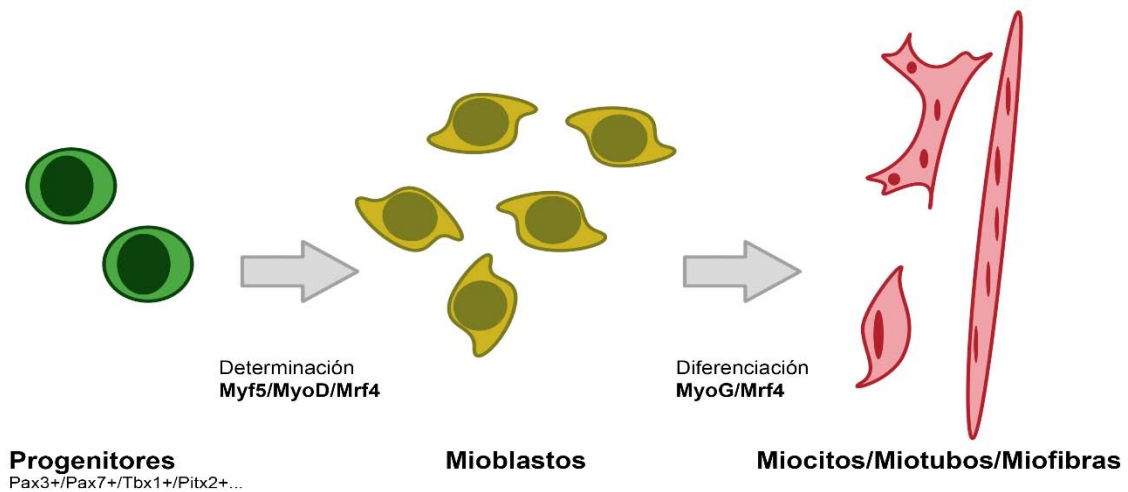


Figura 2. Modelo de la función de los MRFs durante la miogénesis.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El principal objetivo de este trabajo es determinar si los MRFs tienen un papel durante la regulación del estado de diferenciación de los progenitores musculares durante la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- i) Determinar el patrón de expresión de MRFs durante la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*, en momentos clave de la transición de los estados de diferenciación/indiferenciación de las células del blastema.
- ii) Determinar si es que los MRFs tienen las mismas funciones específicas presentadas en otros sistemas miogénicos, es decir, determinación o diferenciación; por lo que correlacionamos la expresión de los MRFs con el marcador de proliferación PCNA, para detectar mioblastos determinados en expansión, o el marcador de músculo diferenciado de anfibios 12/101, para detectar miocitos en diferenciación terminal.

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Todos los reactivos se compraron a JT Backer®, Merck o Sigma Aldrich®; a menos de que se especifique algo distinto.

ANIMALES Y CUIDADOS

A. mexicanum fueron obtenidos de criaderos particulares y de donaciones por parte del Dr. Luis Zambrano del Laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología. Las larvas recién eclosionadas se mantenían en una pecera de 10 L con agua filtrada y aireación constante y se les alimentó diariamente con nauplios de artemia hasta que llegaran a los 2 cm de talla. Animales de >2 cm de longitud se les mantuvo en recipientes individuales, para evitar canibalismo, y se les alimentó cada segundo día con artemia. Tanto la artemia como los quistes de artemia fueron obtenidos de comerciantes locales.

Para los análisis histológicos se utilizaron animales de 5-6 cm de talla (cola a hocico). Los animales fueron anestesiados en agua filtrada con “tricaina” (sal de etil 3-aminobenzoato metanosulfonato 0.05% p/v) hasta que no respondieran a estímulos mecánicos. Después, fueron colocados en cajas Petri con una esponja humedecida con agua filtrada, azul de metileno y acriflavina (concentraciones recomendadas por el proveedor “AZUL”). Bajo un estereoscopio (Stemi DV4 Zeiss) se realizaron las amputaciones usando tijeras y pinzas de microcirugía esterilizadas con etanol 70%. Las amputaciones se realizaron en las extremidades posteriores a la altura media del zeugópodo (a la mitad de la tibia-fíbula), asegurándose de dejar una superficie de corte regular al recortar el hueso protruyente. Después, se regresaron los animales a sus recipientes correspondientes con agua limpia.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL CONTIG107219 (MYOG)

Se realizó un tBLASTn usando la secuencia proteínica de *X. laevis* (NP_001079199.1) de MYOG contra la base de datos “*A. mexicanum* assembly V3.0” del Sal-site (www.ambystoma.org) tomando el contig con una mayor homología. Se realizó un alineamiento múltiple del Contig107219 con las secuencias nucleotídicas de MyoG de distintas especies (*X. laevis* NM_001085730.1; *X. tropicalis* NM_001016725.2; *H. sapiens* NM_002479.5; *M. musculus* NM_031189.2; *G. gallus* NM_204184.1). También se realizó un alineamiento múltiple del ORF predicho del contig107219 con las secuencias amino acídicas de distintos MRFs de varios taxones (*H. sapiens*: MYOD CAA40000.1, MYF5 NP_005584.2, MRF4 NP_002460.1, MYOG EAW91464.1; *X. laevis*: MYOD AAA49900.1, MYF5 NP_001095249.1, MRF4 NP_001088572.1, MYOG NP_001079199.1; *X. tropicalis*: MYOG CAJ82458.1; *D. rerio*: MYOD CAA85407.1, MYF5 AAH90762.1, MRF4 NP_001003982.1, MYOG AAH78421.1; *N. viridescens*: MYF5 Q91154.1, MRF4 CAA58043.1; *A. mexicanum*: MYF5 ACK57790.1, MRF4 ADZ28330.1; *G. gallus*: MYOG NP_989515.1; *M. musculus*: MYOG NP_112466.1). Todos los alineamientos se realizaron con el software “Seaview” (Gouy, Guindon, & Gascuel, 2010) y la “blastp suite” del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Para generar el árbol filogenético se realizó un análisis de selección de matriz de evolución proteica más adecuada usando el servidor “PROTtest” (<http://darwin.uvigo.es/>) y se visualizó usando el software “FigTree” (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

CLONACIÓN DE MRFs

Fragmentos de los mensajeros de los MRFs fueron clonados a partir de cDNA de blastema de *A. mexicanum*. Brevemente, blastemas (~7 dpa) fueron colectados y se extrajo el RNA total con TRIzol® (Thermofisher 15596-026) según las instrucciones del fabricante. El cDNA de los mRNAs se sintetizó usando un oligo dT (Roche 11483188001) según instrucciones del proveedor. Los fragmentos de los MRFs se amplificaron por PCR (Thermofisher 10342-020) usando los siguientes oligos (Sigma-aldrich): AmexMyf5Fw: 5'-aagaaggtcaacagcgcctt (Tm: 67°C); AmexMyf5Rv: 5'-tgggactccaggctaataatgga (Tm: 67°C); AmexMrf4Fw: 5'-gcgctcaagaagatcaacg (Tm: 67°C); AmexMrf4Rv: 5'-gcaccgtccttcgggttaat (Tm: 67°C); AmexMyoGFw: 5'-cggctgaagaaggtgaacga (Tm:

67°C); AmexMyoGRv: 5'-ccagtgggttgatcagc (Tm: 67°C). Se corroboró mediante electroforesis en gel la presencia de un solo producto y se ligó al vector pGEM®-T easy (Promega A137A) según instrucciones del proveedor. Se transformaron bacterias termocompetentes con el vector ligado mediante un choque térmico (42°C por 1min) y se sembraron en cajas de medio LB con ampicilina, Xgal e IPTG. Clonas negativas a beta-galactosidasa fueron amplificadas y se purificó el plásmido según instrucciones del proveedor (Qiagen 12125). La presencia del fragmento ligado fue corroborada por digestión con la enzima EcoR1 (New England BioLabs R0101S) y electroforesis en gel. La orientación del fragmento fue determinada por secuenciación (Unidad del Instituto de Investigaciones Biomédicas).

TRANSCRIPCIÓN DE RIBOSONDAS

Los plásmidos con los fragmentos de los MRFs fueron amplificados en cultivos de bacterias competentes y se purificaron según instrucciones del proveedor (Qiagen 12165). Se linearizaron usando las enzimas de restricción (NcoI/SpeI New England BioLabs R0193S/ R0133S) dependiendo del sentido a transcribir. Se transcribieron las ribosondas usando la RNA polimerasa que correspondiera al sentido de la sonda (SP6/T7 Promega P1085/P2075) usando Digoxigenin-11-dUTP (Roche 11093088910) para marcar las sondas. Posteriormente se degradó el DNA (DNase Promega M6101) y se precipitó la sonda con etanol. La presencia de la ribosonda fue confirmada por electroforesis en gel.

HISTOLOGÍA

Todos los lavados e incubaciones se realizaron a temperatura ambiente a menos de que se especifique algo distinto. Muestras de muñones al d3, d5, d7 o d14 fueron recolectadas y lavadas por 15 min en agitación con buffer de fosfatos "PBS" [NaCl 0.8% p/v; KCl 0.02% p/v; Na₂HPO₄ 0.144% p/v y KH₂PO₄ 0.024% p/v a pH7.4]. Posteriormente se fijaron con "PFA" (paraformaldehído [4% (p/v)] y NaOH [0.6mM] en PBS) a 4°C toda la noche. Posteriormente, se deshidrató el tejido con lavados de 15 min con diluciones crecientes de etanol en PBS [25-50-75-100% etanol] y se almacenó a -20°C. Después, las muestras fueron lavadas dos veces por 15 min con Xilenos seguidos de una incubación con Xilenos y Paraplast® [1:1] a >55°C toda la noche. Se hicieron dos lavados de una hora con Paraplast® puro a >55°C, se montaron las muestras en bloques para histología y se almacenaron a -20°C. Los cortes histológicos de ~14 micrones se realizaron con un microtomo (Leica RM2235) y se colocaron en laminillas tratadas con (3-Aminopropyl) triethoxysilane (TESPA) sobre una plancha a 37°C durante toda la noche, posteriormente se colocaron en una cámara de vacío por ~6 horas antes de almacenarlas a 4°C. Las laminillas se prepararon con lavados de 1 min de HCl [10%] en etanol [70%], agua desionizada, etanol [96%], TESP A [4% en acetona], dos de acetona y tres más de agua desionizada.

Para el ensayo de desdiferenciación *in vivo*, muestras a las 2 horas y a los 2 días post-trasplante fueron recolectadas y fijadas toda la noche a 4°C en PFA 4%. Las muestras se lavaron con PBS y se hicieron lavados de 12 horas con Sacarosa 10 y 20% en PBS y uno de 24 horas con Sacarosa 30% en PBS. Después, se incubaron por 1 hora en Tissuetek®-Sacarosa 30% [1:1] y luego Tissuetek® solo. Las muestras se montaron en capsulas (Beem® 130) con Tissuetek® y se congelaron sobre hielo seco. Las muestras se conservaron a -70°C. Se realizaron cortes histológicos de 50 micrones de grosor en criostato (Slee MEV) y se estiraron sobre laminillas cubiertas con gelatina. Se dejaron por ca. 6 horas en vacío y se almacenaron a -20°C. Las inmunofluorescencias se realizaron igual que en los cortes en parafina, obviando los pasos de

desparafinación y rehidratación, y realizando todos los pasos en oscuridad para evitar el blanqueo del Celltracker® (ver sección de Inmunofluorescencia acoplada a ISH).

HIBRIDACIÓN IN SITU (ISH)

Los cortes fueron desparafinados en una plancha a 60°C por una hora. Se lavaron por 5 min dos veces con Xilenos y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de etanol (100-75-50-25-0% etanol en agua tratada con DEPC). El tejido se permeabilizó con tres lavados de 10 min con "PBT-DEPC" (Tween-20 [0.1% v/v en PBS-DEPC]) seguido de un lavado de 15 min de Proteínasa K [1µg/ml en PBT-DEPC]. Después, se lavaron por 5 min con Glicina [2mg/ml en PBT-DEPC], 5 min con PBT-DEPC, 20 min con PFA y otros 5 min con PBT-DEPC. Las laminillas se colocaron en una cámara de hibridación húmeda y se incubaron con 0.25ml de la ribosonda correspondiente en buffer de hibridación [Ribosonda 10µg/ml, Formamida 50% v/v, Dextran 10% p/v, 5X SSC, Tween-20 0.1% v/v, yeast RNA 0.1% p/v, Heparina 100µg/ml, 1X Denhardt's, CHAPS 0.1% p/v y EDTA 5mM] a 60°C por ~20 horas. Posteriormente, se quitó el exceso de ribosonda con un lavado de una hora, seguido de dos lavados de 30 min con la solución 1 [Formamida 50% v/v, 5X SSC, Tween-20 0.1%] y dos lavados de 30 min con la solución 2 [Formamida 50% v/v, 2X SSC, Tween-20 0.1%] a 60°C. Después, se lavaron por 20 min con MABuffer [Ácido maleico 100 mM, NaCl 150mM, Tween-20 0.1% a pH 7.5], se bloquearon con solución de bloqueo [MABuffer, suero de chivo 10% p/v] y se incubaron con el anticuerpo contra digoxigenina acoplado a la fosfatasa alcalina [1:500 en solución de bloqueo] a 4°C toda la noche. Después, se hicieron 5 lavados de 10 min con MABuffer y dos con NTMT [NaCl 0.1M, Tris 0.1M pH9.5, MgCl₂ 0.05M y Tween-20 0.1% v/v], se incubaron con el revelador "BM-Purple" (Roche 11442074001) en oscuridad hasta que la marca fuera visible. Posteriormente, se detuvo la reacción con tres lavados de 15 min con PBS-EDTA [PBS, EDTA 1mM] y se montaron con "Immunohistomount". Las muestras fueron visualizadas y fotografiadas con un microscopio invertido (Olympus IX71).

INMUNOFLUORESCENCIA ACOPLADA A ISH (ISHIF)

Muestras histológicas fueron procesadas para la ISH de igual manera hasta el paso de paro de la reacción de la fosfatasa alcalina con PBS-EDTA. Después, se lavaron por 5 min con agua milliQ y se colocaron en la cámara de hibridación húmeda con 0.3 ml de "Immunoretriever" 1X (Bio BC) a 65°C por 40 min. Después, se dejaron atemperar por 5 min y se lavaron dos veces por 5 min con PBS. Posteriormente, se incubaron con solución de bloqueo [PBT, BSA 1% p/v] por 45 min. Después, se incubaron con el anticuerpo primario en solución de bloqueo a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron 3 veces por 5 min con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario en PBS por dos horas. Se volvieron a lavar 3 veces por 5 min con PBS y se incubaron con CuSO₄ fresco [CuSO₄ 1mM en CH₃COONH₄ 50mM a pH 5] por 20 min. Se lavaron por 5 min con agua milliQ, PBS, DAPI [2µg/ml] y agua milliQ. Finalmente se montaron con el medio de montaje para fluorescencia (DAKO S302380) y se visualizaron y fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51WI). La microscopía confocal se realizó en un microscopio confocal Zeiss LSM 5 pascal (Zeiss). Los anticuerpos utilizados fueron 12/101 (mouse IgG1 [1:250]) del DSHB (Iowa University), anti-PCNA (rabbit IgG [1:250]) de Santa Cruz (FL-261), anti-PCNA (mouse IgG [1:250]) de Santa Cruz (Sc-56), Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG [1:250] y conjugado Cy3 goat anti-rabbit [1:1000] (ThermoFisher A-11001 y A10520).

TUNEL

La tinción de TUNEL fue realizada según el protocolo del proveedor (Promega G3250). Controles negativos, sin la enzima rTdT, y positivos, con un tratamiento con DNasa I, fueron incluidos.

DISOCIACIÓN MIOFIBRAS

Por cada ensayo de desdiferenciación *in vivo*, 3 animales de 9 cm de longitud fueron anestesiados (tricaina 0.05%) y se desinfectaron por 2 min con 25ml de agua de filtro esterilizada con azul de metileno y acriflavina (doble de la concentración recomendada por el fabricante "AZUL") seguido de tres lavados con agua de filtro esterilizada. Los animales fueron colocados en cajas de cultivo de 100 mm con agua de filtro estéril y se colocaron bajo el estereoscopio dentro de la campana de flujo lateral, previamente limpiado con etanol 70%. Todo el material quirúrgico era mantenido en etanol al 70% y benzal hasta su uso. Las cuatro extremidades fueron amputadas a nivel del torso y transferidas a AxPBSGent (PBS ajustado a la osmolaridad de anfibios [PBS al 80% en agua bidestilada], gentamicina 200µg/ml). Posteriormente, se retiró la piel de las extremidades realizando un corte longitudinal en la piel ventral desde la zona de amputación a la base del autópodo usando unas microtijeras. La piel fue gentilmente separada del músculo metiendo una pinza entre los tejidos a la altura del autópodo y moviéndola hasta la base de la extremidad. Una vez separada la piel del zeugópodo y estilópodo, se jaló la piel en dirección a los dígitos removiéndola como un guante, asegurándose de remover cualquier resto de piel o garras que pudieran contaminar el cultivo. Las extremidades sin piel fueron transferidas a AxL-15-FBS (Medio L-15 80% en agua milliQ estéril, suero fetal bovino 10%). Después, fueron lavadas por 1 min en AxL-15-FBS/AxPBS [1:1] y luego en AxPBS. Se colocaron las extremidades en medio de disociación (D-glucosa 1.35mg/ml, BSA fracción V 2.7mg/ml, Dispasa II 5.05mg/ml, Colagenasa IA 0.63mg/ml, DNasa I 6.3 µg/ml, BDM 22µM; esterilizar por filtración y colocar 2 ml en viales de cristal esterilizados por luz UV y mantener en hielo) y se incubaron en agitación (90-120 rpm) a 26°C por 90 min haciendo maceraciones mecánicas leves cada 30 min con pipetas con puntas de plástico de 1 ml recortadas para evitar dañar las miofibras. Posteriormente, se transfirió el contenido de los viales por un tamiz de 40 micrones. Los viales se lavaron con AxPBS y se volvió a pasar el contenido por el tamiz. Se lavó el tamiz con 3 mL de AxL-15-FBS y se sumergió en una caja de 35 mm con AxL-15. La suspensión se transfirió a cajas de 35 mm con 25 µM de Celltracker® Red (Thermo fisher C34552). Se mezcló suavemente y se transfirió el contenido a tubos de 15 ml y se incubaron por 30 min a 25°C. Después, se agregaron 7 ml de AxL-15-FBS y se centrifugaron por 10 min a 500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con otros 7 ml de AxL-15-FBS. Se volvieron a centrifugar, eliminar el sobrenadante, se concentraron en 5 ml de AxL-15-FBS y se diluyeron en cajas de 60 mm con AxL-15 [1:7] a un volumen final de 3 ml. El marcaje fue corroborado con el microscopio de epifluorescencia y se mantuvieron en la incubadora a 25°C hasta que fueran trasplantadas ese mismo día.

TRANSPLANTE DE MIOFIBRAS

Animales al d4 fueron anestesiados y se colocaron en sanitas húmedas con agua de filtro con acriflavina y azul de metileno bajo el estereoscopio. Usando micromanipuladores (world precision instruments inc.) y un microinyector (Eppendorf® CellTram® oil vario) con capilares (10 micrones de grosor), se recolectaron de 4-6 miofibras individuales bajo un microscopio invertido. Usando un arpón de tungsteno, se realizó una punción dorsolateral cerca al epitelio de herida de las extremidades en regeneración. Se introdujo el capilar en la punción en ángulo (ca. 135 °) con respecto a la extremidad y en dirección hacia el ápice del muñón. Se inyectó lentamente el contenido del capilar y se dejó por 30 segundos dentro de la extremidad antes de sacarlo para evitar que se salieran las miofibras. El mismo procedimiento se realizó en la extremidad

contralateral. Posteriormente, los animales se dejaron recuperar envueltos en sanitas húmedas en frío por 1 hora, antes de transferirlos a sus recipientes con agua limpia.

PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Todas las imágenes fueron analizadas usando el software ImageJ (<http://imagej.net/>) o LSM Image Browser (Zeiss) y todas las figuras fueron hechas con Photoshop CS5 (Adobe).

RESULTADOS

CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE LOS MRFS DE *AMBYSTOMA MEXICANUM*

Clonamos fragmentos de los mRNAs de los MRFs de *Ambystoma mexicanum* (Tabla 2). Debido a que la secuencia de MyoG no se encuentra reportada, realizamos un tBLASTn de la secuencia proteínica de MyoG de *Xenopus laevis* contra la base de datos nucleotídica del Sal-site (www.ambystoma.org), obteniendo la secuencia del contig107219 con una mayor identidad. Comparando la secuencia del contig con las secuencias de MyoG de otros vertebrados (Figura 3 A), observamos una identidad significativa con las secuencias de *Gallus gallus* (73%, e-value 5e-69); *Homo sapiens* (74%, e-value 7e-67); *Mus musculus* (72%, e-value 1e-57); *Xenopus tropicalis* (68%, e-value 3e-33) y *Xenopus laevis* (68%, e-value 2e-29). Para tener una mayor certeza de que la secuencia del contig realmente es MyoG y no una región conservada con otro MRF, realizamos un análisis filogenético de la secuencia putativa de amino ácidos traducida del contig107219 junto a las secuencias amino acídicas de distintos MRFs de diversos taxones (Figura 3 B). El alineamiento múltiple de las secuencias mostró una mayor identidad (>60%) con las secuencias de MyoG de *G. gallus* (72%, e-value 3e-54), *X. laevis* (71%, e-value 2e-50), *X. tropicalis* (70%, e-value 5e-50), *H. sapiens* (70%, e-value 1e-60) y *M. musculus* (67%, e-value 4e-59); con una cobertura de la secuencia traducida del contig107219 mayor al 90% y un score mayor a 150. Mientras que las secuencias de otros MRFs tenían un score, valor de cobertura y de identidad menores. En conjunto, determinamos que el contig107219 es la secuencia de MyoG en *A. mexicanum* y en adelante se referirá sólo como MyoG. No pudimos identificar ninguna secuencia en la base de datos del Sal-site que tuviera una homología significativa con la secuencia de MyoD de *X. laevis*, por lo que no se clonó este gen.

MRF	FRAGMENTO	REFERENCIA	% IDENTIDAD	VALOR E
MYF5	431 pb	ID:gb FJ481985.1	99% (428/431)	0
MRF4	303 pb	ID:gb JF346170.1	100% (303/303)	2e-156
MYOG	417 pb	Sal-site EST database: contig-107219	99% (413/418)	0

Tabla 2. MRFs de *A. mexicanum* clonados en este trabajo.

PATRÓN DE EXPRESIÓN DE MRFS DURANTE LA REGENERACIÓN

El patrón de expresión de los MRFs clonados se evaluó mediante hibridación *in situ* (ISH) en cortes histológicos de extremidades a distintos tiempos durante la regeneración (Figura 4). Al día post-amputación 3 (d3) el cierre de la herida terminó y la desdiferenciación del tejido adyacente a la amputación presuntamente está iniciando sin observarse aún la acumulación de células mesenquimales en el ápice del muñón (Figura 4 A, F, K y recuadros). Al d5 se observa la presencia de células mesenquimales entre el epitelio de herida y el tejido adulto (eg. hueso y músculo) sin que se observe aún un blastema como tal (Figura 4 B, G, L y recuadros). Para el d7 se observa una

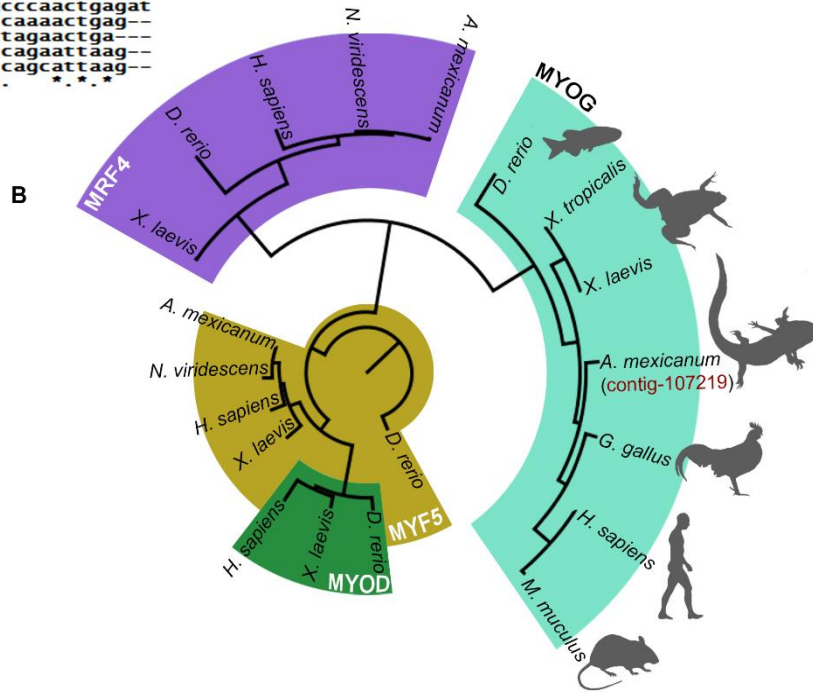
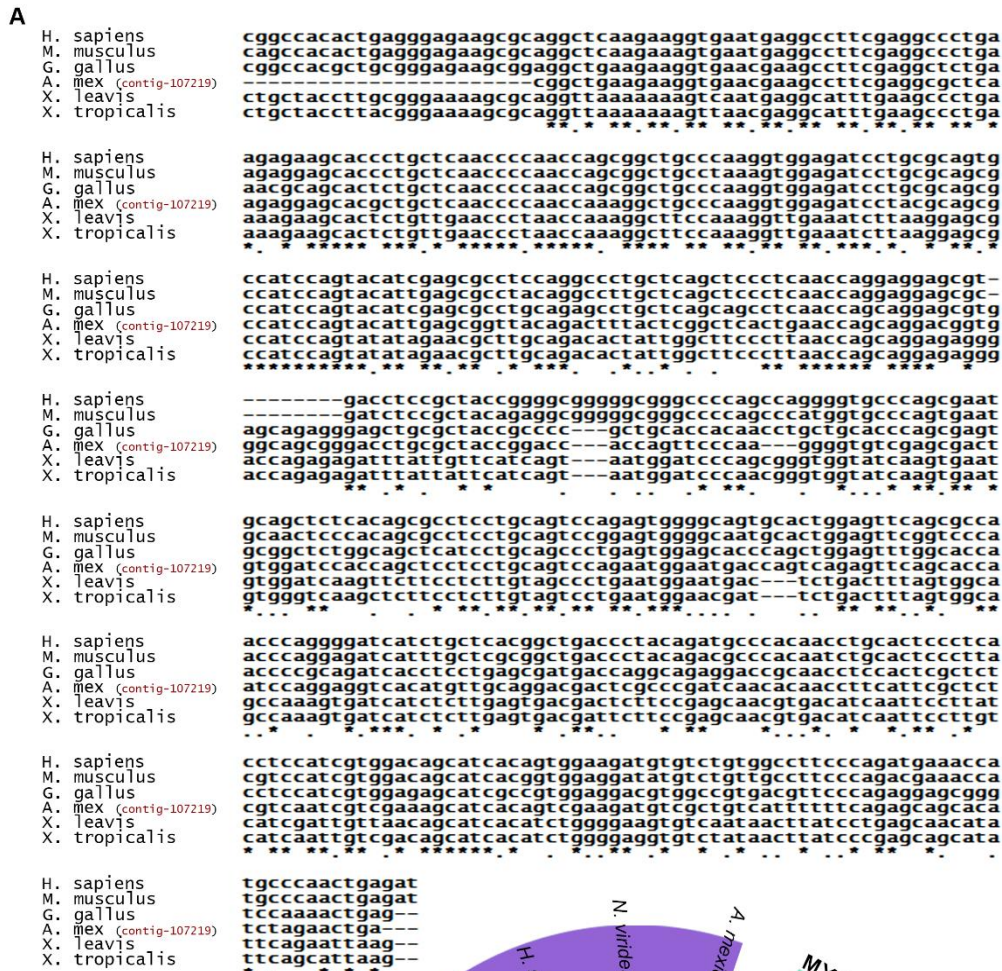


Figura 3. Análisis filogenético del contig-107219 (MyoG): Alineación de las secuencias de nucleótidos de los ESTs del gen MyoG de distintas especies de vertebrados y el contig-107219 del SAL-Site (A). Árbol filogenético de las secuencias de amino ácidos de los MRFs de distintas especies de vertebrados incluyendo la secuencia traducida del contig-107219 (B).

mayor cantidad de células en el blastema (**Figura 4 C, H, M y recuadros**) mientras que para el d14 la rediferenciación de las células del blastema es evidente al observar la compactación de condrocitos que moldean los dedos en regeneración (**Figura 4 D, I, N y recuadros**). De esta manera los tiempos elegidos reflejan momentos clave durante los estadios de regeneración; fin del cerrado de la herida y comienzo de la desdiferenciación al d3, desdiferenciación tardía e inicio de la formación del blastema al d5, crecimiento del blastema al d7 y rediferenciación al d14; dichos tiempos nos darán indicios de la participación y posible función de los MRFs durante la regeneración.

La marca producida con la sonda contra *MyoG* fue constante durante todos los tiempos evaluados y en distintos tejidos (**Figura 4 A-D**). Al d3 es evidente la expresión en las fibras musculares, así como en todo el epitelio y en algunas células asociadas al epitelio (**Figura 4 A y recuadro**). Al d5 la expresión se mantiene en las fibras musculares y el epitelio, notablemente la intensidad de la marca en las fibras musculares es mayor en el ápice donde presuntivamente las fibras musculares fueron dañadas por la amputación (**Figura 4 B y recuadro**). El patrón se conserva al d7 y d14 mostrando marca en el epitelio, fibras musculares y con mayor intensidad cerca del sitio de amputación (**Figura 4 C-D y recuadros**), es de notar que las células mesenquimales que forman el blastema durante el d7 también fueron positivas a la marca de la sonda contra *MyoG* y para el d14 la expresión se limitó a parches entre el epitelio y las condensaciones condrogénicas de los dígitos (**Figura 8 C**).

A diferencia de *MyoG*, la expresión de *Myf5* no es constante en todos los tiempos evaluados (**Figura 4 F-I**). Al d3 se observa marca únicamente en el epitelio, la cual permanece en todos los tiempos evaluados, pero no así en músculo (**Figura 4 F y recuadro**). Para el d5 y d7 las células mesenquimales que se acumulan en el ápice del muñón y que forman el blastema muestran una clara marca de expresión de *Myf5* (**Figura 4 G-H y recuadros**) mientras que para el d14 la expresión se limitó a parches de células que delimitan las condensaciones condrogénicas de los dígitos (**Figura 4 I y recuadro**).

Por otra parte, no pudimos observar marca con la sonda contra *Mrf4* en ninguno de los tiempos evaluados (**Figura 4 K-N y recuadros**). De igual manera no se observaron marcas específicas usando las sondas sentido contra los tres factores aquí evaluados (**Figura 4 E, J y O**).

PROGENITORES MYOG+ Y MYF5+ DEJAN DE EXPRESAR EL MARCADOR DE MÚSCULO 12/101 Y REINGRESAN AL CICLO CELULAR

Para determinar si es que la expresión de *MyoG* se limita únicamente en las fibras musculares, realizamos una inmunofluorescencia usando el anticuerpo 12/101, el cual reconoce específicamente músculo diferenciado en anfibios, acoplada a la ISH (ISHIF) contra *MyoG* en los mismos tiempos evaluados previamente (**Figura 5**). Como era de esperarse, en los d3, d5 y d7, únicamente se observa la marca de 12/101 en las fibras musculares y no en el mesénquima (**Figura 5 A-C y Figura 6 A-B**). Para el d14 se observó la expresión de 12/101 en parches poco definidos de condensaciones celulares más distales al sitio de la amputación (**Figura 5 D y Figura 6 C**), las cuales presuponemos son las nuevas fibras musculares en rediferenciación. Similar a las observaciones previas, observamos una marca de *MyoG* más intensa en los límites apicales de las fibras musculares (marcadas con 12/101) en la primera semana después de la amputación (**Figura 5 A-C, cabezas de flecha**) a comparación del resto de la fibra muscular. De manera interesante, observamos que las células mesenquimales que expresan *MyoG* cercanas a las fibras musculares no expresan 12/101 durante la primera semana (**Figura 5 A-C, flechas**). Para el d14 algunos

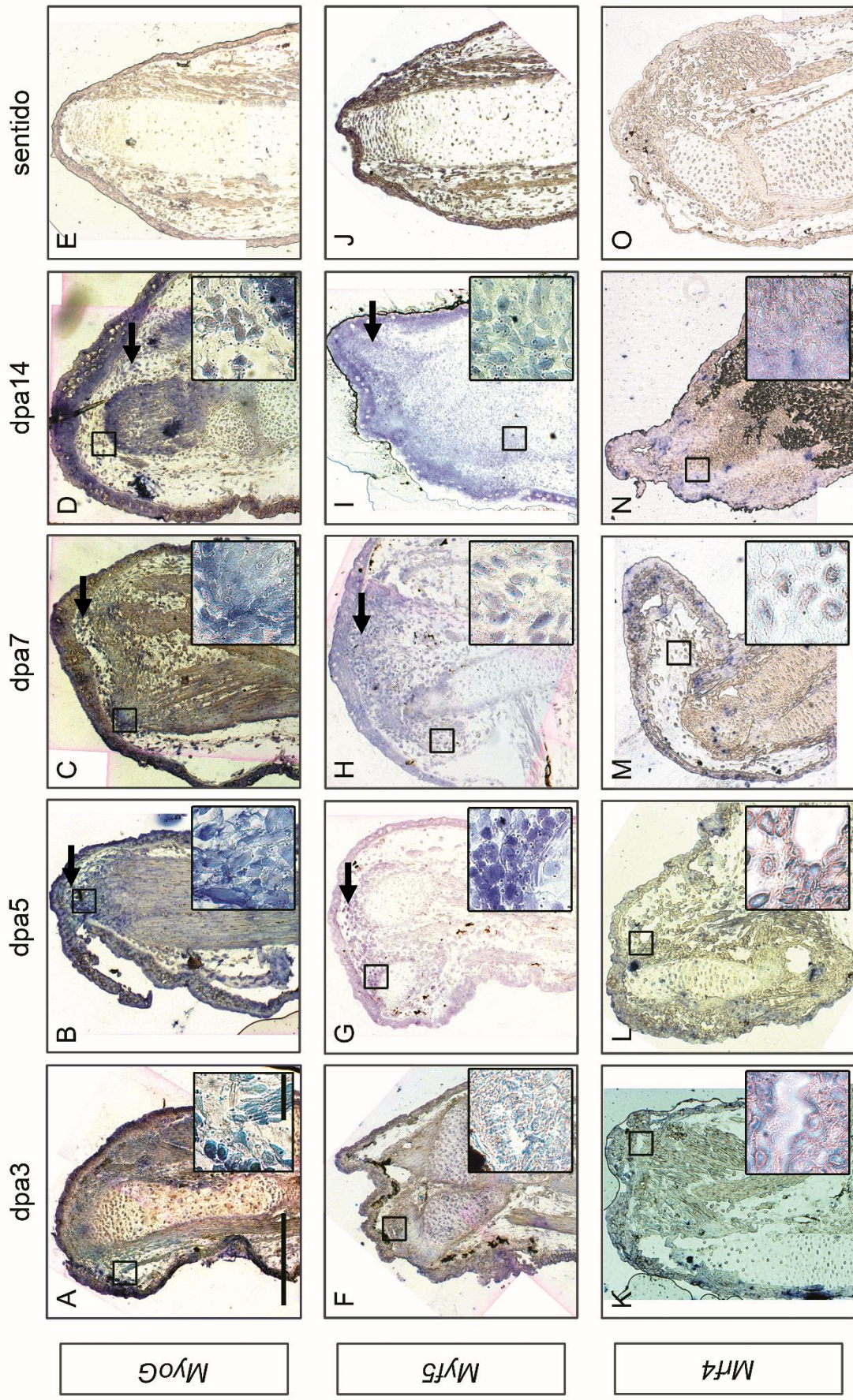


Figura 4. Patrón de expresión de los MRFs: MyoG (A-D), Myf5 (F-I) y Mrf4 (K-N) en extremidades en regeneración a los tiempos d3 (A, F y K), d5 (B, G y L), d7 (C, H y M) y d14 (D, I y N). Los recuadros internos muestran aumentos en regiones de relevancia marcados sobre las muestras. Las flechas indican células de apariencia mesenquimática. Escalas en A y su recuadro representan 500 y 50 micrones respectivamente, éstas son equivalentes para todas las figuras. Sondas sentido de los mensajeros de MyoG (E), Myf5 (J) y Mrf4 (O) se usaron como controles.

parches de expresión de MyoG se sobrelapan con la expresión de 12/101 en el presuntivo músculo en rediferenciación (**Figura 5 D**). En conjunto, estos resultados muestran que la expresión de MyoG aumenta tanto en las fibras dañadas, como en los progenitores musculares indiferenciados y su expresión se mantiene hasta estadios más tardíos de la regeneración, cuando la formación de las nuevas fibras ya ha comenzado.

Después comparamos los patrones de expresión de Myf5 y 12/101 (**Figura 6**) a partir del d5, cuando se empieza a detectar la expresión de Myf5. Durante los d5 y d7, cuando el blastema se está formando, las células positivas a Myf5, aunque cercanas a las fibras musculares, no expresan 12/101 (**Figura 6 A-B, flechas**). Para el d14, durante la rediferenciación, se observó que algunas células dentro de los parches de expresión de Myf5 expresan 12/101 (**Figura 6 C, flechas y cabezas de flecha**). Esto sugiere que Myf5 es predominantemente expresado en progenitores musculares durante las etapas de formación del blastema y estos retienen su expresión hasta ya comenzada la rediferenciación del músculo.

Ya que la expresión de Myf5 se limita a progenitores en estadios en los que hay una activa proliferación celular, quisimos determinar si es que las células Myf5+ se encuentran proliferando. Para esto comparamos mediante ISHIF la expresión de Myf5 con la del marcador de proliferación celular PCNA (**Figura 7**). Como era esperado, al d5 se ve una limitada expresión de PCNA (**Figura 7 A y Figura 8 A**) la cual aumenta considerablemente para el d7 (**Figura 7 B y Figura 8 B**) y se mantiene predominantemente en el mesénquima al d14 (**Figura 7 C y Figura 8 C**). Curiosamente, pudimos observar en algunos casos la expresión de PCNA en zonas más proximales, cercanas al sitio donde se amputó para recolectar la muestra (**Figura 8 A-C**). Asumimos, ya que los controles sin el anticuerpo primario no mostraron estas marcas (no mostrado), que esto podría ser una respuesta inmediata después de la amputación y previa a la fijación del tejido. De manera interesante, observamos que en todos los tiempos analizados algunas células Myf5+ también expresan PCNA (**7 a, b y c, flechas y cabezas de flecha**). También se observaron núcleos positivos a PCNA en fibras musculares lejanas al sitio de amputación que eran Myf5- (**Figura 7 b' y c', flechas y cabezas de flecha**). Esto sugiere que *Myf5* pudiera estar marcando una población de progenitores musculares que se encuentran en expansión, aunque la expresión de este marcador no es necesaria para el reingreso al ciclo celular, ya que las fibras musculares Myf5- también pueden reingresar.

Después, quisimos observar si los progenitores musculares MyoG+ también se encuentran ciclando activamente (**Figura 8**). Similar a los progenitores Myf5+, pudimos observar células mesenquimales en los tres tiempos evaluados que expresan PCNA (**Figura 8 a, b y c, flechas**). De igual manera, fibras musculares positivas a *MyoG* también contienen núcleos marcados con PCNA. No obstante, no podemos descartar que estos núcleos sean de células troncales residentes PAX7+ (**Figura 8 a', b' y c', flechas**). Estos resultados sugieren que la expresión del marcador de diferenciación muscular MyoG no impide el reingreso al ciclo celular, ya sean a progenitores en el blastema o a miofibras musculares.

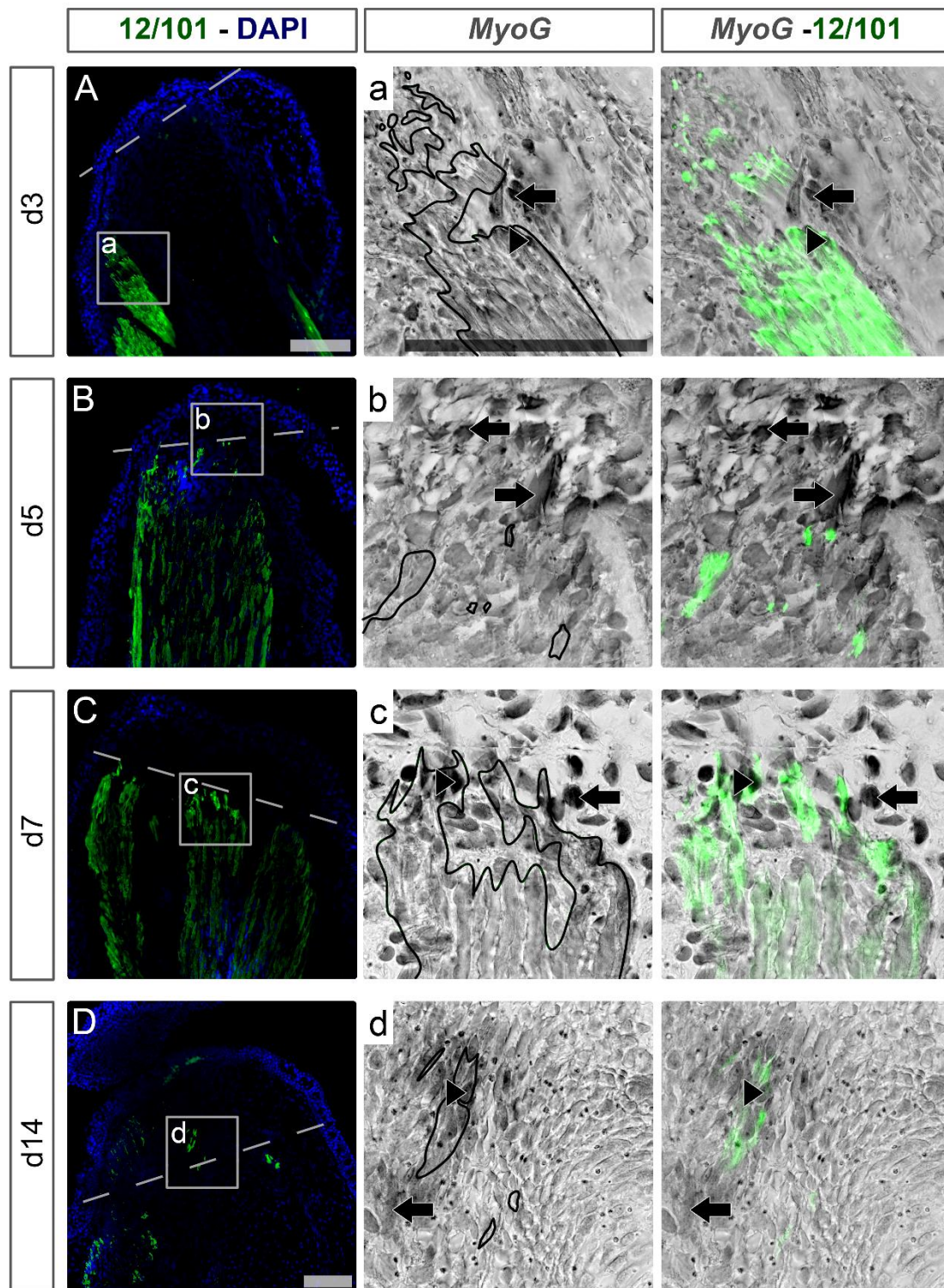


Figura 5. ISHIF contra MyoG y 12/101 al d3 (A), d5 (B), d7 (C) y d14 (D). Las líneas punteadas (A-D) marcan el sitio de amputación. Los recuadros (A-D) marcan el campo de las imágenes de mayor aumento (a-d). El delineado en la segunda columna delimita la expresión de 12/101. Las cabezas de flecha marcan células MyoG+ dentro de las miofibras (12/101+). Las flechas marcan células MyoG+ fuera de las miofibras (12/101-). Escala en "A" es igual para "B" y "C"; y "a" es igual para "b-d". Las escalas en "A", "a" y "D" son equivalentes a 200 micrones.

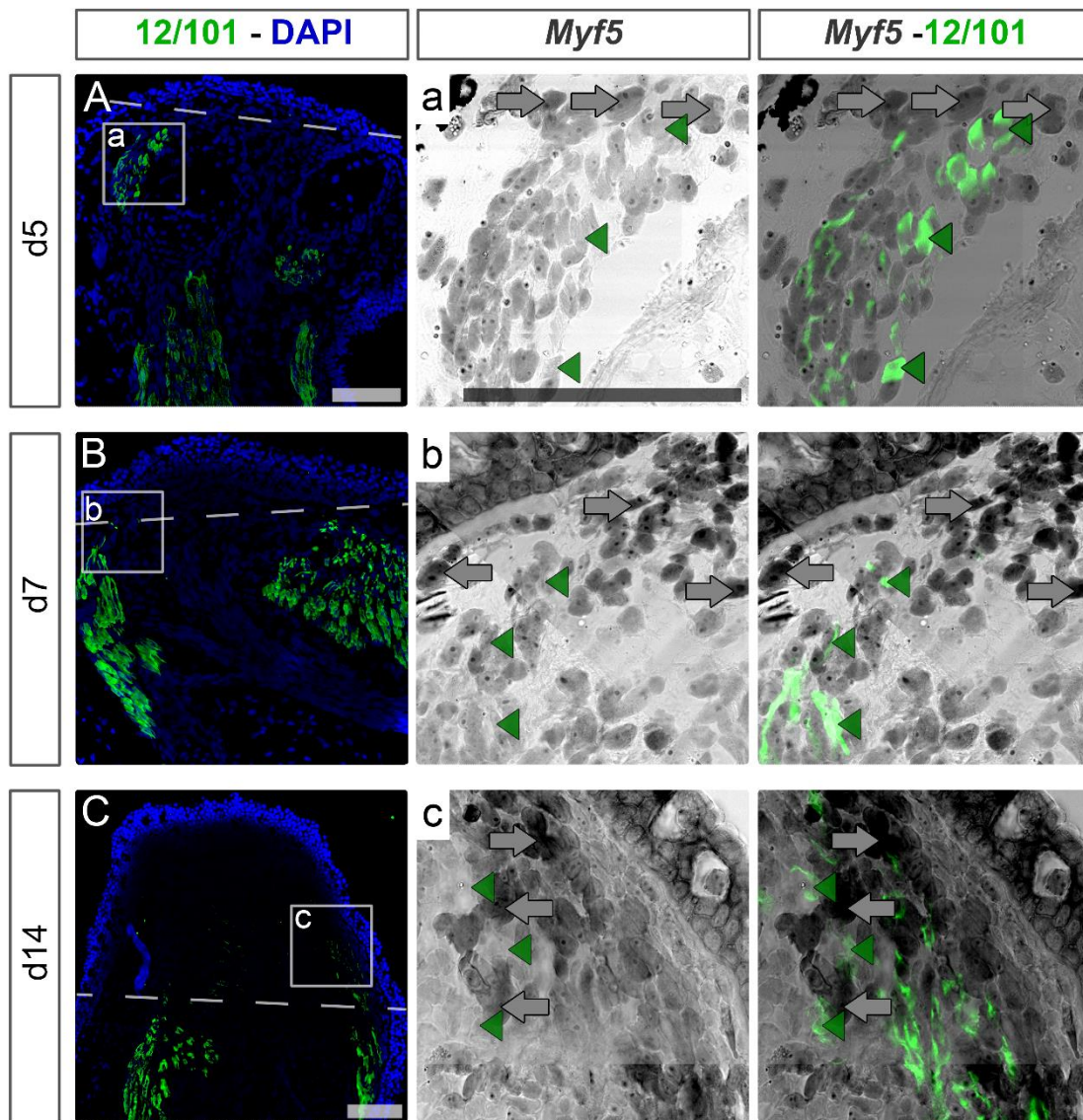


Figura 6. ISHIF contra Myf5 y el marcador de músculo 12/101 al d5 (A), d7 (B) y d14 (C). Las líneas punteadas (A-C) marcan el sitio de amputación. Los recuadros (A-C) marcan el campo de las imágenes de mayor aumento (a-c). Las cabezas de flecha marcan células 12/101+. Las flechas marcan células Myf5+. La escala en "A" es igual para "B"; y "a" es igual para "b-c". Las escalas en "A", "a" y "C" son equivalentes a 200 micrones.

EVIDENCIA DE DESDIFERENCIACIÓN DE MIOFIBRAS DE *A. mexicanum*

Para determinar si es que los núcleos PCNA+ en las fibras musculares son realmente parte del sincicio y no posibles células troncales residentes Pax7+, realizamos un doble marcaje contra 12/101 y PCNA al d6 y realizamos una reconstrucción tridimensional de cortes ópticos mediante microscopía confocal. En la proyección ortogonal de una fibra muscular, pudimos observar que los núcleos positivos a PCNA se encuentran envueltos por la marca del 12/101 y tienen una forma alargada, característica de los núcleos en las fibras musculares y no compactos como los de las células troncales PAX7+ (Figura 9 A). Esto muestra que los núcleos de las fibras musculares pueden reingresar al ciclo celular en respuesta a la amputación.

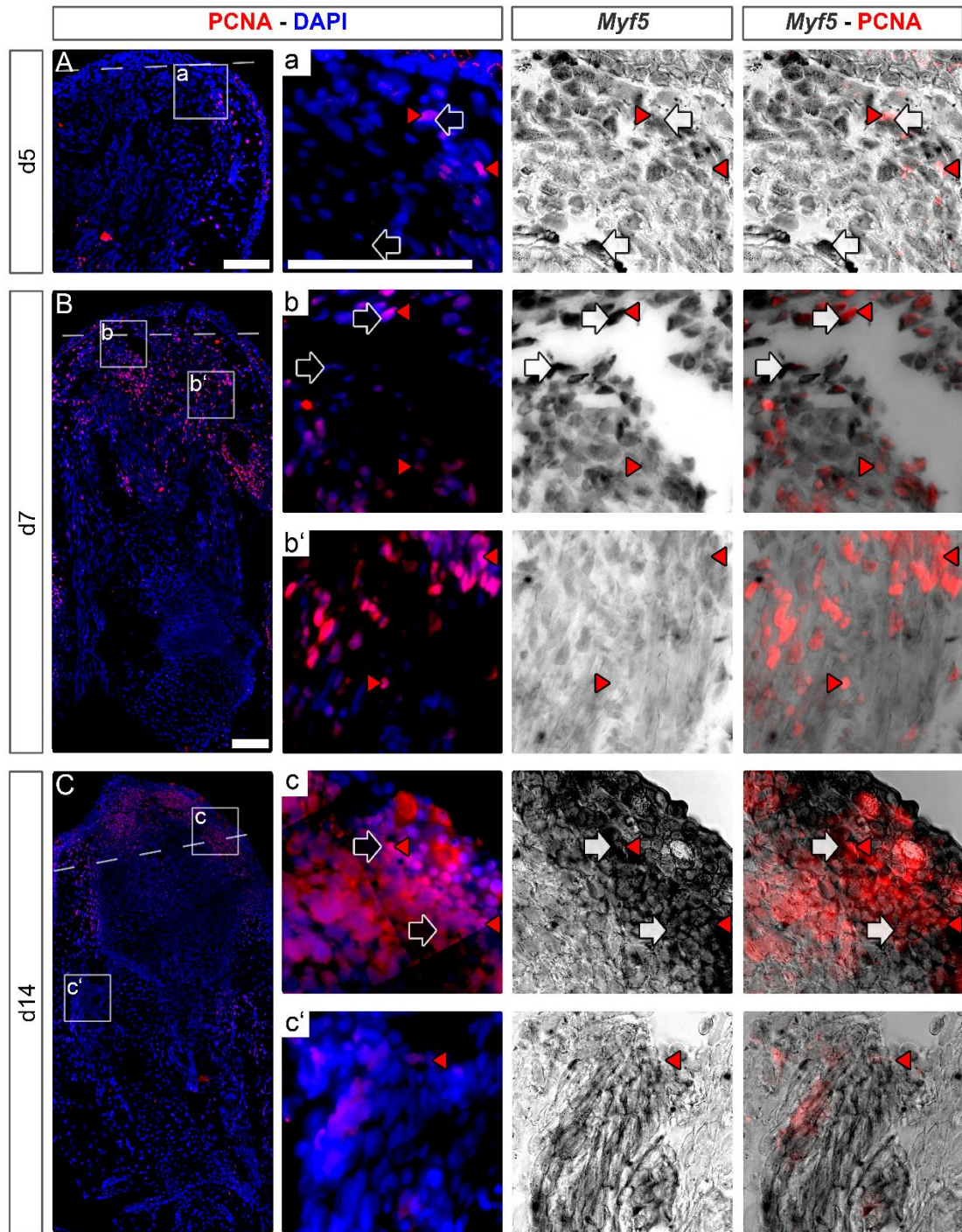


Figura 7. ISHIF contra Myf5 y el marcador de proliferación PCNA al d5 (A), d7 (B) y d14 (C). Las líneas punteadas (A-C) marcan el sitio de amputación. Los recuadros (A-C) marcan el campo de las imágenes de mayor aumento (a-c'). Las cabezas de flecha marcan células PCNA+. Las flechas marcan células Myf5+. Escala en "B" es igual para "C"; y "a" es igual para "b-c'". Escalas en "A", "a" y "B" son equivalentes a 200 micrones.

La capacidad de las miofibras de urodelos de reingresar al ciclo celular ya ha sido evidenciada mediante experimentos de incorporación de BrdU y EdU (Calve & Simon, 2011; E. M. Tanaka, Gann, Gates, & Brockes, 1997). No obstante, las células no se fragmentan y no proliferan (H. Wang et al., 2015). Aún más, a diferencia de *N. viridescens*, los progenitores musculares del blastema de *A. mexicanum* provienen principalmente de células troncales PAX7+ y no de las miofibras (Sandoval-Guzmán et al., 2014). Por esto, sospechamos que el reingreso al ciclo celular de los

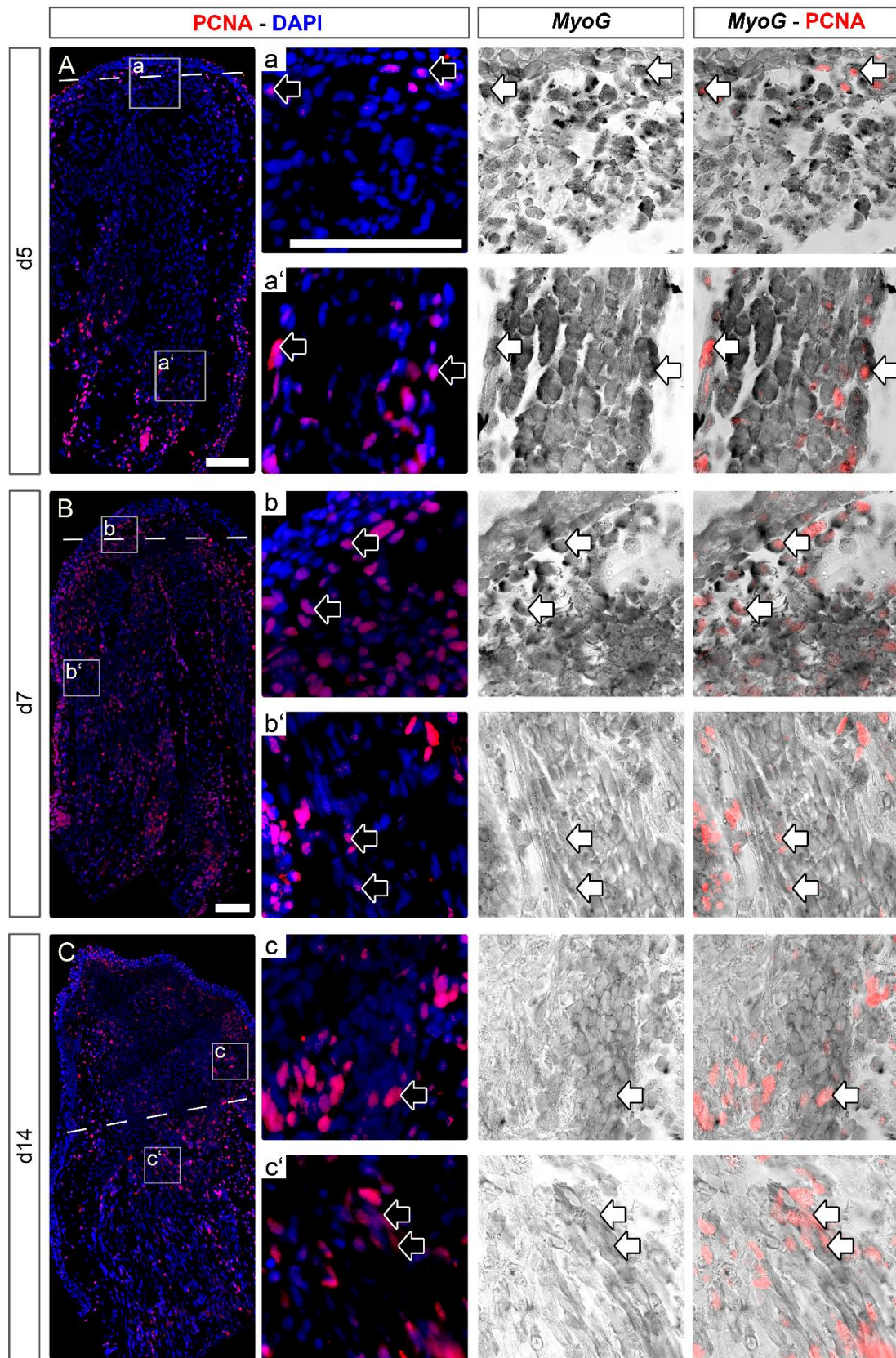


Figura 8. ISHIF contra MyoG y el marcador de proliferación PCNA al d5 (A), d7 (B) y d14 (C). Las líneas punteadas (A-C) marcan el sitio de amputación. Los recuadros (A-C) marcan el campo de las imágenes de mayor aumento (a-c'). Las flechas marcan células MyoG+/PCNA+. La escala en "B" es igual para "C"; y "a" es igual para "b-c". Escalas en "A", "a" y "B" equivalen a 200 micrones.

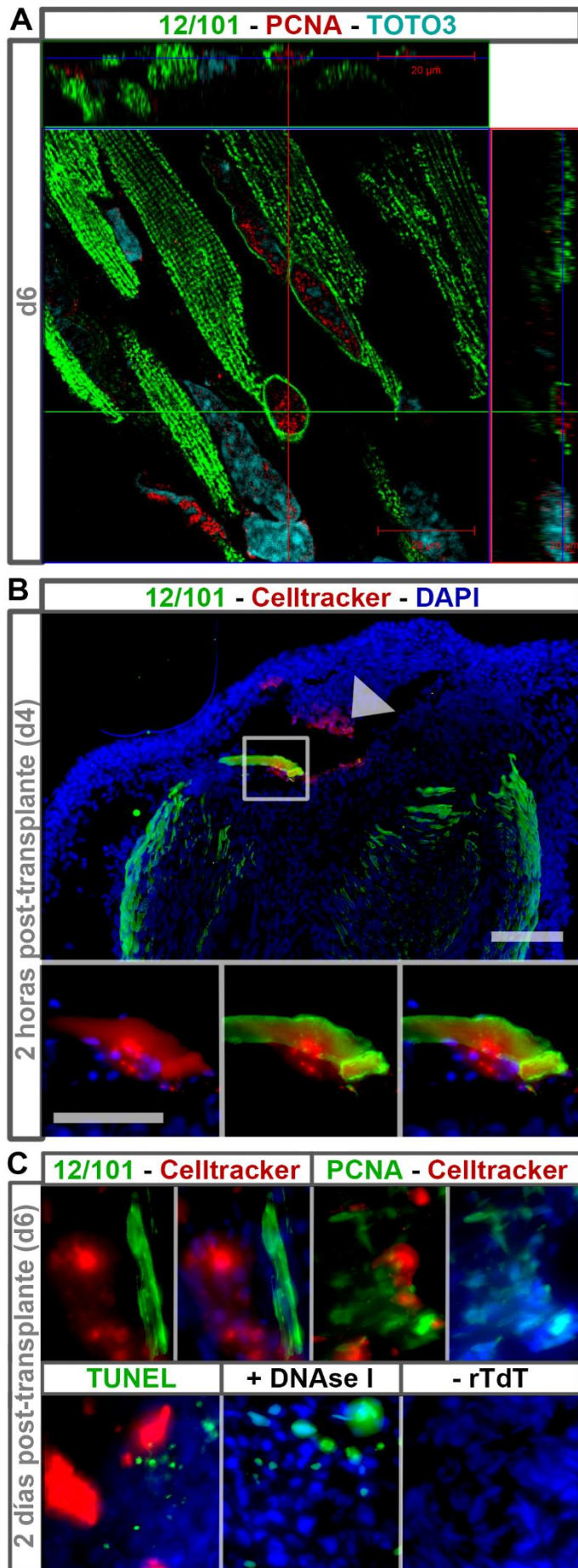


Figura 9. Vista ortogonal de una reconstrucción tridimensional de un doble marcaje contra 12/101 y PCNA en fibras musculares de muñones al d6 (A). Inmunofluorescencia contra 12/101 en muñón al d4, 2 horas post-transplante de miofibras marcadas con celltracker (B). El recuadro marca el campo de las imágenes de mayor aumento. La cabeza de flecha marca células mononucleares marcadas con Celltracker. La escala en el recuadro superior es equivalente a 200 micrones, la escala en el recuadro inferior es equivalente a 100 micrones y es igual para los recuadros de "C". Inmunofluorescencias en muñones al d6, 2 días post-transplante, contra 12/101 o PCNA (recuadros superiores) y tinción TUNEL (recuadros inferiores) experimental (izquierda), control positivo (+DNase I) y el control negativo (sin rTdT) (C).

núcleos de las miofibras representa un vestigio de la capacidad latente de las miofibras para su desdiferenciación, es factible que otras señales externas o procesos intrínsecos en las fibras musculares sean necesarios para proseguir en su desdiferenciación (fragmentación y proliferación). El blastema forma un microambiente que es capaz de inducir la desdiferenciación, inclusive de cardiomiocitos trasplantados que se integran y forman músculo esquelético (Laube, Heister, Scholz, Borchardt, & Braun, 2006). Por lo que la exposición al microambiente del blastema podría evidenciar la capacidad latente de desdiferenciación de las miofibras de *A. mexicanum*.

Para probar si es que las miofibras de *A. mexicanum* tienen la capacidad de desdiferenciarse *in vivo* al exponerlas al microambiente del blastema, realizamos trasplantes de miofibras de extremidades sin amputar marcadas con celltracker, un tinte celular fluorescente retenido por las células hasta por 6 generaciones, a extremidades en regeneración al d4 y evaluamos la expresión del marcador de diferenciación 12/101 y proliferación PCNA 48h después del trasplante (d6) (**Figura 9 B-C**). A las 2 horas post-trasplante (hpt) se observó que la miofibra trasplantada (celltracker+) entre el epitelio de herida y el mesénquima apical del muñón, expresa 12/101. No obstante, a los 2 días post-trasplante no pudimos observar células celltracker+ que expresaran 12/101 en ninguna de nuestras muestras (**Figura 9 C**; 12/12 muestras analizadas, 51 cortes analizados en total). Interesantemente, algunas de las células derivadas del trasplante expresaban PCNA, sugiriendo que se encontraban ciclando (**Figura 9 C**; 3/3 muestras analizadas, 8 cortes analizados en total). Además, ninguna de las células celltracker+ al d6 se encontraba en una evidente forma de fibra, pero sí en cúmulos de células mesenquimales (**Figura 9 C**; 21/21 muestras analizadas, 103 cortes analizados en total). Usando el marcaje de TUNEL no pudimos observar que los cúmulos de células marcadas se encontraran en apoptosis (**Figura 9 C**; 6/6 muestras analizadas, 44 cortes analizados en total). Por lo que, de ser derivada de las miofibras, la fragmentación de las miofibras responde a un proceso de desdiferenciación y no de muerte celular programada al estar en el microambiente del blastema. Al observar las muestras a las 2 hpt, era común observar células marcadas con celltracker asociadas a las miofibras trasplantadas o al epitelio de herida del hospedero negativas a 12/101 (**Figura 9 B y cabeza de flecha**), por lo que sospechamos que existe un nivel de contaminación de células mononucleares asociadas a las miofibras que no se pudieron remover con nuestro método de purificación, o por un exceso de celltracker en el medio al momento de inyectar las miofibras. Por lo que estos resultados y la interpretación de los mismos debe ser tomados con cautela.

DISCUSIÓN

MRFS DURANTE LA REGENERACIÓN DE LA EXTREMIDAD

La regeneración de la extremidad de *A. mexicanum* representa un sistema único en el cual los programas morfogénicos embrionarios son reactivados (Eugen Nacu & Tanaka, 2011), por lo que es presumible que los factores que regulan los programas de diferenciación de los distintos tipos celulares que forman la extremidad tengan una expresión dinámica durante la regeneración. En el caso del músculo, los MRFs son los reguladores maestros del programa de diferenciación de los progenitores tanto en la miogénesis embrionaria, postnatal y adulta. Además, su actividad jerárquica se encuentra conservada filogenéticamente (Florian Bentzinger et al., 2012; Gurevich et al., 2014; Hirst & Marcelle, 2015; Rossi & Messina, 2014; Sabillo et al., 2016). En este trabajo, quisimos determinar si, de manera similar a la miogénesis embrionaria/adulta, los MRFs

participan en la regulación del estado de diferenciación de los progenitores musculares del blastema en regeneración de *A. mexicanum*.

MYF5 COMO MARCADOR DE MIOBLASTOS EN EXPANSIÓN DURANTE LA REGENERACIÓN

Filogenética- y ontológicamente la expresión de Myf5 varía tanto espacial como temporalmente. No obstante, es común en todos los sistemas miogénicos que Myf5 se exprese transitoriamente en las fases tempranas de la miogénesis marcando progenitores comprometidos al linaje muscular que se encuentran aún en expansión, el decaimiento en su expresión se correlaciona con la salida del ciclo celular y su diferenciación terminal (Florian Bentzinger et al., 2012).

Durante el desarrollo embrionario de *A. mexicanum* Myf5 se expresa transitoriamente en estadios donde el miotomo y esclerotomo se encuentran visualmente separados y antes de que se puedan observar las primeras miofibras musculares. En estadios embrionarios posteriores ya no se puede detectar la expresión de Myf5; aunque curiosamente, la expresión de Myf5 en músculo adulto es significativamente mayor a los estadios embrionarios donde ya no es detectable su expresión (Banfi et al., 2012).

Por otro lado, Myf5 se expresa en 3 ondas miogénicas temporalmente separadas en *X. laevis* (Sabillo et al., 2016). i) antes de la somitogénesis Myf5 se expresa en el mesodermo presomítico y posteriormente se restringe en la zona caudal y en somitas tempranas. ii) Myf5 se mantiene expresado en el mesodermo presomítico caudal y en el dermomioto epaxial. iii) Myf5 incrementa notoriamente en un patrón puntillado a lo largo de las somitas, sugiriendo que esta onda miogénica es producida por la activación de progenitores Pax7+ (Della Gaspera et al., 2012).

En el pez cebra la expresión de Myf5 comienza antes de la somitogénesis, en las células adaxiales del mesodermo presomítico las cuales contribuirán en la formación del miotomo (Rossi & Messina, 2014) y su expresión es rápidamente reducida a la par que continúa el desarrollo y maduración del miotomo (Chen et al., 2007).

Durante la miogénesis embrionaria de ratón, Myf5 comienza a expresarse poco después de la somitogénesis (E8.75) en células del dermomioto y miotomo epaxial. Posteriormente su expresión se extiende a todo el miotomo y en células migratorias del miotomo hipoaxial (D Summerbell et al., 2000). Para el E10.5 y E11 se observan células que expresan Myf5 en la extremidad anterior y posterior respectivamente, las cuales reducen su expresión rápidamente. La expresión continúa reduciéndose y para estadios posteriores al E14 así como en postnatales y adultos ya no es detectable la expresión de Myf5 (Ott, Bober, Lyons, Arnold, & Buckingham, 1991).

Durante la miogénesis adulta y regeneración de músculo, Myf5 marca una subpoblación de células satélite Pax7+ quiescentes que se encuentran comprometidas al programa miogénico (Beauchamp et al., 2000; Biressi et al., 2013; Gayraud-Morel et al., 2012; Günther et al., 2013); no obstante, el mRNA de Myf5 se mantiene secuestrado en gránulos mRNP por miRNA-31 en las células quiescentes y, en respuesta a un daño, el mensajero de Myf5 es liberado y las células Pax7+/Myf5+ pueden ingresar al programa miogénico (Crist, Montarras, & Buckingham, 2012). Myf5 juega un papel importante durante la fase de expansión de las células satélite ya que el mutante Myf5^{-/-} presenta un retraso en la regeneración y una menor capacidad proliferativa de las células satélite (Gayraud-Morel et al., 2007; Ustanina, Carvajal, Rigby, & Braun, 2007). De manera interesante, progenitores embrionarios Pax7+/Myf5+ proliferan más rápidamente que

progenitores solo Pax7+ (Picard & Marcelle, 2013). De manera similar, en respuesta a un daño, Myf5 es sobreexpresado en las fibras musculares dañadas en pez cebra (Seger et al., 2011; Tapan G. Pipalia, Jana Koth, Shukolpa D. Roy, Christina L. Hammond, 2016) y *X. laevis* (Launay et al., 2001).

Existe evidencia de que Myf5 marca mioblastos durante la regeneración de la extremidad de *X. laevis*. La rana adulta únicamente regenera un cono cartilaginoso que carece de musculatura. La ausencia de este tejido se le ha adjudicado a la falta de progenitores musculares en el blastema de la extremidad adulta, mientras que amputaciones en etapas larvarias si regeneran la musculatura. Correspondientemente, Myf5 se expresa en blastemas larvarios y no en blastemas adultos (Sato et al., 2005); sugiriendo que la ausencia de Myf5 en el blastema adulto se debe a la ausencia de mioblastos. Igualmente, nuestros resultados sugieren que Myf5 podría estar marcando mioblastos en expansión durante la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*. Primeramente, Myf5 es expresado en células mesenquimales que forman el blastema durante los estadios de desdiferenciación y formación del blastema (**Figura 4 G-H y Figura 6 A-B**), estadios donde la proliferación celular es más notable; y su expresión se comienza a reducir durante la rediferenciación (**Figura 4 I y Figura 6 C**). Además, éstas células Myf5+ también expresan PCNA, sugiriendo que están activamente proliferando (**Figura 7**).

La importancia de Myf5 para la expansión es evidente en el ratón Myf5^{-/-}, en el cual las células Pax7+ activadas presentan defectos en la proliferación (Gayraud-Morel et al., 2007; Ustanina et al., 2007). Además, los niveles proteicos de Myf5 son dinámicamente regulados durante el ciclo celular, mostrando picos en G0 y en la transición S-G2; notablemente, la reducción en los niveles de la proteína durante G1 permite la salida del ciclo celular y la diferenciación terminal de los mioblastos (Kitzmann et al., 1998; Lindon, Montarras, & Pinset, 1998) denotando la importancia de este MRF para mantener un estado proliferativo en los mioblastos. Recientemente se ha reportado la importancia de la vía NOTCH para mantener la proliferación de los progenitores musculares durante el desarrollo al reprimir la expresión del inhibidor de CDKs p57 (Zalc et al., 2014). Esto hace llamativo el evaluar la importancia de esta vía durante la regeneración de la extremidad y en particular durante la expansión de mioblastos Myf5+ del blastema.

Curiosamente, la expresión de Myf5 es marcadamente distinta con respecto a la regeneración de la extremidad del urodelo *N. viridescens* (Simon et al., 1995), en la cual Myf5, a diferencia de otros vertebrados, se encuentra significativamente expresado en las fibras musculares de la extremidad y la reducción en su expresión en miotubos de tritón en cultivo se correlaciona con el reingreso al ciclo celular y a la fragmentación a células mononucleares (Imokawa, Gates, Chang, Simon, & Brockes, 2004), dos procesos básicos en la desdiferenciación del musculo (discutido más adelante). Por lo que los autores sugieren que en *N. viridescens*, Myf5 pudo haber tomado la función de otro MRF más tardío (eg. MyoG) para la inducción y mantenimiento del estado diferenciado de las miofibras. En ninguno de los tiempos evaluados pudimos observar la expresión de Myf5 en las fibras musculares de *A. mexicanum* por ISH (**Figura 4 F-I, Figura 6 y Figura 7**). Aunque, en reportes previos detectaron por RT-qPCR la expresión de Myf5 en músculo (Banfi et al., 2012). Esta discrepancia podría ser explicada por diferencias fundamentales de las técnicas usadas. Ya que la RT-qPCR es más sensible, es posible que los niveles de Myf5 en el músculo sean inferiores a los que pueden ser detectados por la ISH. Aún más, la detección por RT-qPCR no discriminaría entre fibras musculares y células troncales residentes Pax7+. Es posible que en *A. mexicanum*, similar a amniotas, exista una subpoblación Pax7+/Myf5+ residente en el músculo. Experimentos con marcajes génicos para seguir la expresión de Myf5 en la homeostasis del músculo y en la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum* y *N. viridescens* nos ayudaría a entender las discrepancias en cuanto a los patrones de expresión de Myf5 en estas dos especies.

Alternativamente, las diferencias entre los patrones de expresión de Myf5 entre *A. mexicanum* y *N. viridescens* podrían ser un reflejo de la preferencia diferencial en el reclutamiento de progenitores musculares entre especies. Mientras que en *N. viridescens* los progenitores musculares del blastema son derivados de la desdiferenciación de las miofibras, la falta de evidencia de desdiferenciación en *A. mexicanum* sugiere que los progenitores son mayoritariamente derivados de células troncales residentes Pax7+ (Sandoval-Guzmán et al., 2014). Es posible que la expresión de Myf5 mantenida en las fibras musculares de *N. viridescens* le confiera la capacidad para desdiferenciarse en respuesta a la amputación, mientras que su silenciamiento en las fibras musculares en *A. mexicanum* limita la fuente de progenitores musculares a únicamente las células Pax7+. De ser éste el caso, las células Myf5+ que observamos en *A. mexicanum* podría ser derivadas únicamente de células Pax7+ que han entrado al programa miogénico; la posible existencia de distintas subpoblaciones de progenitores musculares con distintos orígenes durante la regeneración y su expresión de los MRFs es discutido más adelante. De manera interesante, recientemente se reportó que en el urodelo *Cynops pyrrhogaster* la elección del reclutamiento de progenitores musculares depende de su estado metamórfico; similar a *A. mexicanum*, larvas premetamórficas de *C. pyrrhogaster* reclutan principalmente progenitores musculares Pax7+, mientras que en adultos metamórficos la desdiferenciación de miofibras provee de progenitores musculares al blastema, similar a *N. viridescens* (H. V. Tanaka et al., 2016). Este cambio en el reclutamiento de progenitores derivado de la metamorfosis parece no ocurrir en *A. mexicanum* y *N. viridescens* (Sandoval-Guzmán et al., 2014). Sería interesante observar si es que la expresión de Myf5 en las fibras musculares de *C. pyrrhogaster* pre- y metamórficos correlaciona con la capacidad de desdiferenciación de las mismas.

MYOG Y SU POSIBLE REGULACIÓN POR IDS EN LA REGENERACIÓN

Al contrario de Myf5, MyoG participa en las fases tardías de la miogénesis. Su expresión es precedida y dependiente de la expresión de Myf5 y MyoD en los mioblastos (M. A. Rudnicki et al., 1993) y ésta se restringe en el células musculares diferenciadas en los vertebrados (Della Gaspera et al., 2012; Hinits, Osborn, & Hughes, 2009; Kraus & Pette, 1997; Sabillo et al., 2016; Sassoon et al., 1989; Yee & Rigby, 1993). Una expresión alterada de MyoG se correlaciona con un modelo murino de distrofia muscular de Duchenne (Bhagwati, Ghatpande, Shafiq, & Leung, 1996; Meadows, Flynn, & Klein, 2011) y a malformaciones ano rectales (Aoi, Shimotake, Tsuda, Deguchi, & Iwai, 2005).

MyoG es esencial para la diferenciación terminal de los mioblastos, ya que los ratones neonatales MyoG^{-/-} muestra una marcada reducción en la masa muscular y únicamente se observan células mononucleares en lugar de fibras multinucleadas, sugiriendo que los mioblastos no pudieron completar el programa de diferenciación en ausencia de MyoG (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993). A pesar de ser genes parálogos, ninguno de los otros tres MRFs pueden suplir la función de MyoG para la inducción de marcadores de diferenciación terminal de músculo (Charbonnier et al., 2002; Hasty et al., 1993), formación, crecimiento y homeostasis del músculo (Hasty et al., 1993; Meadows, Cho, Flynn, & Klein, 2008). Esto puede ser explicado por la diversidad en la regulación transcripcional específica de cada MRF. Particularmente se ha reportado que Myf5, Mrf4 y MyoD pero no MyoG regulan la expresión de marcadores de diferenciación y del mismo MyoG mediante los remodeladores de cromatina SWI/SNF mientras que MyoG parece funcionar solo como un factor transcripcional general (Bergstrom & Tapscott, 2001; Roy, De La Serna, & Imbalzano, 2002). Esto sugiere que tanto Myf5, MyoD y Mrf4 generan un paisaje cromatínico en los mioblastos durante la miogénesis que facilita la expresión de marcadores terminales de diferenciación mediada por MyoG.

Con nuestros resultados es difícil conciliar la función de MyoG como inductor terminal del programa de diferenciación muscular durante la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*; ya que, además de observarse expresado en las fibras musculares (**Figura 4 A-D**), también se expresa en células mononucleares cercanas al músculo dañado en el estadio de desdiferenciación y en células del blastema que están activamente proliferando (**Figura 5 A-C y Figura 8 A-B**). Únicamente durante la rediferenciación es intuitivo especular que la expresión de MyoG esté participando en la diferenciación terminal de los mioblastos del blastema (**Figura 4 D, Figura 5 D y Figura 8 C**). Independientemente de su origen (discutido más adelante), la expresión temprana de MyoG en células mononucleares proliferantes mucho antes del inicio de la rediferenciación puede ser explicada en dos posibles escenarios: 1) en *A. mexicanum*, MyoG no es un inductor necesario para la diferenciación terminal de los mioblastos durante la regeneración. Esto es apoyado por la evidencia de que la supresión de MyoG en células satélite adultas de ratón no evita su diferenciación *in vitro* (Meadows et al., 2008). 2) durante estadios tempranos de la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*, la actividad transcripcional de MyoG es reprimida y únicamente es liberada durante la rediferenciación. Las proteínas “inhibidoras de la diferenciación” (Ids) son los candidatos más obvios para la regulación de MyoG. Las Ids heterodimerizan con factores transcripcionales con motivos bHLH, como los MRFs y las proteínas E. No obstante, careciendo de la región básica para la unión al DNA, generan un heterodímero deficiente. De esta manera, los Ids regulan negativamente la actividad transcripcional de distintos factores transcripcionales relacionados con diferenciación (L. H. Wang & Baker, 2015). Es posible, ya que Ids unen con diferente afinidad a distintos MRFs (Langlands, Yin, Anandi, & Prochownik, 1997), que haya Ids que regulen específicamente a MyoG durante la regeneración de *A. mexicanum*.

Evidencia tanto en ratón, *X. laevis* y peces sugirieron que los Ids tienen una actividad filogenéticamente conservada en la miogénesis y homeostasis del músculo. Durante el desarrollo de ratón algunos Ids tienen un patrón de expresión complementario al de MyoG (Y. Wang, Benezra, & Sassoon, 1992). Particularmente, Id2 se expresa en el dermomiótomo (Melnikova, Bounpheng, Schatteman, Gilliam, & Christy, 1999). Interesantemente, músculos atrofiados en roedores expresan más Id1; correspondientemente, la sobreexpresión de Id1 en un ratón transgénico produce atrofia muscular (Gundersen & Merlie, 1994), incrementa la expresión de todos los MRFs en el músculo de la extremidad posterior de ratón y, acorde a su función como represor de la actividad de MRFs, la sobreexpresión de Id1 en el doble transgénico de Id1 y MyoG contrarresta los efectos deletéreos producidos por la sobreexpresión de MyoG (Gundersen, Rabben, Klocke, & Merlie, 1995). En líneas de mioblastos de ratón, la expresión de Id1, Id2, Id3 e Id4 es reducida durante la diferenciación *in vitro* (Melnikova et al., 1999; Sun, Trausch-Azar, Ciechanover, & Schwartz, 2005; J. Wu & Lim, 2005) y la sobreexpresión de Id2, pero no de Id4, inhibe la miogénesis (Melnikova et al., 1999). Más recientemente, se observó *in vivo* que durante la regeneración del músculo, en respuesta al daño por cardiotoxina, las células Pax7+ expresan Id1 e Id3 y su expresión aumenta, mediada por BMPs, en la zona del músculo dañado; interesantemente, el mutante Id1+/-;Id3-/- presenta una proliferación reducida en las células Pax7+ y en general una regeneración del músculo defectuosa (Clever, Sakai, Wang, & Schneider, 2010).

En embriones de *X. laevis*, tanto Id2, Id3 e Id4 se expresan en el miótomo y en células migratorias hipoxiales. De manera interesante, su expresión parece estar regulada por las vías NOTCH y BMPs (Liu & Harland, 2003). Más tardíamente, Id2 e Id3 son expresados en la extremidad posterior durante su morfogénesis y su expresión se reduce gradualmente hasta llegar a niveles basales en la extremidad adulta (Shimizu-Nishikawa, Tazawa, Uchiyama, & Yoshizato, 1999). La sobreexpresión de Id2 o Id4 en embriones de *X. laevis* contrarresta la expresión ectópica de

marcadores de músculo diferenciado producida por la sobreexpresión de MyoD (Liu & Harland, 2003). Ids también son expresados en las somitas de embriones y en el músculo adulto de peces (Rallière, Chauvigné, & Rescan, 2004; Rescan, 1997).

Existe poca evidencia de la participación de Ids durante la regeneración de la extremidad. En el caso de *C. pyrrhogaster* y *X. laevis*, Id2 e Id3 se expresan en bajos niveles en la extremidad normal y su expresión aumenta notoriamente en el blastema; particularmente, Id3 se expresa más en el músculo del tritón y sus picos de expresión ocurren durante la formación y crecimiento del blastema mientras que durante la rediferenciación disminuyen (Shimizu-Nishikawa et al., 1999). Esto, en conjunto con nuestros patrones de expresión de MyoG en *A. mexicanum*, sugieren que Id3 podría regular negativamente a MyoG durante los estadios tempranos de la regeneración; bloqueando el programa de diferenciación de los mioblastos y permitiendo su expansión, antes de retomar el programa y diferenciarse terminalmente en los estadios tardíos. Estudios sobre la expresión de distintos Ids durante la regeneración en *A. mexicanum*, experimentos de interacción entre Ids y MRFs, así como ensayos de pérdida o ganancia de función de Ids; permitirán probar dicha hipótesis y nos daría información sobre los mecanismos que controlan los programas de diferenciación que permiten la expansión controlada de progenitores y la regeneración en estos animales.

MRF4 NO PUDO SER DETECTADO POR ISH

De todos los MRFs, Mrf4 tiene la función más ambigua. En roedores, Mrf4 se comienza a expresar desde el E9 en el miotomo, precedido por la expresión de Myf5 y MyoG; hasta el E13.5 cuando su expresión se reduce y no es re-expresado hasta la miogénesis fetal de los músculos axiales y el diafragma. En la extremidad, Mrf4 es expresado desde el E17 y su expresión se mantiene alta hasta la etapa adulta (Bober et al., 1991; T. Hinterberger, Sassoon, Rhodes, & Konieczny, 1991; Rhodes & Konieczny, 1989). El ratón mutante Mrf4^{-/-} no tiene efectos deletéreos en la musculatura pero si una expresión aumentada de MyoG, sugiriendo que éste puede suplir la función de Mrf4 (W. Zhang, Behringer, & Olson, 1995). Estos resultados, en conjunto a la expresión tardía, sugerían que Mrf4 tiene un papel en la diferenciación, como MyoG, y no en la determinación, como Myf5 o MyoD, durante el programa miogénico. No obstante, reportes muestran que Mrf4 se expresa antes de Myf5 en las somitas (Dennis Summerbell, Halai, & Rigby, 2002) y dobles mutantes muestran que Mrf4 tiene un papel redundante con MyoD y Myf5 en la determinación de los mioblastos (Kassar-Duchossoy et al., 2004; Rawls et al., 1998). Aún más, la coexpresión de Mrf4 con Pax7 durante la especificación de las células satélite Pax7⁺ en el desarrollo no afecta la “troncalidad” de las mismas (Sambasivan et al., 2013); argumentando en contra de una función en la diferenciación muscular para Mrf4. Por lo que la función de Mrf4 en mamíferos no es clara.

En *X. laevis*, Mrf4 se expresa tardíamente como MyoG en el miotomo durante la primera onda miogénica y en el dermomiotomo durante la segunda y tercera onda (Della Gaspera et al., 2012; Sabillo et al., 2016) y, igual que en mamíferos, Mrf4 se expresa en el músculo adulto de *X. laevis* en homeostasis (Gaspera et al., 2006; T. J. Hinterberger, 2010); sugiriendo una actividad tardía en el programa miogénico en *X. laevis*. Similarmente, Mrf4 se expresa en las somitas antes de MyoG pero después de MyoD en pez cebra, mientras que en las aletas pectorales se expresa después de MyoD y a la par de MyoG (Hinits, Osborn, Carvajal, Rigby, & Hughes, 2007) y, a diferencia del ratón Mrf4^{-/-}, el knockdown de Mrf4 si genera malformaciones en las somitas y la organización de las fibras musculares (Y. H. Wang et al., 2008) aunque el knockout no tiene un efecto aparente (Hinits et al., 2009). Interesantemente, a pesar de que la expresión endógena de Mrf4 es muy posterior a la de MyoD, la sobreexpresión temprana de Mrf4 en el doble morfoante

Myf5/MyoD puede rescatar la miogénesis al inducir la expresión de MyoD (Schnapp et al., 2009), por lo que, al igual que en ratón, la función de Mrf4 no es clara en pez cebra.

Durante la regeneración del músculo en respuesta al daño por cardiotoxina, Mrf4 se expresa en las miofibras de *X. laevis* (Becker et al., 2003; Gaspera et al., 2006; Mira, Nicolas, Gallien, & Chanoine, 2000; Nicolas, Mira, Gallien, & Chanoine, 1997) y ratón (Launay et al., 2001). No obstante, no hay reportes sobre la expresión de Mrf4 en la regeneración de la extremidad en *Xenopus*. En el caso de la regeneración de la extremidad de *N. viridescens*, Mrf4 es expresado en la extremidad normal, regenerada y durante la rediferenciación (Simon et al., 1995) sugiriendo un papel en la diferenciación y no la determinación de los mioblastos. En nuestros experimentos, no pudimos observar expresión de Mrf4 en ninguno de los tiempos analizados tanto en fibras musculares o en células del blastema (**Figura 4 K-N**); no obstante, no podemos descartar que Mrf4 sea expresado durante la regeneración, ya que el fragmento clonado amplificó tanto en cDNAs de blastema como de extremidad normal (no mostrado). Por lo que análisis más detallados son necesarios para determinar el patrón de expresión de Mrf4 durante la regeneración de *A. mexicanum*.

MYOD EN LA REGENERACIÓN?

MyoD fue el primer MRF en ser identificado, por su habilidad al inducir su expresión de convertir diversas líneas celulares de fibroblastos y adipoblastos a mioblastos (Davis, Weintraub, & Lassar, 1987). En *X. laevis* el mRNA materno de MyoD está presente en el ovocito y la expresión del mensajero zigótico es inducida desde el final de la blástula y principio de la gástrula (Harvey, 1990; Hopwood, Pluck, & Gurdon, 1989). Durante la gástrula, MyoD se expresa en el mesodermo presomítico y, durante la primera onda de miogénesis, su expresión se restringe al mesodermo presomítico caudal y en las somitas rostrales. Posteriormente, durante la segunda y tercera ondas, su expresión se mantiene en todas las somitas y el mesodermo presomítico caudal (Della Gaspera et al., 2012; Sabillo et al., 2016). Durante la miogénesis en la extremidad y cola en estadios perimetamórficos, MyoD se expresa después de Myf5, al mismo tiempo que MyoG y antes de Mrf4 (Yamane & Nishikawa, 2013). Mientras que en el músculo adulto no se expresa (Nicolas, Gallien, & Chanoine, 1996).

Similar a *X. laevis*, la expresión de MyoD durante el desarrollo embrionario de pez cebra es muy temprana y es sucedida por la expresión de MyoG y Mrf4. Durante la gástrula, éste se expresa en células adaxiales del mesodermo, la cual se extiende en dos bandas longitudinales en ambos lados de la presuntiva notocorda previo a la somitogénesis. Después, la expresión de MyoD se correlaciona con el surgimiento de las somitas en el gradiente anterior a posterior, donde se expresa primeramente en la región central y después se restringe a la región posterior de las somitas. Posteriormente, su expresión decreta en las somitas más rostrales, restringiéndose a las más caudales. En estadios más posteriores, su expresión se limita en los primordios de las aletas pectorales. Similar a ratón, MyoD tiene una actividad redundante con Myf5, demostrada en el doble morfante Myf5/MyoD (Hinits et al., 2009; Schnapp et al., 2009; Weinberg et al., 1996) y parece regular la expresión de MyoG mediado por miR-206 (Hinits et al., 2011). En conjunto, la expresión temprana de MyoD en *X. laevis* y pez cebra, así como la función redundante con Myf5 en ratón y pez cebra, argumentan a favor de una actividad temprana en la miogénesis, relacionada con la determinación de los mioblastos y no en la diferenciación terminal.

En el caso del ratón, similar al mutante Myf5^{-/-}, el mutante MyoD^{-/-} no muestra defectos en la musculatura y la expresión de marcadores de diferenciación no es alterada; únicamente la expresión de Myf5 se ve aumentada, sugiriendo que Myf5 puede suplir la función de MyoD (M.

Rudnicki, Braun, Hinuma, & Jaenisch, 1992). Esto fue comprobado con el doble mutante *Myf5*^{-/-}:*MyoD*^{-/-} el cual carece de miofibras y mioblastos al nacer (Boris Kablar, Krastel, Tajbakhsh, & Rudnicki, 2003; M. A. Rudnicki et al., 1993) y en el mutante sencillo *Myf5*^{-/-} la miogénesis se retrasa hasta que inicia la expresión endógena de *MyoD* (Braun, Bober, Rudnicki, Jaenisch, & Arnold, 1994), mostrando que ambos MRFs tienen actividades redundantes. A pesar de esto, ambos MRFs regulan el programa miogénico de distintos grupos de músculos. Primero, *Myf5* se expresa en el dermomiótomo epaxial el cual dará lugar a los músculos paraespinales e intercostales en la espalda, los cuales muestran un retraso en su determinación en el mutante *Myf5*^{-/-}. Por otro lado, *MyoD* se expresa en el dermomiótomo hipoaxial el cual da lugar a los músculos abdominales y de las extremidades, igualmente, estos grupos de músculos se determinan tardíamente en el mutante *MyoD*^{-/-} (B Kablar et al., 1997; Boris Kablar et al., 2003; Smith, Kachinsky, & Miller, 1994). En conjunto, *MyoD* determina grupos musculares hipoaxiales durante la miogénesis embrionaria de ratón, no obstante su actividad es redundante con *Myf5* y *Mrf4* (Kassar-Duchossoy et al., 2004; Rawls et al., 1998).

Durante la regeneración del músculo en ratón, *MyoD* se expresa en mioblastos en respuesta a un daño (Launay et al., 2001; Nicolas et al., 1996) y el mutante *MyoD*^{-/-} retrasa la diferenciación de los mioblastos derivados de las células satélite (Megenev, Kablar, Garrett, Anderson, & Rudnicki, 1996; White et al., 2000). No obstante, *MyoD* no es expresado en las células satélite *Pax7*⁺ quiescentes y es dispensable para su actividad (Kanisicak, Mendez, Yamamoto, Yamamoto, & Goldhamer, 2009). Notoriamente, células *Pax7*⁺ de *N. viridescens* expresan *MyoD* en cultivo (Morrison et al., 2006).

En la regeneración de la extremidad de *X. laevis*, igual que *Myf5*, *MyoD* se expresa en blastemas larvarios y no en blastemas adultos carentes de progenitores musculares (Satoh et al., 2005). Por lo que es posible que *MyoD*, al igual que *Myf5*, se exprese en mioblastos en expansión durante la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*. No obstante, nosotros no pudimos encontrar ninguna secuencia similar a *MyoD* en la base de datos de ESTs de *A. mexicanum*. Más aún, no existen reportes actualmente sobre la expresión de este gen durante el desarrollo o regeneración en esta especie, por lo que otras aproximaciones experimentales (eg. RT-PCR con primers degenerados, hibridación de una librería de cDNA con una sonda de *MyoD* de *X. laevis*) tendrán que ser usadas para clonarlo, evaluar su patrón de expresión y posible función durante la regeneración.

ORIGENES DE PROGENITORES MUSCULARES Y LA EXPRESIÓN DE MRFs

Debido a la importancia de los MRFs en el programa miogénico, es intuitivo pensar que estos factores tengan un papel relevante en la regulación de los progenitores musculares de *A. mexicanum* durante la regeneración de la extremidad, desde su reclutamiento, expansión y rediferenciación. Clásicamente, se creía que todos o la gran mayoría de los progenitores musculares provenían de la desdiferenciación de las fibras musculares, y en menor medida de células troncales *Pax7*⁺ (Morrison et al., 2010, 2006), y este mecanismo era generalizable para todos los urodelos. No obstante, usando diversas técnicas de marcaje génico tejido específico, recientemente se demostró que la preferencia en el reclutamiento entre estas dos fuentes, miofibras vs células *Pax7*⁺, es diferente entre especies. Siendo preferida la desdiferenciación de miofibras en *N. viridescens* y *C. pyrrhogaster* adultos (postmetamórficos), mientras que *A. mexicanum* y las larvas (premetamórficas) de *C. pyrrhogaster* favorecen al reclutamiento de células *Pax7*⁺ (Sandoval-Guzmán et al., 2014; H. V. Tanaka et al., 2016). Interesantemente, tanto en peces como en ranas también hay una preferencia por el reclutamiento de células *Pax7*⁺ sobre

la desdiferenciación de miofibras (Cavaco Rodrigues et al., 2012; Tapan G. Pipalia, Jana Koth, Shukolpa D. Roy, Christina L. Hammond, 2016; Weber et al., 2012). Interpretaciones evolutivas sugerirían que la capacidad de desdiferenciación de las miofibras es un rasgo adquirido en los tritones (*N. viridescens* y *C. pyrrhogaster*), o alternativamente perdido en salamandras (*A. mexicanum*). Es evidente que es necesario hacer más estudios comparativos con distintas especies para determinar el origen evolutivo de la desdiferenciación de las miofibras. A pesar de que los autores no encontraron evidencia de desdiferenciación en condiciones normales (Sandoval-Guzmán et al., 2014), esto no implica que las miofibras de *A. mexicanum* no posean la capacidad latente de desdiferenciarse (discutido más adelante). Son necesarios estudios de ablación de células Pax7+ (eg. ablación por expresión de la toxina difteria) o de edición genómica del locus Pax7 (Fei et al., 2014; Flowers, Timberlake, McLean, Monaghan, & Crews, 2014; Hayashi et al., 2013) para demostrar definitivamente si únicamente las células Pax7+ pueden proveer progenitores musculares durante la regeneración de *A. mexicanum*.

Nuestros resultados de los patrones de expresión de MRFs difícilmente pueden aportar evidencia a favor o en contra de la desdiferenciación de miofibras, pero se puede especular la participación de cada MRF en la regulación del estado de diferenciación de los progenitores musculares durante la regeneración, independientemente de su origen (**Figura 10**). De acuerdo a los patrones de expresión de MyoG y Myf5 (**Figura 4-8**), existen tres puntos temporales en los que los MRFs estarían regulando la función de los progenitores musculares; llamados reclutamiento (previo al blastema), expansión (crecimiento del blastema) y rediferenciación.

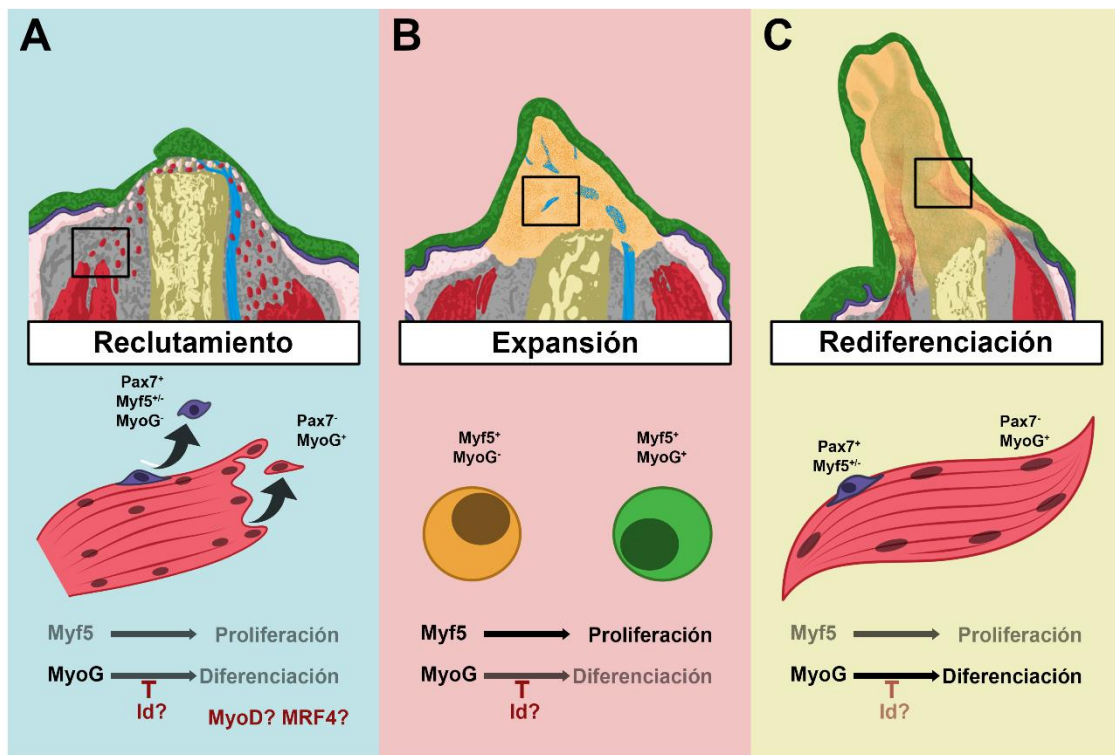


Figura 10. Modelo la función de MRFs en la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum* basado en el patrón de expresión. Más información en el texto.

i) En el reclutamiento de progenitores; células Pax7+/MyoG- o células mononucleares Pax7-/MyoG+ derivadas de las miofibras comienzan a migrar para formar parte del blastema. Similar a ratón, podrían existir subpoblaciones de células Pax7+ que también son Myf5+. Ya que la expresión de MyoG se mantiene en células mononucleares en tiempos tempranos (**Figura 4 A**), la

actividad de MyoG para mantener el estado de diferenciación podría estar siendo reprimida por I δ s o por regulación post-transcripcional (**Figura 10 A**).

ii) Durante la expansión de los mioblastos podrían existir dos subpoblaciones de mioblastos independientemente de su origen. Los progenitores musculares incrementan la expresión de Myf5 generando subpoblaciones Myf5+/MyoG- y Myf5+/MyoG+, las cuales comienzan a proliferar. Debido a que MyoD es redundante con Myf5, es posible que distintas subpoblaciones con distintas permutaciones en la expresión de estos MRFs puedan existir. Durante esta fase, la actividad de MyoG continúa siendo reprimida mientras que el incremento en la expresión de Myf5 favorece la proliferación de los mioblastos (**Figura 10 B**).

iii) En la última fase; el decremento en la expresión de Myf5 y la liberación de MyoG permiten a los mioblastos salir del ciclo celular y continuar el programa miogénico a su diferenciación terminal. Una subpoblación quiescente Pax7+/Myf5+ o Pax7+/Myf5- repoblaría el “pool” de células Pax7+ asociadas a las miofibras (**Figura 10 C**).

Estudios de marcapos con distintos reporteros (eg. dos construcciones: reportero GFP fusionado a la recombinasa Cre bajo el promotor de Myf5 y un reportero Lox-Cherry-STOP-Lox-YFP bajo el promotor de MyoG) permitirían determinar la expresión dinámica de estos MRFs en los mioblastos durante el proceso de regeneración.

EVIDENCIA DE DESDIFERENCIACIÓN EN MIOFIBRAS

Debido a la compleja arquitectura del músculo esquelético es que distintos requerimientos; como el reingreso al ciclo celular, cambio en la expresión de proteínas funcionales de las miofibrillas (eg. actina cardiaca, MHC, etc.) y la fragmentación a células mononucleares; deben ser cumplidos para aseverar que el músculo se ha desdiferenciado. Dichos requerimientos han sido observados repetidamente en las fibras musculares de modelos de regeneración y, en ciertas condiciones, en fibras musculares de mamíferos (Milner & Cameron, 2013).

REINGRESO AL CICLO CELULAR EN MIOFIBRAS

En cultivo, miotubos derivados de mioblastos A1 de *N. viridescens* y no miotubos de mioblastos C2C12 de ratón, reingresan a la fase S del ciclo celular en respuesta a un incremento del suero dependientemente de la fosforilación de Rb. A pesar de completar la fase S, los miotubos se arrestan en G2 por lo que no se observa mitosis en estos miotubos (E. M. Tanaka, Drechsel, & Brockes, 1999; E. M. Tanaka et al., 1997). De manera notable, MRFs regulan estrechamente la actividad de Rb durante la miogénesis en mamíferos (De Falco, Comes, & Simone, 2006; Gu et al., 1993). Análogamente, se observó el reingreso al ciclo celular cuando los mismos miotubos se trasplantaron a blastemas de la extremidad de *N. viridescens* (Kumar, Velloso, Imokawa, & Brockes, 2000; Lo, Allen, & Brockes, 1993). Posteriormente, se observó que núcleos dentro de las miofibras de *N. viridescens* durante la regeneración reingresan efectivamente al ciclo celular, evidenciado por la incorporación de EdU (Calve & Simon, 2011).

De igual manera, nosotros pudimos observar el reingreso al ciclo celular en miofibras de *A. mexicanum* durante la regeneración, evidenciado por la expresión de PCNA (**Figura 7 c'**, **Figura 8 a'-c'** y **Figura 9 A**). Aunque observamos variaciones en la cantidad de núcleos marcados contra PCNA en los cortes parafinados que fueron hibridados contra MyoG o Myf5 (**comparar Figura 7 c' y Figura 8 a'-c'**), no es probable que la marca nuclear sea un artificio de la hibridación acoplada a la inmunofluorescencia ya que la doble inmunofluorescencia contra PCNA y 12/101 en cortes en

congelación también mostraron marca de PCNA en los núcleos de las miofibras (**Figura 9 A**). Estos resultados nos indican que, al igual que en *N. viridescens*, núcleos en las miofibras de *A. mexicanum* pueden reingresar al ciclo celular; sugiriendo que un paso inicial para la desdiferenciación de las miofibras es cumplido.

FRAGMENTACIÓN Y CAMBIOS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES

La habilidad de las miofibras de *Ambystoma punctatum* para fragmentarse en células mononucleares durante la regeneración de la extremidad se observó por microscopía electrónica (E. D. Hay, 1959). Más recientemente, miotubos de *N. viridescens* marcados con Rhodamina-Dextran o por la expresión de la fosfatasa alcalina humana, mediante la transfección con retrovirus, se fragmentan en células mononucleares cuando son trasplantadas a blastemas (Kumar et al., 2000; Lo et al., 1993). Igualmente, miofibras de *Ambystoma maculatum* y de *A. mexicanum*, marcadas con Rojo-Texas-Dextran o Celltracker, se fragmentan al ser trasplantadas a blastemas y espontáneamente en cultivo (Kumar, Velloso, Imokawa, & Brockes, 2004). *In vivo*, miofibras de la cola de *A. mexicanum* marcadas citoplasmáticamente con Rhodamina-Dextran y nuclearmente con Fluoresceína-Dextran (acoplado a una secuencia de localización nuclear) se fragmentan en respuesta a la amputación de la cola (Echeverri, Clarke, & Tanaka, 2001). Nuestros resultados al trasplantar miofibras marcadas con Celltracker replican los efectos observados previamente (A. Kumar et al., 2004) mostrando que las miofibras de *A. mexicanum* pueden fragmentarse *in vivo* en células proliferantes (**Figura 9 B-C**).

Concomitantemente a la fragmentación, deben existir cambios en la expresión de proteínas funcionales de músculo. Estudios de secuenciación masiva e hibridación en microarreglos han probado que la expresión de marcadores de músculo es muy dinámica durante la regeneración (Knapp et al., 2013; J. R. Monaghan et al., 2012; James R Monaghan et al., 2009; Voss et al., 2015; C.-H. Wu, Tsai, Ho, Chen, & Lee, 2013). Nosotros pudimos observar que, en correlación con la fragmentación de las miofibras trasplantadas, las células mononucleares dejaban de expresar el marcador de músculo 12/101 (**Figura 9 C**). Estos resultados sugieren que los requerimientos de fragmentación y cambios de expresión génicos pueden ser cumplidos en las miofibras de *A. mexicanum* para promover su desdiferenciación cuando son trasplantadas al blastema.

Tomando como válida la visión actual de que en *A. mexicanum* existe poca o nula desdiferenciación de las miofibras durante la regeneración, la evidencia de la capacidad para reingresar al ciclo celular (**Figura 7 c'**, **Figura 8 a'-c'** y **Figura 9 A**) y de fragmentarse tanto *in vitro* como *in vivo* (Echeverri et al., 2001; A. Kumar et al., 2004 y figura 9 B-C) sugieren que la habilidad para desdiferenciarse está presente en las miofibras de *A. mexicanum*; el hecho de que no contribuyan en la generación de mioblastos para el blastema se podría explicar por la falta de señales extrínsecas que están presentes en el microambiente del blastema de la extremidad, pero no en el muñón.

Existe evidencia de que el blastema de urodelos crea un microambiente que favorece la desdiferenciación. El trasplante de cardiomiocitos de *N. viridescens* al blastema y no a la extremidad normal reduce su expresión de marcadores de corazón e induce su reingreso al ciclo celular (Laube et al., 2006). Por otro lado, la exposición a extractos de blastema de extremidad de *N. viridescens* a miotubos C2C12 reduce la expresión de marcadores de músculo y de MyoD y MyoG, induce su fragmentación y proliferación en cultivo (McGann, Odelberg, & Keating, 2001). De manera interesante, aunque el extracto de blastema de *N. viridescens* previene la diferenciación de mioblastos primarios e induce la fragmentación de miotubos derivados de ellos, no es capaz de inducir el reingreso al ciclo celular en los miotubos primarios (Kawesa, Vanstone,

& Tsilfidis, 2015) sugiriendo que otros factores intrínsecos de las miofibras, presentes en la línea C2C12, son necesarios para permitir su completa desdiferenciación. Reportes indican que la expresión de factores como Msx1, Msx2, Twist1 y la inactivación (fosforilación) de Rb son necesarios para la adecuada desdiferenciación de miotubos de ratón (Gu et al., 1993; Hjiantonou et al., 2008; Odelberg, Kollhoff, & Keating, 2000; Pajcini, Corbel, Sage, Pomerantz, & Blau, 2010; Yilmaz et al., 2015). De manera congruente, la expresión de Msx1, Msx2, Twist y la inactivación de Rb ocurren durante la regeneración de la extremidad de urodelos (Imokawa et al., 2004; Koshiba, Kuroiwa, Yamamoto, Tamura, & Ide, 1998; Kragl et al., 2013; E. M. Tanaka et al., 1997). Recientemente se ha reportado que la actividad de Caspasa3 es necesaria para la desdiferenciación de miofibras *in vivo* en *N. viridescens* (H. Wang et al., 2015) haciendo interesante especular si es que en *A. mexicanum* la deficiente expresión y/o activación de Caspasa3 es la razón por la que no se desdiferencian las miofibras durante la regeneración.

Por otro lado, la exposición al extracto de blastema de cola del pez *Sternopygus macrurus* no afecta a los miotubos pero reduce parcialmente la expresión de MHC, MyoD y MyoG en mioblastos C2C12, incrementa su proliferación y previene su diferenciación (Kim, Archer, Escobedo, Tapscott, & Unguez, 2008). Notoriamente, en *S. macrurus*, parece que los mioblastos son derivados de células Pax7+ y no por desdiferenciación (Weber et al., 2012). Por lo que es probable que el blastema de urodelos contenga factores específicos que promuevan la desdiferenciación.

Toda esta evidencia sugiere fuertemente que las miofibras de *A. mexicanum* deberían ser capaces de desdiferenciarse durante la regeneración de la extremidad y proveer de progenitores musculares al blastema como sucede en *N. viridescens*. No obstante, es posible que factores intrínsecos en las miofibras (eg. Caspasa3 inactiva) o extrínsecos (eg. inductores en el blastema y/o inhibidores en el muñón) no permitan la desdiferenciación de las miofibras. Ensayos de desdiferenciación de miotubos/miofibras de distintas especies en cultivo con extractos de blastema/extremidad normal de *A. mexicanum* y *N. viridescens*, así como estudios comparativos del transcriptoma, proteoma y secretoma de estas especies son necesarios para poder entender el proceso de desdiferenciación adecuadamente.

Debido a que era común observar la presencia de células mononucleares marcadas con Celltracker en las extremidades trasplantadas desde las 2 horas en nuestros experimentos (**Figura 9 B**), no podemos descartar la posibilidad de que nuestros resultados sean el reflejo de la presencia de posibles mioblastos u otros tipos celulares. Es por esto que otros tipos de marcaje más sensibles y confiables deberán ser usados para corroborar estos resultados. Recientemente, diversas técnicas para la transgénesis de reporteros tejido específico e inducibles se han podido implementar efectivamente en urodelos, las cuales son maneras más confiables para el seguimiento del destino celular (Morrison et al., 2007; Sandoval-Guzmán et al., 2014; H. V. Tanaka et al., 2016; Whited, Lehoczy, & Tabin, 2012).

CONCLUSIÓN

En este trabajo, quisimos determinar si los MRFs participan en la determinación y diferenciación de los progenitores musculares durante la regeneración de *A. mexicanum*. Pudimos determinar que i) MyoG se expresa en el músculo adulto, así como en los progenitores del blastema. Mientras que Myf5 sólo se expresa transitoriamente en los progenitores. ii) La expresión de Myf5 se correlaciona con la expresión del marcador de proliferación (PCNA) y no con el de diferenciación (12/101), sugiriendo que mantiene su función de determinación de mioblastos en expansión. Por

otra parte, MyoG se coexpresa con ambos marcadores sugiriendo que, de mantener su función su función clásica de diferenciación terminal de miocitos, debe existir algún tipo de regulación negativa en los progenitores musculares que les permita mantener su estado indiferenciado.

Adicionalmente, pudimos observar el reingreso al ciclo celular en miofibras de la extremidad y su desdiferenciación al ser trasplantadas al blastema, sugiriendo que las miofibras de *A. mexicanum* tienen la capacidad latente de desdiferenciarse aun cuando esto no se observa de manera normal durante la regeneración. El entendimiento de los programas que regulan el estado de diferenciación en sistemas regenerativos naturales, como es el caso de los MRFs al linaje muscular, proveerá de valiosa información a las áreas de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

REFERENCIAS

- Agata, K., Saito, Y., & Nakajima, E. (2007). Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Development Growth and Differentiation*, *49*(2), 73–78. <http://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00919.x>
- Aoi, S., Shimotake, T., Tsuda, T., Deguchi, E., & Iwai, N. (2005). Impaired expression of myogenic regulatory molecules in the pelvic floor muscles of murine embryos with anorectal malformations. *Journal of Pediatric Surgery*, *40*(5), 805–809. <http://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2005.01.047>
- Banfi, S., Monti, L., Acquati, F., Tettamanti, G., de Eguileor, M., & Grimaldi, A. (2012). Muscle development and differentiation in the urodele *Ambystoma mexicanum*. *Development, Growth & Differentiation*, *54*(4), 489–502. <http://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01338.x>
- Beauchamp, J. R., Heslop, L., Yu, D. S. W., Tajbakhsh, S., Kelly, R. G., Wernig, A., ... Zammit, P. S. (2000). Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Biology*, *151*(6), 1221–1233. <http://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1221>
- Beck, C. W., Belmonte, J. C. I., & Christen, B. (2009). Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. *Developmental Dynamics*, *238*(6), 1226–1248. <http://doi.org/10.1002/dvdy.21890>
- Becker, C., Della Gaspera, B., Guyot, M., Donsez, E., Armand, A. S., Charbonnier, F., ... Chanoine, C. (2003). Expression of MRF4 protein in adult and in regenerating muscles in *Xenopus*. *Developmental Dynamics*, *227*(3), 445–449. <http://doi.org/10.1002/dvdy.10318>
- Bénazet, J. D., & Zeller, R. (2009). Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(4), 1–14. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a001339>
- Bergstrom, D. A., & Tapscott, S. J. (2001). Molecular Distinction between Specification and Differentiation in the Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family Molecular Distinction between Specification and Differentiation in the Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, *21*(7), 2404–2412. <http://doi.org/10.1128/MCB.21.7.2404>
- Bhagwati, S., Ghatpande, A., Shafiq, S., & Leung, B. (1996). In Situ Hybridization Analysis for expression of Myogenic Regulatory Factors in Regenerating Muscle of mdx Mouse. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *55*(5), 509–514.
- Bioresi, S., Bjornson, C. R. R., Carlig, P. M. M., Nishijo, K., Keller, C., & Rando, T. A. (2013). Myf5 expression during fetal myogenesis defines the developmental progenitors of adult satellite cells. *Developmental Biology*, *379*(2), 195–207. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.021>
- Bober, E., Lyons, G. E., Braun, T., Cossu, G., Buckingham, M., & Arnold, H. (1991). The Muscle Regulatory

- Gene, Myf-6, Has a Biphasic Pattern of Expression during Early Mouse Development. *Journal of Cell Biology*, 113(6), 1255–1265.
- Braun, T., Bober, E., Rudnicki, M. a, Jaenisch, R., & Arnold, H. H. (1994). MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. *Development (Cambridge, England)*, 120(11), 3083–3092. <http://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Buckingham, M., & Relaix, F. (2015). PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.09.017>
- Buckingham, M., & Rigby, P. W. J. (2014). Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. *Developmental Cell*, 28(3), 225–238. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.020>
- Calve, S., & Simon, H. G. (2011). High resolution three-dimensional imaging: Evidence for cell cycle reentry in regenerating skeletal muscle. *Developmental Dynamics*, 240(5), 1233–1239. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22530>
- Cavaco Rodrigues, A. M., Christen, B., Marti, M., & Izpisua Belmonte, J. C. (2012). Skeletal muscle regeneration in *Xenopus* tadpoles and zebrafish larvae. *BMC Developmental Biology*, 12(1), 9. <http://doi.org/10.1186/PREACCEPT-1187828422620147>
- Chapman, H. a., Vaughan, A. E., Brumwell, A. N., Xi, Y., Gotts, J. E., Brownfield, D. G., ... Rock, J. R. (2015). Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after major injury. *Nature*, 517(7536), 621–5. <http://doi.org/10.1038/nature14112>
- Charbonnier, F., Gaspera, B. Della, Armand, A. S., Van Der Laarse, W. J., Launay, T., Becker, C., ... Chanoine, C. (2002). Two myogenin-related genes are differentially expressed in *Xenopus laevis* myogenesis and differ in their ability to transactivate muscle structural genes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1139–1147. <http://doi.org/10.1074/jbc.M107018200>
- Chen, Y.-H., Wang, Y.-H., Chang, M.-Y., Lin, C.-Y., Weng, C.-W., Westerfield, M., & Tsai, H.-J. (2007). Multiple upstream modules regulate zebrafish myf5 expression. *BMC Developmental Biology*, 7(5), 1. <http://doi.org/10.1186/1471-213X-7-1>
- Clever, J. L., Sakai, Y., Wang, R. a, & Schneider, D. B. (2010). Inefficient skeletal muscle repair in inhibitor of differentiation knockout mice suggests a crucial role for BMP signaling during adult muscle regeneration. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 298(33), C1087–C1099. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00388.2009>
- Comai, G., & Tajbakhsh, S. (2014). *Chapter One - Molecular and Cellular Regulation of Skeletal Myogenesis. bHLH Transcription Factors in Development and Disease* (Vol. Volume 110). <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405943-6.00001-4>
- Cossu, G., & Biressi, S. (2005). Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: Possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16(4-5), 623–631. <http://doi.org/10.1016/j.semcd.2005.07.003>
- Crist, C. G., Montarras, D., & Buckingham, M. (2012). Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell*, 11(1), 118–126. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2012.03.011>
- Cruz, I. A., Kappedal, R., Mackenzie, S. M., Hailey, D. W., Hoffman, T. L., Schilling, T. F., & Raible, D. W. (2015). Robust regeneration of adult zebrafish lateral line hair cells reflects continued precursor pool maintenance. *Developmental Biology*, 402(2), 229–238. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.03.019>
- Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51(6), 987–1000. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-X](http://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-X)
- De Falco, G., Comes, F., & Simone, C. (2006). pRb: master of differentiation. Coupling irreversible cell cycle

- withdrawal with induction of muscle-specific transcription. *Oncogene*, 25(38), 5244–5249. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209623>
- Della Gaspera, B., Armand, A. S., Sequeira, I., Chesneau, A., Mazabraud, A., Lécolle, S., ... Chanoine, C. (2012). Myogenic waves and myogenic programs during *Xenopus* embryonic myogenesis. *Developmental Dynamics*, 241(5), 995–1007. <http://doi.org/10.1002/dvdy.23780>
- Diep, C. Q., Ma, D., Deo, R. C., Holm, T. M., Naylor, R. W., Arora, N., ... Davidson, A. J. (2011). Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish. *Nature*, 470(7332), 95–100. <http://doi.org/10.1038/nature09669>
- Echeverri, K., Clarke, J. D., & Tanaka, E. M. (2001). In vivo imaging indicates muscle fiber dedifferentiation is a major contributor to the regenerating tail blastema. *Developmental Biology*, 236(1), 151–64. <http://doi.org/10.1006/dbio.2001.0312>
- Endo, T., Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2004). A stepwise model system for limb regeneration. *Developmental Biology*, 270(1), 135–145. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.016>
- Español-Suñer, R., Carpentier, R., Van Hul, N., Legry, V., Achouri, Y., Cordi, S., ... Leclercq, I. A. (2012). Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology*, 143(6), 1564–1575. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.024>
- Fei, J. F., Schuez, M., Tazaki, A., Taniguchi, Y., Roensch, K., & Tanaka, E. M. (2014). CRISPR-mediated genomic deletion of Sox2 in the axolotl shows a requirement in spinal cord neural stem cell amplification during tail regeneration. *Stem Cell Reports*, 3(3), 444–459. <http://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.06.018>
- Florian Bentzinger, C., Wang, Y. X., & Rudnicki, M. A. (2012). Building muscle: Molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(2). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a008342>
- Flowers, G. P., Timberlake, A. T., McLean, K. C., Monaghan, J. R., & Crews, C. M. (2014). Highly efficient targeted mutagenesis in axolotl using Cas9 RNA-guided nuclease. *Development (Cambridge, England)*, 141(10), 2165–71. <http://doi.org/10.1242/dev.105072>
- Fröbisch, N. B. (2008). Ossification patterns in the tetrapod limb - Conservation and divergence from morphogenetic events. *Biological Reviews*, 83(4), 571–600. <http://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00055.x>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified Tissue International*, 96(3), 183–195. <http://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Gaspera, B. Della, Sequeira, I., Charbonnier, F., Becker, C., Shi, D. L., & Chanoine, C. (2006). Spatio-temporal expression of MRF4 transcripts and protein during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Developmental Dynamics*, 235(2), 524–529. <http://doi.org/10.1002/dvdy.20628>
- Gayraud-Morel, B., Chrétien, F., Flamant, P., Gomès, D., Zammit, P. S., & Tajbakhsh, S. (2007). A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Developmental Biology*, 312(1), 13–28. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.059>
- Gayraud-Morel, B., Chrétien, F., Jory, A., Sambasivan, R., Negroni, E., Flamant, P., ... Tajbakhsh, S. (2012). Myf5 haploinsufficiency reveals distinct cell fate potentials for adult skeletal muscle stem cells. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 7), 1738–49. <http://doi.org/10.1242/jcs.097006>
- González-Rosa, J. M., Peralta, M., & Mercader, N. (2012). Pan-epicardial lineage tracing reveals that epicardium derived cells give rise to myofibroblasts and perivascular cells during zebrafish heart regeneration. *Developmental Biology*, 370(2), 173–186. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.007>
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 221–

4. <http://doi.org/10.1093/molbev/msp259>

- Gu, W., Schneider, J., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V., & Nadal-Ginard, B. (1993). Interaction of Myogenic Factors and the Retinoblastoma Protein Mediates Muscle Cell Commitment and Differentiation. *Cell*, 72(February), 309–324.
- Gundersen, K., & Merlie, J. P. (1994). Id-1 as a possible transcriptional mediator of muscle disuse atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), 3647–51. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=43638&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gundersen, K., Rabben, I., Klocke, B. J., & Merlie, J. P. (1995). Overexpression of myogenin in muscles of transgenic mice: interaction with Id-1, negative crossregulation of myogenic factors, and induction of extrasynaptic acetylcholine receptor expression. *Molecular and Cellular Biology*, 15(12), 7127–7134.
- Günther, S., Kim, J., Kostin, S., Lepper, C., Fan, C., & Braun, T. (2013). Myf5-Positive Satellite Cells Contribute to Pax7-Dependent Long-Term Maintenance of Adult Muscle Stem Cells Supplementary Figures. *Cell Stem Cell*, 13(0), 590–601. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.07.016>
- Gurevich, D., Siegel, A., & Currie, P. D. (2014). Skeletal myogenesis in the zebrafish and its implications for muscle disease modelling. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 56, 49–76. http://doi.org/10.1007/978-3-662-44608-9_3
- Harvey, R. P. (1990). The Xenopus MyoD gene: an unlocalised maternal mRNA predates lineage-restricted expression in the early embryo. *Development (Cambridge, England)*, 108(4), 669–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2167198>
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J., Edmonson, D., Venuti, J., Olson, E., & Klein, W. H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*, 364, 501–506.
- Hay, E. D. (1959). Electron microscopic observations of muscle dedifferentiation in regenerating Amblystoma limbs. *Developmental Biology*, 1(6), 555–585. [http://doi.org/10.1016/0012-1606\(59\)90018-1](http://doi.org/10.1016/0012-1606(59)90018-1)
- Hay, E., & Fischman, D. (1961). Origin of the blastema in regenerating limbs of the newt Triturus viridescens. An autoradiographic study using tritiated thymidine to follow cell proliferation and migration. *Developmental Biology*, (3), 26–59.
- Hayashi, T., Yokotani, N., Tane, S., Matsumoto, A., Myouga, A., Okamoto, M., & Takeuchi, T. (2013). Molecular genetic system for regenerative studies using newts. *Development Growth and Differentiation*, 55(2), 229–236. <http://doi.org/10.1111/dgd.12019>
- Hinits, Y., Osborn, D. P. S., Carvajal, J. J., Rigby, P. W. J., & Hughes, S. M. (2007). Mrf4 (myf6) is dynamically expressed in differentiated zebrafish skeletal muscle. *Gene Expression Patterns*, 7(7), 738–745. <http://doi.org/10.1016/j.modgep.2007.06.003>
- Hinits, Y., Osborn, D. P. S., & Hughes, S. M. (2009). Differential requirements for myogenic regulatory factors distinguish medial and lateral somitic, cranial and fin muscle fibre populations. *Development (Cambridge, England)*, 136(3), 403–14. <http://doi.org/10.1242/dev.028019>
- Hinits, Y., Williams, V. C., Sweetman, D., Donn, T. M., Ma, T. P., Moens, C. B., & Hughes, S. M. (2011). Defective cranial skeletal development, larval lethality and haploinsufficiency in Myod mutant zebrafish. *Developmental Biology*, 358(1), 102–112. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.07.015>
- Hinterberger, T. J. (2010). A conserved MRF4 promoter drives transgenic expression in Xenopus embryonic somites and adult muscle. *International Journal of Developmental Biology*, 54(4), 617–625. <http://doi.org/10.1387/ijdb.082715th>

- Hinterberger, T., Sassoon, D., Rhodes, S., & Konieczny, S. F. (1991). Expression of the Muscle Regulatory Factor MRF4 during Somite and Skeletal Myofiber Development. *Developmental Biology*, *147*, 144–156.
- Hirst, C. E., & Marcelle, C. (2015). The avian embryo as a model system for skeletal myogenesis. *Results and Problems in Cell Differentiation*, *56*, 99–122. http://doi.org/10.1007/978-3-662-44608-9_5
- Hjiantoniou, E., Anayasa, M., Nicolaou, P., Bantounas, I., Saito, M., Iseki, S., ... Phylactou, L. A. (2008). Twist induces reversal of myotube formation. *Differentiation*, *76*(2), 182–192. <http://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00195.x>
- Hopwood, N. D., Pluck, a, & Gurdon, J. B. (1989). MyoD expression in the forming somites is an early response to mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *The EMBO Journal*, *8*(11), 3409–3417. [http://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90157-1](http://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90157-1)
- Imokawa, Y., Gates, P. B., Chang, Y. T., Simon, H. G., & Brockes, J. P. (2004). Distinctive expression of Myf5 in relation to differentiation and plasticity of newt muscle cells. *International Journal of Developmental Biology*, *48*(4), 285–291. <http://doi.org/10.1387/ijdb.031787yi>
- Islam, M. R., Nakamura, K., Casco-Robles, M. M., Kunahong, A., Inami, W., Toyama, F., ... Chiba, C. (2014). The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration. *Scientific Reports*, *4*, 6043. <http://doi.org/10.1038/srep06043>
- Jopling, C., Boue, S., & Izpisua Belmonte, J. C. (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *12*(2), 79–89. <http://doi.org/10.1038/nrm3043>
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., & Izpisúa Belmonte, J. C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, *464*(7288), 606–9. <http://doi.org/10.1038/nature08899>
- Kablar, B., Krastel, K., Tajbakhsh, S., & Rudnicki, M. A. (2003). Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. *Developmental Biology*, *258*(2), 307–318. [http://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00139-8](http://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00139-8)
- Kablar, B., Krastel, K., Ying, C., Asakura, a, Tapscott, S. J., & Rudnicki, M. a. (1997). MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development (Cambridge, England)*, *124*(23), 4729–4738.
- Kanisicak, O., Mendez, J. J., Yamamoto, S., Yamamoto, M., & Goldhamer, D. J. (2009). Progenitors of skeletal muscle satellite cells express the muscle determination gene, MyoD. *Developmental Biology*, *332*(1), 131–141. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.05.554>
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomés, D., Rocancourt, D., Buckingham, M. E., Shinin, V., & Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:MyoD double-mutant mice. *Nature*, *431*(September), 466–471.
- Kawesa, S., Vanstone, J., & Tsilfidis, C. (2015). A differential response to newt regeneration extract by C2C12 and primary mammalian muscle cells. *Skeletal Muscle*, *5*(1), 19. <http://doi.org/10.1186/s13395-015-0044-8>
- Kidd, G. J., Ohno, N., & Trapp, B. D. (2013). Chapter 5 - Biology of Schwann cells. *Handbook of Clinical Neurology, Volume 115*, 55–79. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-52902-2.00005-9>
- Kikuchi, K., Gupta, V., Wang, J., Holdway, J. E., Wills, A. A., Fang, Y., & Poss, K. D. (2011). Tcf21+ Epicardial Cells Adopt Non-Myocardial Fates During Zebrafish Heart Development and Regeneration. *Development*, *138*(14), 2895–2902. <http://doi.org/10.1242/dev.067041>
- Kikuchi, K., Holdway, J. E., Werdich, A. A., Anderson, R. M., Fang, Y., Egnaczyk, G. F., ... Poss, K. D. (2010). Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature*, *464*(7288),

601–5. <http://doi.org/10.1038/nature08804>

- Kim, H. J., Archer, E., Escobedo, N., Tapscott, S. J., & Unguez, G. A. (2008). Inhibition of mammalian muscle differentiation by regeneration blastema extract of *Sternopygus macrurus*. *Developmental Dynamics*, 237(10), 2830–2843. <http://doi.org/10.1002/dvdy.21702>
- Kitzmann, M., Carnac, G., Vandromme, M., Primig, M., Lamb, N. J. C., & Fernandez, A. (1998). The muscle regulatory factors MyoD and Myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *Journal of Cell Biology*, 142(6), 1447–1459. <http://doi.org/10.1083/jcb.142.6.1447>
- Knapp, D., Schulz, H., Rascon, C. A., Volkmer, M., Scholz, J., Nacu, E., ... Tanaka, E. M. (2013). Comparative Transcriptional Profiling of the Axolotl Limb Identifies a Tripartite Regeneration-Specific Gene Program. *PLoS ONE*, 8(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0061352>
- Knopf, F., Hammond, C., Chekuru, A., Kurth, T., Hans, S., Weber, C. W., ... Weidinger, G. (2011). Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. *Developmental Cell*, 20(5), 713–724. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.014>
- Koshiba, K., Kuroiwa, A., Yamamoto, H., Tamura, K., & Ide, H. (1998). Expression of Msx genes in regenerating and developing limbs of axolotl. *Journal of Experimental Zoology*, 282(6), 703–714. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19981215\)282:6<703::AID-JEZ6>3.0.CO;2-P](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19981215)282:6<703::AID-JEZ6>3.0.CO;2-P)
- Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H. H., & Tanaka, E. M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, 460(7251), 60–65. <http://doi.org/10.1038/nature08152>
- Kragl, M., Roensch, K., Nüsslein, I., Tazaki, A., Taniguchi, Y., Tarui, H., ... Tanaka, E. M. (2013). Muscle and connective tissue progenitor populations show distinct Twist1 and Twist3 expression profiles during axolotl limb regeneration. *Developmental Biology*, 373(1), 196–204. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.10.019>
- Kraus, B., & Pette, D. (1997). Quantification of MyoD, myogenin, MRF4 and Id-1 by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in rat muscles. *European Journal of Biochemistry*, 106, 98–106.
- Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J., & Brand, M. (2011). Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development*, 138(22), 4831–4841. <http://doi.org/10.1242/dev.072587>
- Kumar, a, Velloso, C. P., Imokawa, Y., & Brockes, J. P. (2000). Plasticity of retrovirus-labelled myotubes in the newt limb regeneration blastema. *Developmental Biology*, 218(2), 125–136. <http://doi.org/10.1006/dbio.1999.9569>
- Kumar, A., & Simon, A. (2015). *Salamanders in Regeneration Research*. Springer Science. <http://doi.org/10.1007-978-1-4939-2495-0>
- Kumar, A., Velloso, C. P., Imokawa, Y., & Brockes, J. P. (2004). The regenerative plasticity of isolated urodele myofibers and its dependence on Msx1. *PLoS Biology*, 2(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020218>
- Lagha, M., Mayeuf-Louchart, A., Chang, T., Montarras, D., Rocancourt, D., Zalc, A., ... Relaix, F. (2013). Itm2a Is a Pax3 Target Gene, Expressed at Sites of Skeletal Muscle Formation In Vivo. *PLoS ONE*. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0063143>
- Langlands, K., Yin, X., Anandi, G., & Prochownik, E. V. (1997). Differential interactions of Id proteins with basic helix loop helix transcription factors. *J. Biol. Chem*, 272(32), 19785–19793. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.32.19785>
- Laube, F., Heister, M., Scholz, C., Borchardt, T., & Braun, T. (2006). Re-programming of newt cardiomyocytes is induced by tissue regeneration. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 22), 4719–4729. <http://doi.org/10.1242/jcs.03252>

- Launay, T., Armand, A., Charbonnier, F., Mira, J.-C., Donsez, E., Gallien, C. L., & Chanoine, C. (2001). Neural and Hormonal Control of Expression of Myogenic Regulatory Factor Genes During Regeneration of Mouse Soleus. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *49*(7), 887–899.
- Lehoczky, J. a., Robert, B., & Tabin, C. J. (2011). Mouse digit tip regeneration is mediated by fate-restricted progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(51), 20609–20614. <http://doi.org/10.1073/pnas.1118017108>
- Lehoczky, J. a., & Tabin, C. J. (2015). Lgr6 marks nail stem cells and is required for digit tip regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *2015*, 201518874. <http://doi.org/10.1073/pnas.1518874112>
- Lindon, C., Montarras, D., & Pinset, C. (1998). Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. *Journal of Cell Biology*, *140*(1), 111–118. <http://doi.org/10.1083/jcb.140.1.111>
- Liu, K. J., & Harland, R. M. (2003). Cloning and characterization of *Xenopus* Id4 reveals differing roles for Id genes. *Developmental Biology*, *264*(2), 339–351. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.08.017>
- Lo, D. C., Allen, F., & Brockes, J. P. (1993). Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(15), 7230–7234. <http://doi.org/10.1073/pnas.90.15.7230>
- McGann, C. J., Odelberg, S. J., & Keating, M. T. (2001). Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(24), 13699–13704. <http://doi.org/10.1073/pnas.221297398>
- McHedlishvili, L., Epperlein, H. H., Telzerow, A., & Tanaka, E. M. (2007). A clonal analysis of neural progenitors during axolotl spinal cord regeneration reveals evidence for both spatially restricted and multipotent progenitors. *Development (Cambridge, England)*, *134*(11), 2083–2093. <http://doi.org/10.1242/dev.02852>
- Meadows, E., Cho, J. H., Flynn, J. M., & Klein, W. H. (2008). Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Developmental Biology*, *322*(2), 406–414. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.024>
- Meadows, E., Flynn, J. M., & Klein, W. H. (2011). Myogenin regulates exercise capacity but is dispensable for skeletal muscle regeneration in adult mdx mice. *PLoS ONE*, *6*(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016184>
- Megeney, L., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E., & Rudnicki, M. (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes & Development*, *10*(10), 1173–1183. <http://doi.org/10.1101/gad.10.10.1173>
- Melnikova, I. N., Bounpheng, M., Schatterman, G. C., Gilliam, D., & Christy, B. a. (1999). Differential biological activities of mammalian Id proteins in muscle cells. *Experimental Cell Research*, *247*(1), 94–104. <http://doi.org/10.1006/excr.1998.4330>
- Messina, G., & Cossu, G. (2009). The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7. *Genes and Development*, *23*(8), 902–905. <http://doi.org/10.1101/gad.1797009>
- Milner, D. J., & Cameron, A. (2013). Muscle Repair and Regeneration: Stem Cells, Scaffolds, and the Contributions of Skeletal Muscle to Amphibian Limb Regeneration. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *367*(December), 133–159. http://doi.org/10.1007/82_2012_292
- Mira, J.-C., Nicolas, N., Gallien, C. L., & Chanoine, C. (2000). Neural and Hormonal Control of Expression of Myogenic Regulatory Factor Genes During Regeneration of *Xenopus* Fast Muscles: Myogenin and MRF4 mRNA Accumulation Are Neurally Regulated Oppositely. *Developmental Dynamics*, *218*, 112–122.

- Monaghan, J. R., Athippozhy, a., Seifert, a. W., Putta, S., Stromberg, a. J., Maden, M., ... Voss, S. R. (2012). Gene expression patterns specific to the regenerating limb of the Mexican axolotl. *Biology Open*, 1(10), 937–948. <http://doi.org/10.1242/bio.20121594>
- Monaghan, J. R., Epp, L. G., Putta, S., Page, R. B., Walker, J. a, Beachy, C. K., ... Voss, S. R. (2009). Microarray and cDNA sequence analysis of transcription during nerve-dependent limb regeneration. *BMC Biology*, 7, 1. <http://doi.org/10.1186/1741-7007-7-1>
- Moncaut, N., Rigby, P. W. J., Carvajal, J. J., Shelton, M., Metz, J., Liu, J., ... Campbell, P. J. (2013). Dial M(RF) for myogenesis. *FEBS Journal*2, 3280(1), 3980–3990. <http://doi.org/10.1111/febs.12379>
- Montarras, D., L'Honoré, A., & Buckingham, M. (2013). Lying low but ready for action: The quiescent muscle satellite cell. *FEBS Journal*, 280(17), 4036–4050. <http://doi.org/10.1111/febs.12372>
- Morrison, J. I., Borg, P., & Simon, A. (2010). Plasticity and recovery of skeletal muscle satellite cells during limb regeneration. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24, 750–756. <http://doi.org/10.1096/fj.09-134825>
- Morrison, J. I., Lööf, S., He, P., Aleström, P., Collas, P., & Simon, A. (2007). Targeted gene delivery to differentiated skeletal muscle: A tool to study dedifferentiation. *Developmental Dynamics*, 236(2), 481–488. <http://doi.org/10.1002/dvdy.21019>
- Morrison, J. I., Lööf, S., He, P., & Simon, A. (2006). Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population. *Journal of Cell Biology*, 172(3), 433–440. <http://doi.org/10.1083/jcb.200509011>
- Muñoz, R., Edwards-Faret, G., Moreno, M., Zuñiga, N., Cline, H., & Larraín, J. (2014). Regeneration of *Xenopus laevis* spinal cord requires Sox2/3 expressing cells. *Developmental Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.03.009>
- Murphy, M., & Kardon, G. (2011). *Origin of vertebrate limb muscle: The role of progenitor and myoblast populations*. *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 96). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-385940-2.00001-2>
- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., & Nabeshima, Y. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*, 364, 53–535.
- Nacu, E., Gromberg, E., Oliveira, C. R., Drechsel, D., & Tanaka, E. M. (2016). FGF8 and SHH substitute for anterior–posterior tissue interactions to induce limb regeneration. *Nature*, 1. <http://doi.org/10.1038/nature17972>
- Nacu, E., & Tanaka, E. M. (2011). Limb Regeneration: A New Development? *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 409–440. <http://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154115>
- Nicolas, N., Gallien, C. L., & Chanoine, C. (1996). Analysis of MyoD, myogenin, and muscle-specific gene mRNAs in regenerating *Xenopus* skeletal muscle. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 207(1), 60–8. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199609\)207:1<100::AID-AJA9>3.0.CO;2-M](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199609)207:1<100::AID-AJA9>3.0.CO;2-M)
- Nicolas, N., Mira, J.-C., Gallien, C. L., & Chanoine, C. (1997). Localization of Myf-5, MRF4 and a cardiac actin mRNAs in regenerating *Xenopus* skeletal muscle. *Académie Des Sciences*, 355–364.
- Odelberg, S. J., Kollhoff, A., & Keating, M. T. (2000). Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell*, 103(7), 1099–1109. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00212-9](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00212-9)
- Ott, M. O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., & Buckingham, M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development*, 111(4), 1097–1107.
- Pajcini, K. V., Corbel, S. Y., Sage, J., Pomerantz, J. H., & Blau, H. M. (2010). Transient inactivation of Rb and

- ARF yields regenerative cells from postmitotic mammalian muscle. *Cell Stem Cell*, 7(2), 198–213. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.05.022>
- Picard, C. A., & Marcelle, C. (2013). Two distinct muscle progenitor populations coexist throughout amniote development. *Developmental Biology*, 373(1), 141–148. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.10.018>
- Ralli re, C., Chauvign e, F., & Rescan, P.-Y. (2004). The genes for the helix-loop-helix proteins Id6a, Id6b, Id1 and Id2 are specifically expressed in the ventral and dorsal domains of the fish developing somites. *The Journal of Experimental Biology*, 207(Pt 15), 2679–84. <http://doi.org/10.1242/jeb.01088>
- Raveh-Amit, H., Berzsenyi, S., Vas, V., Ye, D., & Dinnyes, A. (2013). Tissue resident stem cells: Till death do us part. *Biogerontology*, 14(6), 573–590. <http://doi.org/10.1007/s10522-013-9469-9>
- Rawls, a, Valdez, M. R., Zhang, W., Richardson, J., Klein, W. H., & Olson, E. N. (1998). Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development (Cambridge, England)*, 125(13), 2349–2358.
- Rescan, P. Y. (1997). Identification in a fish species of two Id (inhibitor of DNA binding/differentiation)-related helix-loop-helix factors expressed in the slow oxidative muscle fibers. *European Journal of Biochemistry*, 247(3), 870–876. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00870.x>
- Rhodes, S. J., & Konieczny, S. F. (1989). Identification of MRF4: A new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes and Development*, 3(12 B), 2050–2061. <http://doi.org/10.1101/gad.3.12b.2050>
- Rinkevich, Y., Lindau, P., Ueno, H., Longaker, M. T., & Weissman, I. L. (2011). Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. *Nature*, 476(7361), 409–13. <http://doi.org/10.1038/nature10346>
- Rodrigo-Torres, D., Aff o, S., Coll, M., Morales-Ibanez, O., Mill an, C., Blaya, D., ... Sancho-Bru, P. (2014). The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. *Hepatology*, 60(4), 1367–1377. <http://doi.org/10.1002/hep.27078>
- Rossi, G., & Messina, G. (2014). Comparative myogenesis in teleosts and mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1604-5>
- Roy, K., De La Serna, I. L., & Imbalzano, A. N. (2002). The myogenic basic helix-loop-helix family of transcription factors shows similar requirements for SWI/SNF chromatin remodeling enzymes during muscle differentiation in culture. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 33818–33824. <http://doi.org/10.1074/jbc.M205159200>
- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N. J., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., & Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, 75(7), 1351–1359. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90621-V](http://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90621-V)
- Rudnicki, M., Braun, T., Hinuma, S., & Jaenisch, R. (1992). Inactivation of MyoD in Mice Leads to Up-Regulation of the Myogenic HLH Gene Myf-5 and Results in Apparently Normal Muscle Development. *Cell*, 71(October), 383–390.
- Sabillo, A., Ramirez, J., & Domingo, C. R. (2016). Making muscle: Morphogenetic movements and molecular mechanisms of myogenesis in *Xenopus laevis*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.02.006>
- Sambasivan, R., Comai, G., Le Roux, I., Gom??s, D., Konge, J., Dumas, G., ... Tajbakhsh, S. (2013). Embryonic founders of adult muscle stem cells are primed by the determination gene Mrf4. *Developmental Biology*, 381(1), 241–255. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.018>
- Sandoval-Guzm an, T., Wang, H., Khattak, S., Schuez, M., Roensch, K., Nacu, E., ... Simon, A. (2014). Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell Stem Cell*, 14(2), 174–187.

<http://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.007>

- Santini, M. P., Forte, E., Harvey, R. P., & Kovacic, J. C. (2016). Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells. *Development*, *143*(8), 1242–1258. <http://doi.org/10.1242/dev.111591>
- Sassoon, D. A., Lyons, G. E., Wright, W. E., Lin, V., Lassar, A. B., Weintraub, H., & Buckingham, M. E. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature*, *341*, 303–307.
- Satoh, A., Ide, H., & Tamura, K. (2005). Muscle formation in regenerating *Xenopus* froglet limb. *Developmental Dynamics*, *233*(2), 337–346. <http://doi.org/10.1002/dvdy.20349>
- Schaub, J. R., Malato, Y., Gormond, C., & Willenbring, H. (2014). Report Evidence against a Stem Cell Origin of New Hepatocytes in a Common Mouse Model of Chronic Liver Injury. *CellReports*, *8*(4), 933–939. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.003>
- Schnapp, E., Pistocchi, A. S., Karampetsou, E., Foglia, E., Lamia, C. L., Cotelli, F., & Cossu, G. (2009). Induced early expression of mrf4 but not myog rescues myogenesis in the myod/myf5 double-morphant zebrafish embryo. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 4), 481–488. <http://doi.org/10.1242/jcs.038356>
- Seger, C., Hargrave, M., Wang, X., Chai, R. J., Elworthy, S., & Ingham, P. W. (2011). Analysis of Pax7 expressing myogenic cells in zebrafish muscle development, injury, and models of disease. *Developmental Dynamics*, *240*(11), 2440–2451. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22745>
- Senyo, S. E., Steinhäuser, M. L., Pizzimenti, C. L., Yang, V. K., Cai, L., Wang, M., ... Lee, R. T. (2012). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, *493*(7432), 433–436. <http://doi.org/10.1038/nature11682>
- Shefer, G., & Yablonka-Reuveni, Z. (2007). Reflections on lineage potential of skeletal muscle satellite cells: Do they sometimes go MAD? *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.*, *17*(1), 13–29.
- Shimizu-Nishikawa, K., Tazawa, I., Uchiyama, K., & Yoshizato, K. (1999). Expression of helix-loop-helix type negative regulators of differentiation during limb regeneration in urodeles and anurans. *Development Growth and Differentiation*, *41*(6), 731–743. <http://doi.org/10.1046/j.1440-169X.1999.00477.x>
- Siegel, A. L., Gurevich, D. B., & Currie, P. D. (2013). A myogenic precursor cell that could contribute to regeneration in zebrafish and its similarity to the satellite cell. *FEBS Journal*, *280*(17), 4074–4088. <http://doi.org/10.1111/febs.12300>
- Simon, H. G., Nelson, C., Goff, D., Laufer, E., Morgan, B. a, & Tabin, C. (1995). Differential expression of myogenic regulatory genes and Msx-1 during dedifferentiation and redifferentiation of regenerating amphibian limbs. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *202*, 1–12. <http://doi.org/10.1002/aja.1002020102>
- Smith, T. H., Kachinsky, A. M., & Miller, J. B. (1994). Somite subdomains, muscle cell origins, and the four muscle regulatory factor proteins. *Journal of Cell Biology*, *127*(1), 95–105. <http://doi.org/10.1083/jcb.127.1.95>
- Stewart, S., & Stankunas, K. (2012). Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. *Developmental Biology*, *365*(2), 339–349. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.02.031>
- Stocum, D. L., & Cameron, J. A. (2011). Looking proximally and distally: 100 years of limb regeneration and beyond. *Developmental Dynamics*, *240*(5), 943–968. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22553>
- Summerbell, D., Ashby, P. R., Coutelle, O., Cox, D., Yee, S., & Rigby, P. W. (2000). The expression of Myf5 in the developing mouse embryo is controlled by discrete and dispersed enhancers specific for particular populations of skeletal muscle precursors. *Development (Cambridge, England)*, *127*(17), 3745–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934019>

- Summerbell, D., Halai, C., & Rigby, P. W. J. (2002). Expression of the myogenic regulatory factor Mrf4 precedes or is contemporaneous with that of Myf5 in the somitic bud. *Mechanisms of Development*, 117(1-2), 331–335. [http://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00208-3](http://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00208-3)
- Sun, L., Trausch-Azar, J. S., Ciechanover, A., & Schwartz, A. L. (2005). Ubiquitin-proteasome-mediated degradation, intracellular localization, and protein synthesis of MyoD and Id1 during muscle differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26448–26456. <http://doi.org/10.1074/jbc.M500373200>
- Tanaka, E. M., Drechsel, D. N., & Brockes, J. P. (1999). Thrombin regulates S-phase re-entry by cultured newt myotubes. *Current Biology*, 9(15), 792–799. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80362-5](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80362-5)
- Tanaka, E. M., Gann, A. A. F., Gates, P. B., & Brockes, J. P. (1997). Newt myotubes reenter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Journal of Cell Biology*, 136(1), 155–165. <http://doi.org/10.1083/jcb.136.1.155>
- Tanaka, E. M., & Reddien, P. W. (2011). The Cellular Basis for Animal Regeneration. *Developmental Cell*, 21(1), 172–185. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.016>
- Tanaka, H. V., Ng, N. C. Y., Yang Yu, Z., Casco-Robles, M. M., Maruo, F., Tsonis, P. A., & Chiba, C. (2016). A developmentally regulated switch from stem cells to dedifferentiation for limb muscle regeneration in newts. *Nature Communications*, 7, 11069. <http://doi.org/10.1038/ncomms11069>
- Tank, P. W., Carlson, B. M., & Connelly, T. G. (1976). A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Journal of Morphology*, 150(1), 117–128. <http://doi.org/10.1002/jmor.1051500106>
- Tapan G. Pipalia, Jana Koth, Shukulpa D. Roy, Christina L. Hammond, K. K. and S. M. H. (2016). Cellular dynamics of regeneration reveals role of two distinct Pax7 stem cell populations in larval zebrafish muscle repair Tapan. *Disease Models & Mechanisms*, (May). <http://doi.org/10.1242/dmm.022251>
- Tarlow, B. D., Pelz, C., Naugler, W. E., Wakefield, L., Wilson, E. M., Finegold, M. J., & Grompe, M. (2014). Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell*, 15(5), 605–618. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.008>
- Tsonis, P. A., & Fox, T. P. (2009). Regeneration according to spallanzani. *Developmental Dynamics*, 238(9), 2357–2363. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22057>
- Tzahor, E., & Tzahor, E. (n.d.). Head Muscle Development. http://doi.org/10.1007/978-3-662-44608-9_6
- Ustanina, S., Carvajal, J., Rigby, P., & Braun, T. (2007). The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(8), 2006–16. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0736>
- Voss, S. R., Palumbo, A., Nagarajan, R., Gardiner, D. M., Muneoka, K., Stromberg, A. J., & Athipposhy, A. T. (2015). Gene expression during the first 28 days of axolotl limb regeneration I: Experimental design and global analysis of gene expression. *Regeneration*, 2(3), 120–136. <http://doi.org/10.1002/reg2.37>
- Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C. Y., & Nusse, R. (2015). Self-renewing diploid Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature*, 524(7564), 180–5. <http://doi.org/10.1038/nature14863>
- Wang, H., Löff, S., Borg, P., Nader, G. A., Blau, H. M., & Simon, A. (2015). Turning terminally differentiated skeletal muscle cells into regenerative progenitors. *Nature Communications*, 6, 7916. <http://doi.org/10.1038/ncomms8916>
- Wang, L. H., & Baker, N. E. (2015). E Proteins and ID Proteins: Helix-Loop-Helix Partners in Development and Disease. *Developmental Cell*, 35(3), 269–280. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.10.019>
- Wang, Y., Benezra, R., & Sassoon, D. A. (1992). Id expression during mouse development: a role in morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 194, 222–230. Retrieved from

- Wang, Y. H., Li, C. K., Lee, G. H., Tsay, H. J., Tsai, H. J., & Chen, Y. H. (2008). Inactivation of zebrafish *mrf4* leads to myofibril misalignment and motor axon growth disorganization. *Developmental Dynamics*, 237(4), 1043–1050. <http://doi.org/10.1002/dvdy.21478>
- Weber, C. M., Martindale, M. Q., Tapscott, S. J., & Unguez, G. A. (2012). Activation of Pax7-positive cells in a non-contractile tissue contributes to regeneration of myogenic tissues in the electric fish *S. macrurus*. *PLoS ONE*, 7(5), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036819>
- Weinberg, E. S., Allende, M. L., Kelly, C. S., Abdelhamid, a, Murakami, T., Andermann, P., ... Riggleman, B. (1996). Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spadetail embryos. *Development (Cambridge, England)*, 122(1), 271–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8565839>
- White, J. D., Scaffidi, A., Davies, M., McGeachie, J., Rudnicki, M. A., & Grounds, M. D. (2000). Myotube formation is delayed but not prevented in MyoD-deficient skeletal muscle: studies in regenerating whole muscle grafts of adult mice. *J Histochem Cytochem*, 48(11), 1531–1544. <http://doi.org/10.1177/002215540004801110>
- Whited, J. L., Lehoczy, J. a., & Tabin, C. J. (2012). Inducible genetic system for the axolotl. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13662–13667. <http://doi.org/10.1073/pnas.1211816109> /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1211816109
- Wu, C.-H., Tsai, M.-H., Ho, C.-C., Chen, C.-Y., & Lee, H.-S. (2013). De novo transcriptome sequencing of axolotl blastema for identification of differentially expressed genes during limb regeneration. *BMC Genomics*, 14(1), 434. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-434>
- Wu, J., & Lim, R. W. (2005). Regulation of inhibitor of differentiation gene 3 (*Id3*) expression by Sp2-motif binding factor in myogenic C2C12 cells: Downregulation of DNA binding activity following skeletal muscle differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1731(1), 13–22. <http://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.08.008>
- Yakushiji, N., Suzuki, M., Satoh, A., Ide, H., & Tamura, K. (2008). Effects of activation of hedgehog signaling on patterning, growth, and differentiation in *Xenopus* froglet limb regeneration. *Developmental Dynamics*, 238(8), 1887–1896. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22011>
- Yakushiji, N., Suzuki, M., Satoh, A., Sagai, T., Shiroishi, T., Kobayashi, H., ... Tamura, K. (2007). Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians. *Developmental Biology*, 312(1), 171–182. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.022>
- Yamane, H., & Nishikawa, A. (2013). Differential muscle regulatory factor gene expression between larval and adult myogenesis in the frog *Xenopus laevis*: Adult myogenic cell-specific *myf5* upregulation and its relation to the notochord suppression of adult muscle differentiation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 49(7), 524–536. <http://doi.org/10.1007/s11626-013-9635-z>
- Yee, S. P., & Rigby, P. W. (1993). The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes & Development*, 7(7A), 1277–1289. <http://doi.org/10.1101/gad.7.7a.1277>
- Yilmaz, A., Engeler, R., Constantinescu, S., Kokkaliaris, K. D., Dimitrakopoulos, C., Schroeder, T., ... Paro, R. (2015). Ectopic expression of *Msx2* in mammalian myotubes recapitulates aspects of amphibian muscle dedifferentiation. *Stem Cell Research*, 15(3), 542–553. <http://doi.org/10.1016/j.scr.2015.09.012>
- Zalc, A., Hayashi, S., Auradé, F., Bröhl, D., Chang, T., Mademtoglou, D., ... Relaix, F. (2014). Antagonistic regulation of p57kip2 by Hes/Hey downstream of Notch signaling and muscle regulatory factors

regulates skeletal muscle growth arrest. *Development (Cambridge, England)*, 141(14), 2780–90. <http://doi.org/10.1242/dev.110155>

Zhang, R., Han, P., Yang, H., Ouyang, K., Lee, D., Lin, Y.-F., ... Chi, N. C. (2013). In vivo cardiac reprogramming contributes to zebrafish heart regeneration. *Nature*, 498(7455), 497–501. <http://doi.org/10.1038/nature12322>

Zhang, W., Behringer, R. R., & Olson, E. N. (1995). Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes and Development*, 9(11), 1388–1399. <http://doi.org/10.1101/gad.9.11.1388>

Zhao, X., Yu, Q., Huang, L., & Liu, Q. X. (2014). Patterns of positive selection of the myogenic regulatory factor gene family in vertebrates. *PLoS ONE*, 9(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0092873>