



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

**DIFERENCIACIÓN CELULAR MIOGÉNICA EN LA LÍNEA CELULAR C2C12 EN CULTIVOS
MONOCAPA Y EN MATRICES POLIMÉRICAS TRIDIMENSIONALES LIBRES DE
COMPONENTES DE ORIGEN MAMÍFERO**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

Gonzalo Javier Morales Bastías

Director de Tesis: Dr. Cristian Acevedo

Co-director de Tesis: Dra. Caroline Weinstein O.

2017

*La felicidad se puede hallar
hasta en los mas oscuros momentos,
sí somos capaces de usar bien la luz.*

*No es bueno dejarse arrastrar
por lo sueños y olvidarse de vivir*

*Son nuestras elecciones las que
muestran lo que somos,
mucho mas que nuestras habilidades.*

*A Dios por brindarme
el don, la virtud y la dicha de vivir.*

*A mis padres y familia
que sin ellos no soy nada.*

*A mí futuro yo, para que cuando mires atrás,
Sepas cuanto has crecido y vivido.*

AGRADECIMIENTOS

Han transcurrido siete años ya desde que se vislumbraba un sueño, se arriesgaba un futuro, una vida entera, pero que sin duda sería la mejor inversión. Recuerdo muy bien cuando se me dio a conocer esta hermosa profesión, a veces olvidada, a veces recompensada, pero siempre compleja y motivante para ser siempre mejor, no por uno, sino que para el resto. Y es en estos momentos, en estos procesos cúlmines, cuando mas cuesta expresar el sentir y sumado a una dificultad en la escritura, mas difícil aún me es plasmar cuan agradecido estoy. Desde ya pido disculpas si alguien se me pasa y no lo nombro en esta sección, pero sin duda debes saber que otorgaste un granito en mi crecimiento.

Al ser que mas agradezco en cada situación de mi vida es Dios, por brindarme un soplo de vida, por guiarme en caminos complejos, que sin embargo siempre tienen algo bueno al final. Por cruzar gente hermosa en mi transcurso de esta vida y por brindarme las mejores alegrías y éxitos durante mi corta edad. Gracias Dios por permitirme conocer un poco mas de tu creación con los dones de la ciencia y la sabiduría, gracias por permitirme ser apoyado por una hermosa familia y amigos reales, aquellos que están en las malas y las peores, pero que sin duda, los momentos felices se disfrutan mucho mas.

A mis dos angelitos mas importantes que me protegen y acompañan desde un lugar no tan lejano, según yo. A mis dos abuelitos, Pechita y Titito, que hechos estrellas iluminan mi caminar, iluminan mi mente y mi espíritu, quienes me enseñaron a ser un mejor hombre, un mejor profesional, un buen hijo y un buen nieto, cuando los tuve a mi lado físicamente. Hoy los extraño mas que nunca, pero sé que están uno a cada lado protegiéndome y guiándome.

Agradezco enormemente al proyecto Fondecyt número 1160311, liderado por el doctor Acevedo quién confió en mi, mis conocimientos y mi trabajo para colaborar con esta investigación que de todo corazón, espero resulte de la mejor manera. Por brindarme herramientas, facilitar el aprendizaje y fomentar la investigación en futuros investigadores, futuros doctores que hoy somos simplemente alumnos de pregrado. Junto con agradecer al doctor Acevedo, bajo su representación, agradezco al Centro de Biotecnología CB-DAL, quienes abrieron sus puertas para permitirme llevar a cabo esta investigación. A sus colaboradores, especialmente a la señora Elizabeth Sánchez y la señorita Angélica por su cariñosa presencia. A Nicole Orellana por ser una tutora y mentora en los procesos que se llevan a cabo en el laboratorio, gracias por tu paciencia. Y a Rina Ortiz por siempre dar apoyo, una sonrisa y demostrar preocupación por uno. De corazón gracias a ustedes por aportar de alguna u otra manera a esta tesis.

No puedo dejar pasar la oportunidad de agradecer a dos de mis mejores amigos que me acompañan desde hace bastantes años y que son de mi región natal. Catalina Santander y Carlos Robles, amigos queridos, gracias por demostrarme que la distancia no es barrera para mantener una hermosa amistad, que viéndonos una vez al año si somos capaces de ponernos al día y apoyarnos en cada proceso que vivimos, alegrándonos o haciéndonos ver si estamos cometiendo errores.

A mis mejores amigos, con quienes logré una conexión única y que no me cabe duda seguiremos viviendo hasta el final de nuestros tiempos. A ustedes los conozco en sus mejores y peores momentos, como ustedes a mi, sé que están y estarán cuando nos necesitemos, es por esto, que no puedo dejar de decirles cuanto los quiero y agradezco por aportar con granitos, granos o rocas de arena, en mi crecimiento personal y profesional. Denisse, querida amiga y hermana, con quien confidenciamos cuanto sea necesario, con quien siempre organizamos salidas grupales para compartir tertulias, tecitos, cafés, helados, cualquier cosa que tuviera comida, pero con un fin mayor, compartir unos con otros, gracias por hacerme sentir

tu cariño, gracias por ayudarme a crecer en lo personal y profesional. Luis y Mario, mis trolazos favoritos, gracias por brindarme abrazos, carcajadas y momentos inolvidables que jamás pensé en vivir. Con ustedes a mi lado me siento una mejor persona y un mejor profesional, además de mantener viva la alegría en lo profundo de nuestros seres.

Como dejar de lado a aquellos amigos que de igual manera, poseemos mas de una historia o anécdota, con quienes se estudiaba en grupo, se reía, se retaba, se crecía. Gabriel, Catherine, Coté, Becky, Nicolás Cerca, Panchi, Flavia, Renato, Johanna, Nicolás Ayala, Natalia, Constanza, Karen y Juan Ignacio, sin duda son los mejores y agradezco la oportunidad de haber cruzado nuestros destinos y podamos crecer juntos, aunque no puedan salvarse de mi.

No llevaba ni un año en esta región, niquiera había entrado a clases y ya tenía una amiga, una confidente, una compañera de carrera y mas que eso, una madrina. Patricia Díaz, gracias por cada momento que has estado presente de mi vida, apoyandome y participando de esta loca vida. Gracias por tu invitación a EJE ya que ahí, conocí a la otra amiga que conforma nuestro pequeño grupo “Don Juan y sus dos mujeres”, Katherinne Mondaca. Gracias queridas amigas por darme apoyo, por hacerme sentir querido, por esucharme y muchas, muchas veces hacerme salir de mi mentalidad cuadrada.

A mi querido Movimiento Juvenil Peregrino, MJP, quienes me ayudan a crecer espiritualmente día tras día, a sacar lo mejor de mi para compartirlo con el resto del mundo, que bajo el alero de Dios y nuestra fe, poder hacer de este mundo, un mundo mejor. Gracias a mis queridos amigos que aunque a su manera, siempre me apoyaron o mas bien me presionaron para terminar luego mi carrera. Eduardo, Seba (Kiwi), Dani, Romina (Negra), Clau y Carla, gracias por siempre estar ahí, por hacerme ver el mundo desde otra perspectiva y por ayudarme a crecer mas de lo que ustedes creen.

Mas que un agradecimiento, me gustaría levantar dos estatuas afuera de la facultad. Una para Pamela Arancibia y otra para Mauricio Reyna, por la paciencia, por la entrega desinteresada, por la vocación, por su servicialidad y por enseñar a este cabeza dura lo que es vivir día a día una investigación. Gracias chicos por darse el tiempo y enseñarme a realizar un montón de experimentos, de enseñarme sus fundamentos y protocolos. Gracias porque, si no es por ustedes, esta tesis no hubiese terminado tan pronto. Gracias además por ser un ejemplo a seguir, en su carrera profesional, en su conocimiento y sus ganas de hacer ciencias. Ustedes son personas muy inteligentes, pero a veces creo, que no se dan cuenta y su humildad siempre está a flor de piel.

Recuerdo muy bien el primer día de clases, aquel año 2010. Entramos mas tarde por el terremoto que había ocurrido semanas antes del inicio oficial. Un joven de otra ciudad, conociendo gente nueva, un mundo nuevo, con muchos compañeros sentados en un auditorio gigante, se nos presenta la carrera, su estructura y funcionamiento administrativo. Luego una profesora toma el turno de conversarnos sobre otras formas de vivir la universidad, una profesora que desde ese momento, me cautivó a conocer mas de lo que ella hacía y experimentaba. La profesora Caroline Weinstein, desde ese momento quise llegar a sus ramos y sus clases. Por supuesto una vez aprobados quise ser su ayudante, rogué y rogué por su aprobación, necesitaba conocer mas de su materia y experimentarla desde la otra vereda. Así fui su ayudante por un par de años y me decidí a realizar la tesis con usted. Le agradezco enormemente, su vocación, su capacidad de transmitir ese sentir por la ciencia, el cariño con que enseña, la mano dura con que corrige y su maternal forma de abrirnos sus brazos para acogernos como discípulos. Muchas gracias por la paciencia y la entrega real para formar mejores profesionales.

Este sueño de convertirme en un profesional no se hubiera cumplido por el enorme esfuerzo que hizo una familia entera para aceptar a un nuevo integrante. Mi querida segunda familia Retamales-Morales. Queridos tíos y prima, gracias por abrirme las puertas de su casa y su familia, por permitirme sentir que soy uno mas, un hijo y un hermano mas. Gracias por enseñarme que todas las familias son distintas, pero que lo principal es el cariño que se tienen unos con otros. Perdón por las rabias y molestias que pude ocasionarles, pero siempre traté de no dar problemas y tratar de llegar a la casa temprano o llegar los fines de semana. Gracias queridos tíos por permitirme lograr esta meta, este sueño y no me queda otra forma de agradecimiento que dedicarles este proceso tan importante en mi carrera, mi tesis. Todo este trabajo, esfuerzo, sudor y lágrimas son para ustedes en forma de agradecimiento por ser la mejor familia que me pudo acoger y enseñar otras maneras de vivir. Los quiero mucho.

Otra persona muy importante en este último tiempo, a la cual debo agradecer ya que sin tu ayuda esta tesis no hubiese sido lo que es, muchísimas gracias querida mía, Bárbara, por aceptar el riesgo de conocerme en el periodo mas estresante de mi vida, pero aún así seguiste conmigo. Gracias por todo tu cariño entregado, por esas tardes interminables en Starbucks redactando, leyendo y tomando café para que este documento plasmara todos los conocimientos adquiridos. Cariño, gracias por ser como eres, por tu entrega total, por tu buena onda, tu motivación y estar presente en los momentos donde ya veía perdida mi cordura, para que me hicieras entrar en razón, me motivaras diciendo “queda poco”, “aguanta son las últimas semanas”, “eres seco te irá bien en todo” y por supuesto, cuando fuese necesario utilizar el diario para motivarme a escribir y sacarme de mi estado letárgico o pegado en un horizonte. Gracias por todo, te quiero mucho!!!.

Por último pero no menos importante es momento de agradecer a mi familia. Primero por los sabios del hogar, Tuta y Edu, gracias por cada abrazo, por cada consejo y cada preocupación con sus nietos, gracias por las lecciones de vida que tanto me han servido para ser una mejor persona.

A mis primos que con sus locuras y su unidad me alegran el alma y me hacen ver que nuestras familias si lograron la tarea mas importante, criarnos cariñosos y unidos, como ellos lo son también.

A mis tíos y padrinos, tanto de bautizo como de confirmación. Tío Lalo, gracias por permitirme ver que la vida se puede vivir de una manera distinta y menos estructurada, gracias por sus consejos, por su crianza, su apoyo y cariño incondicional. Tía Myriam y tío Leo, muchísimas gracias por acompañarme en cada paso que doy por esta camino llamado vida, por cada consejo, cada abrazo y cada beso para apoyarme y hacerme sentir querido.

A mi querido hermano, que de una u otra manera me enseñas que la vida se aprovecha, que la juventud se debe mantener y que la inocencia puede estar hasta en el hombre mas viejo. Gracias por enseñarme a gozar la vida, a saber levantarme con cada caída, al cariño de hermano, aunque no seamos tan representativos, nos queremos de todos modos. Te quiero mucho y te agradezco de corazón que seas tal cual eres, mi negro piñera.

Agradecer a mis padres, aquellos que dan vida y que son capaces de dar sus vidas por sus hijos. Ese cariño único que como matrimonio nos han inculcado, el respeto, la amabilidad, la generosidad, la humildad, la entrega, la perseverancia entre otros tantos valores que solo ustedes son capaces de transmitir. Ustedes son mi ejemplo a seguir, les agradezco por darme la vida, por enseñarme a vivir, a estudiar y a ser siempre una mejor persona, día a día. Gracias por enseñarme a crecer y escalar en mi vida, nunca quedarme quieto y siempre tener un norte, metas y objetivos en mi

vida. Es por todo este esfuerzo que ustedes han hecho por y para nosotros que yo se los retribuyo con este trabajo de investigación, el cual representa todo lo anteriormente mencionado y mucho mas, signo de perseverancia y esfuerzo. Este trabajo es para ustedes también, los amo.

Gracias papá por enseñarme el compromiso de la palabra, la perseverancia y el nunca rendirse. Gracias por enseñarme que aunque uno pueda parecer una roca por fuera, su interior puede ser igual o mas cálido que el interior de un volcán. Gracias por sacar siempre adelante a la familia entera, por perseverar siempre y nunca aburrirte. Eres el único y mejor papá que me pudo prestar esta vida. Te amo.

Gracias mamá por transmitir cada gota de cariño, de enseñarme a crecer y siempre haber estado conmigo. Gracias por entregarte al 1000% a tus hijos y familia. Gracias por inculcarme la perseverancia, el siempre crecer, gracias por heredarme tu lado científico, ese bichito de la curiosidad, del querer saber de todo, de ser una persona culta. Gracias mamá por darnos lo mas importante de nuestras vidas, tiempo, cariño y preocupación. Gracias por ser mi confidente, por estar ahí cuando mas he necesitado de un cariño o regaloneo. Eres la única y mejor mamá que me pudo prestar esta vida. Te amo.

RESUMEN

Las dietas que excluyen nutrientes obtenidos mediante el sacrificio de animales están siendo adoptados por parte de la población y cada día poseen más adherentes. Sin embargo, éstos podrían afectar el funcionamiento fisiológico del ser humano si es que estos son muy extremos o no se complementan con proteínas vegetales, alimentos funcionales o nutra-fármacos. En una dieta balanceada, la presencia y consumo de proteína es esencial, por lo que surge la necesidad de suplir esta falta del macronutriente, respetando la ideología adoptada. Así nace la idea, basada en la ingeniería de tejidos, de producción *in vitro* de carne, utilizando la menor cantidad posible de componentes animales, específicamente mamíferos, y así su obtención no esté asociada al sufrimiento animal.

Para contribuir en la producción de los productos antes señalados, esta tesis se planteó como objetivo el comparar la diferenciación de mioblastos C2C12 hacia linaje muscular avanzado en situaciones de cultivo en monocapa y matrices poliméricas tridimensionales lisas o microestructuradas libres de componentes mamíferos, a través de la expresión de transcritos de desmina, miogenina y cadena pesada de miosina. Para alcanzar este objetivo se sembraron células C2C12 en matrices poliméricas compuestas de gelatina, alginato, agarosa y sorbitol, de estructuras lisas y microestructuradas, y en condición de cultivo en monocapa. Todas las anteriores fueron cultivadas en condiciones de diferenciación miogénica

para comparar la expresión de marcadores de diferenciación muscular mediante reacción de PCR en tiempo real acoplada a transcripción reversa.

Las matrices poliméricas lisas o microestructuradas fueron compatibles con la línea celular C2C12, pero no permitieron una óptima extracción de ARN. Sin embargo, la línea celular en cultivo monocapa presentó diferenciación con expresión de marcadores musculares de diferenciación ya que, al séptimo día se detectó expresión de desmina, miogenina y de cadena pesada de miosina, marcadores de diferenciación temprana, media y tardía. En conclusión, esta investigación permitió implementar la metodología molecular para evaluar diferenciación muscular.

ABSTRACT

“Miogenic cell differentiation in the C2C12 cell line in monolayer cell culture and three-dimensional polymeric scaffolds free of mammal origin components”

Diets excluding nutrients obtained through the slaughter of animals are being adopted by a part of the population and they have more adherents with every passing day. However, they could affect human being's physiological functioning if they are very extreme or they are not supplemented with vegetal proteins, functional foods or nutraceuticals. In a balanced diet, protein presence and consumption is essential, so the need emerges for supplying this lack of the macronutrient, respecting the adopted ideology. This is how the idea, based on tissue engineering, of *in vitro* meat production was born, using the least possible amount of animal components, specifically of mammals and, thus, its production would not be associated with animal suffering.

To contribute to the manufacture of the above mentioned products the purpose of this thesis is to compare C2C12 mioblast differentiation to advanced muscle lineage in monolayer culture and on three-dimensional flat surface or microstructured polymeric scaffold situations mammal components free, by the expression of desmin, myogenin and heavy chain of myosin transcripts. To achieve this purpose, C2C12 cells were seeded in flat surface structured and microstructured polymeric

scaffolds formulated with gelatin, alginate, agarose and sorbitol, and on monolayer culture conditions. All of them were grown under myogenic differentiation conditions to compare the expression of muscle differentiation markers through reverse transcription coupled to real-time PCR reaction.

Flat surface or microstructured polymeric scaffolds were compatible to C2C12 cell line, but didn't allow optimal RNA extraction. However, monolayer culture cell line presented cell differentiation with muscle markers expression since on the seventh day there was an expression of desmin, myogenin and heavy chain of myosin, early, medium and late differentiation markers. In conclusion, this research allowed the implementation of molecular methodology to evaluate muscle differentiation.

ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	III
I. Introducción.....	1
II. Hipótesis.....	11
III. Objetivos.....	12
IV. Materiales y Métodos.....	13
V. Resultados.....	25
VI. Discusión.....	35
VII. Conclusiones.....	43
Bibliografía.....	44
Anexos.....	52
Anexo 1.....	52
Anexo 2.....	55

INTRODUCCIÓN

La sociedad actual se ha concientizado acerca de la alimentación y una parte de ésta es partícipe de ideologías basadas en la exclusión, parcial o completa, de carnes en su dieta. El vegano es aquella persona que en su voluntad no consume animales ni derivados de éstos, tampoco utiliza productos animales como: cuero, lana, pieles, entre otros, para ropas, cosméticos, muebles o para cualquier otro uso humano. Por otro lado el vegetariano es aquella persona que no consume carnes, pero si otros productos derivados de animales. Las razones de adherencia a la ideología vegana son: ética, salud y medioambiente. La ética se refiere a la sensación de incomodidad al consumir seres que sienten, específicamente animales de granja para consumo. La segunda razón se refiere a la conciencia de mejorar la salud personal, sabiendo que este tipo de alimentación proveerá mejoras a corto y largo plazo en su organismo. Mientras que la tercera razón se debe a la creencia de que el uso de animales para consumo de comida es el mayor factor de degradación medioambiental en términos de mal uso del agua.¹

Durante el último tiempo y alrededor del mundo, se han adherido más personas al veganismo y su distribución se observa en la figura 1.²

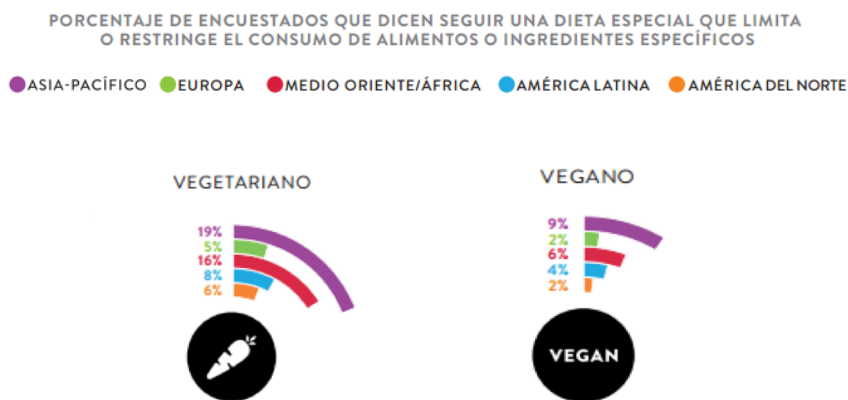


Figura 1: "Restricciones en las dietas alrededor del mundo", Porcentajes de encuestados que dicen ser vegetarianos o veganos, encuesta realizada en los cinco continentes. Adaptado de Nielsen.²

Para dar una alternativa de suplemento alimenticio con respecto a la carne, respetando la ideología adoptada, la ciencia es una herramienta útil. El área de la ingeniería de tejidos permitiría la producción de carne *in vitro*, a partir de componentes químicos y biológicos. Debido a esto es importante conocer los mecanismos biológicos en la formación de músculo desde su génesis.

Durante el desarrollo embrionario se forman tres tipos de musculatura: la esquelética, la cardíaca y la lisa. La fibra madura del músculo esquelético es una célula multinucleada compleja especializada en la contracción. Los precursores de la estirpe muscular (células miógenas), bajo la acción de factores de crecimiento y la acumulación de factores reguladores miógenos, dan paso a la fusión con otras células semejantes, generando un miotubo multinucleado, muy activo en expresión génica que luego avanza al estadio final de diferenciación, la fibra muscular.³ (Figura 2).

Por lo tanto, para la investigación planteada es necesario disponer de células precursoras, como mioblastos, para conseguir un estadio diferenciado bajo las condiciones establecidas. Así la línea celular C2C12, un subclón, producido por Blau y cols. en el año 1985, de la línea celular de mioblastos murinos establecida por Yafe y Saxel en el año 1977, se ha usado para estudiar el proceso de diferenciación muscular. Esta línea celular consiste en una población pura de células miogénicas de rápida proliferación. Además, en ciertas condiciones de cultivo se diferencian formando miotubos contráctiles y sintetizando proteínas características de músculo (Fig. 3).⁴

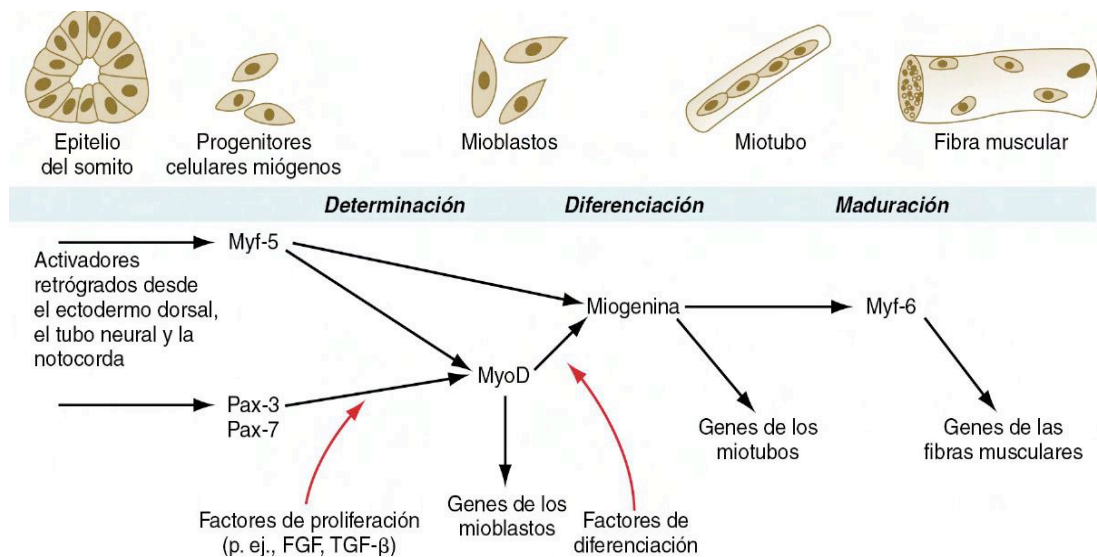


Figura 2: Representación esquemática de la miogénesis inicial que muestra la secuencia de expresión de los factores reguladores miogénicos. Tomada del libro "Embriología Humana y Biología del desarrollo".³

Número ATCC: CRL-1772

Designación: C2C12

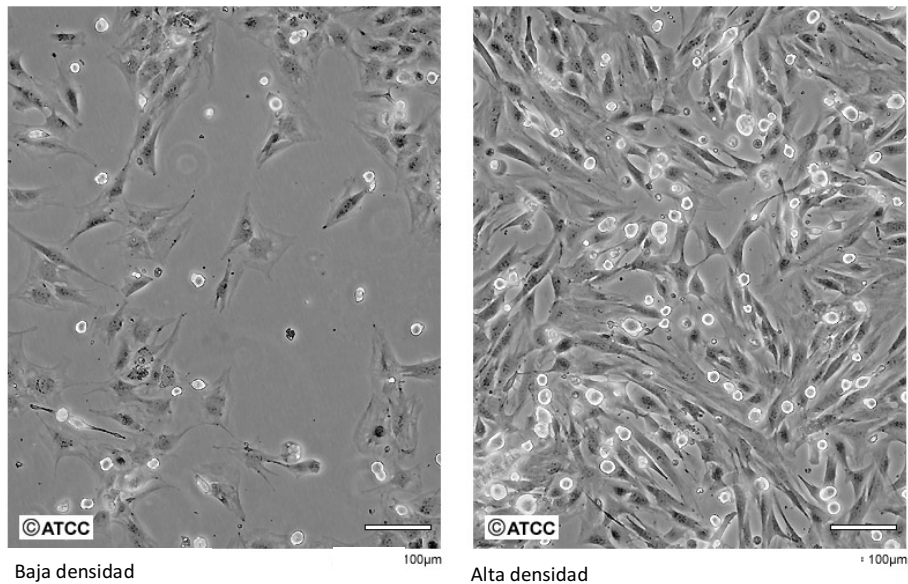


Figura 3: Cultivos monocapa de células mioblásticas C2C12 a diferentes confluencias. Tomada de la ficha técnica CRL-1772TM de la American Type Culture Collection (ATCC)⁵

Los mecanismos moleculares que controlan la miogénesis a nivel transcripcional están bien caracterizados. Varias familias de factores de transcripción miogénicos, incluyendo a MYF5, MYOD1, MYOG, MEF2 y MYF6, se expresan en las diferentes etapas de la miogénesis para un mayor control en la transcripción de los numerosos genes músculo-específicos, la reorganización del metabolismo y mediar los procesos de contracción muscular.⁶⁻⁸

Entre los factores de transcripción que regulan la miogénesis, la familia MYOD1, activa la transcripción de genes músculo-específicos pero también detiene permanentemente el ciclo celular inhibiendo los factores de transcripción que la

promueven. Esta familia de factores de transcripción activan la expresión de desmina y de miogenina, asociados a una diferenciación de estadio temprana y final, respectivamente.⁹ Así los factores de regulación miogénica inducen la expresión de proteínas como alfa-actina, cadenas pesadas y ligeras de miosina, tropomiosina, troponina-C y troponina-I, asociados a un estadio de diferenciación final.¹⁰

La desmina es una proteína de 52 kiloDalton (kD) que ha sido identificada como la subunidad constitutiva de los filamentos intermedios en los músculos esquelético, cardíaco y liso. El primer paso reconocible en la miogénesis del músculo esquelético parece ser el inicio de la síntesis de desmina en la replicación de los mioblastos, mientras que otras proteínas músculo específicas, tales como actinas, miosinas, titina y miomesina, aparecen sólo en los mioblastos mononucleados postmitóticos. A la desmina también se le ha atribuido un papel crítico en las etapas tempranas de la miogénesis, durante el compromiso miogénico y el proceso de diferenciación.¹¹

Existen cuatro miembros de la familia de miogenina (MyoD). Las mutaciones heterocigotas, en ambos alelos, en ratón han demostrado que MyoD, Myf5 y Mrf4 funcionan como factores de determinación miogénicos de tal manera que en ausencia de los tres, no existe formación de músculo esquelético. El cuarto miembro, miogenina, actúa como un factor de diferenciación, al igual que Mrf4 y MyoD, controlando la diferenciación de los mioblastos en las fibras del músculo esquelético. Ésta posee un dominio C-terminal que recluta complejos de

remodelación de la cromatina, siendo así utilizada como marcador de diferenciación media y su expresión está restringida a las células del músculo esquelético.¹²

La miosina es una proteína fibrosa, es la más abundante en el músculo esquelético, representando entre el 60 y el 70% de todas las proteínas musculares, y es el componente principal de los filamentos gruesos.¹³ La miosina es responsable de la contracción a nivel muscular (miosina II), la cual posee dos cadenas pesadas, que forman la cabeza y la cola de la miosina, y cuatro cadenas livianas que permiten la unión de las dos cadenas pesadas. Este conjunto es el que interactúa con la proteína actina, regulando así, la contracción muscular.¹⁴ Esta proteína tiene actividad ATPasa asociada a la cabeza de la cadena pesada, facilitando la entrega de energía al momento de la contracción.¹⁵ Existen distintas isoformas de la proteína, que se expresan durante el desarrollo del músculo, una de ellas son la isoforma rápida y la isoforma lenta de la cadena pesada de miosina¹⁶, así distintos marcadores de la miogénesis son útiles para el estudio de su diferenciación como lo es la cadena pesada de miosina tipo II, para una diferenciación de estadio tardía en músculo liso y estriado.¹⁷

La miogénesis de mioblastos puede ser evaluada por estrategias histológicas, utilizando técnicas de tinción de tejidos con hematoxilina-eosina, Tanyels y cols. el año 2004 observaron la formación de músculo estriado a las doce semanas.¹⁸ Otra estrategia utilizada ampliamente es la inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos contra las proteínas miogenina y MyoD, Cui y cols. el año 1999, analizaron la

miogénesis con el fin de encontrar un nuevo método de diagnóstico para la patología rhabdomyosarcoma.¹⁹ Otros investigadores como Langen y cols., y Gang y cols., ambos el año 2004, analizaron la diferenciación durante el proceso de miogénesis a través de la expresión de transcritos para marcadores de diferenciación, tales como desmina, miogenina, cadena pesada de miosina y mioglobina.^{20,21} En esta tesis se ha seleccionado la cuantificación de la expresión relativa de transcritos de desmina, miogenina y cadena pesada de miosina como marcadores de diferenciación temprana, intermedia y tardía, respectivamente para los cultivos de C2C12. Estos marcadores se pueden analizar bajo la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de manera cuantitativa, posterior a una transcripción reversa. Estas reacciones y marcadores fueron utilizadas por Chen y cols. el año 2015, quienes describieron el aumento en los niveles de expresión de desmina y miogenina en etapas tempranas, mientras que la cadena pesada de miosina aumentó tardíamente y proporcionalmente a los días transcurridos de diferenciación.²²

Las interacciones célula-célula y célula-MEC modulan, entre otros procesos, la diferenciación y se reconoce que los cultivos en estructuras tridimensionales imitan la especificidad de tejidos, muchas veces mejor que los cultivos en monocapa, reportando bastantes diferencias importantes entre estos dos tipos de cultivo, tales como: cambios en morfología, migración, capacidad de diferenciación y niveles de expresión proteica.²³ Para el desarrollo de la modalidad de cultivo tridimensional se requieren matrices poliméricas que entregan soporte extracelular artificial. Así una

matriz interactúa favoreciendo la comunicación intercelular, ya que posee características rígidas y flexibles a la vez, generando un estímulo apropiado para activar algunas vías de transducción mecánica, promoviendo la regulación celular y comunicación de factores bioactivos.²⁴

Entre diversos tipos de matrices que se han explorado para el cultivo tridimensional, aquellas basadas en el proceso de entrecruzamiento con biopolímeros como gelatina y alginato, son ampliamente utilizadas. El éxito de esta combinación se puede explicar por las distintas propiedades que aporta cada uno de estos polímeros. El alginato es un copolímero polianiónico derivado de algas marinas, es soluble en soluciones acuosas y forma geles estables a temperatura ambiente en presencia de ciertos cationes divalentes (es decir, Ba^{2+} , Ca^{2+}) en concentraciones no citotóxicas, proceso denominado como entrecruzamiento. Esto permite que se formen estructuras tridimensionales.²⁵ La gelatina de pez posee diferentes propiedades reológicas, por ejemplo la fuerza y la temperatura de gelificación son inferiores a la obtenida de mamíferos, diferencias que surgen por las diferentes composiciones de aminoácidos y además, provee una buena cito-compatibilidad entre la matriz y la célula.²⁶ La gelatina promueve la adhesión y migración celular, y así ambos, pueden unirse formando un complejo polielectrolito mejorando las propiedades físicas de las matrices y favoreciendo la proliferación y diferenciación celular.^{27,28}

Otros reactivos utilizados en la manufactura de matrices para el cultivo celular son los polisacáridos y polialcoholes, como lo son la agarosa y el sorbitol. Éstos otorgan la propiedad plastificante a la matriz, característica que modifica, según las concentraciones a utilizar, la fuerza mecánica de tensión, fuerza de elongación y la permeabilidad de gases y agua.²⁹ Es muy importante controlar estos criterios en los cultivos celulares y los polímeros que interaccionarán en la formulación de la matriz, ya que si estos cultivos no reciben cantidades suficientes de oxígeno, CO₂, agua o no poseen la suficiente tensión de parte de la matriz, su crecimiento, proliferación e incluso su diferenciación podrían verse afectados.³⁰

Los polímeros deben ofrecer a las células cultivadas el ambiente propicio para el crecimiento y el desarrollo de éstas, simulando el ambiente de la matriz extracelular. Bajo esta afirmación es necesario producir una matriz que permita este desarrollo celular, siendo el complejo gelatina-alginato, el responsable de la adhesión y migración celular, además de una estructuración tridimensional, semejándose al ambiente fisiológico que provee la matriz extracelular. Con el fin de utilizar estas matrices para generar carne *in vitro*, una propiedad esencial es que no sea tóxica al consumirse como alimento.

Debido a resultados preliminares no publicados de Acevedo y cols el año 2017, se observa una baja compatibilidad de las células con las matrices lisas, por lo que surge la necesidad de entregar una propiedad que fortalezca esta condición. Se ha observado que la micro-estructuración de superficies otorga mayor adherencia y

canalizan el crecimiento y distribución de las células. Es así como Patz y cols. el año 2006, controlan esta propiedad en matrices de agarosa, utilizando una técnica de evaporación por láser, que generó canales de entre 60 y 400 micras.³¹

Sobre la base de los antecedentes expuestos, los cuales evidencian el desarrollo, diferenciación y la compatibilidad de las líneas celulares cultivadas en matrices y los procesos de producción de éstas, permiten hipotetizar sobre el uso de una matriz, de formulación propia, de estructura tridimensional, libre de componentes mamíferos y apta para el consumo humano, cuyas características permitan la adherencia de células mioblásticas, que favorezcan el crecimiento, la proliferación y su diferenciación. Al ser analizados estos criterios y obtenidos sus resultados, se aporta a las investigaciones futuras que tengan como finalidad la producción de carne libre de sufrimiento animal y amable con el medioambiente, carne *in vitro*.

HIPÓTESIS

Se postula que es posible cultivar mioblastos de origen mamífero (línea celular C2C12) en una matriz polimérica tridimensional libre de componentes mamíferos, en condiciones que induzcan la diferenciación miogénica consistentes con cambios en la expresión transcripcional de desmina, miogenina y cadena pesada de miosina.

OBJETIVOS

- **General**

Comparar la diferenciación de mioblastos C2C12 hacia linaje muscular avanzado en situaciones de cultivo en monocapa y matrices poliméricas tridimensionales libres de componentes mamíferos a través de la expresión de transcritos de desmina, miogenina y cadena pesada de miosina.

- **Específicos**

1. Determinar la viabilidad de las células C2C12 en cultivo monocapa y cultivo en matriz polimérica libre de componentes mamíferos.
2. Evaluar la diferenciación de células mioblasticas C2C12 entre cultivos monocapa y en matrices poliméricas a través de la expresión relativa de los genes desmina, miogenina y miosina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular mioblástica C2C12 adquiridas desde la *American Type Culture Collection, ATCC* (CRL-1772) (Virginia, EEUU). Esta es una población pura de células miogénicas de rápida proliferación y diferenciación en cultivo. Forman miotubos contráctiles y sintetizan proteínas características de músculo. Son sub-clones, producidos por Blau et al. en 1985, obtenidos desde la línea celular mioblástica establecida por Yafe y Saxel en 1977.³²

Estas células fueron cultivadas en monocapa y en las matrices tridimensionales, con un Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM™, Thermo Fisher Scientific Inc.®, Massachusetts, EEUU) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Biological Industries®, Israel), con Glutamax™ 2 mM (Invitrogen®, California, EEUU) y penicilina 100 UI/mL y estreptomicina 10 µg/mL (Invitrogen®, California, EEUU), bajo condiciones ambientales de 37°C y 5% de dióxido de carbono en ambiente humidificado, condiciones otorgadas por incubadora de CO₂ de camisa de agua Form™ serie II (Thermo Fisher Scientific Inc.®, Massachusetts, EEUU). El medio de cultivo fue sustituido según viraje del indicador rojo fenol con una frecuencia aproximada de 2 días. Antes de cada sustitución del medio de cultivo, se realizó un lavado del cultivo con solución salina tamponada con fosfato 0,1 M a pH 7,4 (PBS, Invitrogen®, California,

EEUU), suplementada con solución penicilina 100 UI/mL y estreptomicina 10 µg/mL (Invitrogen®, California, EEUU).³³ Solo se realizó este lavado en los cultivos monocapa debido a que el PBS hace precipitar el calcio de las matrices, dispersándolas y perdiendo utilidad. Para la diferenciación de estas células se utilizó DMEM, en el cual el suero bovino fetal se cambió por suero de caballo(Invitrogen®, California, EEUU), en una concentración del 2%.

2. Matrices

Se contó con dos tipos de matrices elaboradas en el Centro de Biotecnología Dr. Daniel Alkalay Lowitt (CB-DAL) de la Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM). Éstas son producto del entrecruzamiento de gelatina de pez (Merck®, Darmstat, Alemania), alginato de sodio (Loba Chemie®, Mumbai, India), agarosa (SeaKem™, Lonza®, Basel, Suiza) y sorbitol (Merck®, Darmstat, Alemania). Se prepararon soluciones con estos reactivos, utilizando agua mQ estéril como solvente. Las proporciones son las siguientes: gelatina de pez 0,9% en 60 mL de agua, alginato 0,4% en 60 mL de agua, agarosa 0,2% en 50 mL de agua y sorbitol 0,1% en 25 mL de agua. Luego fueron sometidas a agitación con temperatura en tiempos establecidos por el protocolo. Para la preparación de las formulaciones y sus moldeos se agregan secuencialmente la solución de gelatina y sobre ella se agregan las soluciones de alginato, luego agarosa y finalmente sorbitol. Luego esta mezcla es dispuesta en placas Petri dejando reposar durante una noche. Al día siguiente se procede al enfriamiento

paulatino desde $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y nuevamente se deja toda una noche. Al día siguiente estos polímeros son sometidos a liofilización. Retiradas las matrices son almacenadas con silicagel para evitar la humedad.

Un tipo de matriz denominada lisa era de superficie no modificada, mientras que en el segundo tipo denominado estructurada, se generó una microestructura superficial con forma de canales para favorecer la orientación celular.

Las matrices fueron acondicionadas mediante variados procesos, los que permiten su rehidratación y desinfección. La matriz debió ser incubada durante 1 h en 6 mL de solución estéril de CaCl_2 70 mM. Luego, se lavó con 3 mL de agua estéril 3 veces, sin usar PBS. Se desinfectó durante 2 h por inmersión en alcohol 70%, luego se volvió a lavar como se describió anteriormente. Posteriormente se le agregó medio de cultivo incubando durante toda la noche, previa al uso de las matrices.

Antes de sembrar con células las matrices se secaron con papel filtro estéril, se cortaron círculos de 1,5 cm aproximadamente, equivalente a un área de $1,77\text{ cm}^2$.

3. Diseño Experimental

Cada condición de estudio matriz lisa, estructurada y monocapa fue cultivada por triplicado en placas de 24 pocillos que poseen un área de 2 cm^2 por cada uno de éstos (fig. 5), durante distintos tiempos de diferenciación. Sobre la base de experiencias piloto, se sembró 2×10^6 de células C2C12 en las

matrices lisa y microestructurada, y cien mil células en los cultivos monocapa, utilizados como control. Se siembran las células en triplicados para cada condición de estudio para evaluar el tiempo cero (antes de la inducción de diferenciación) y en triplicados para evaluar la diferenciación durante 7 días.

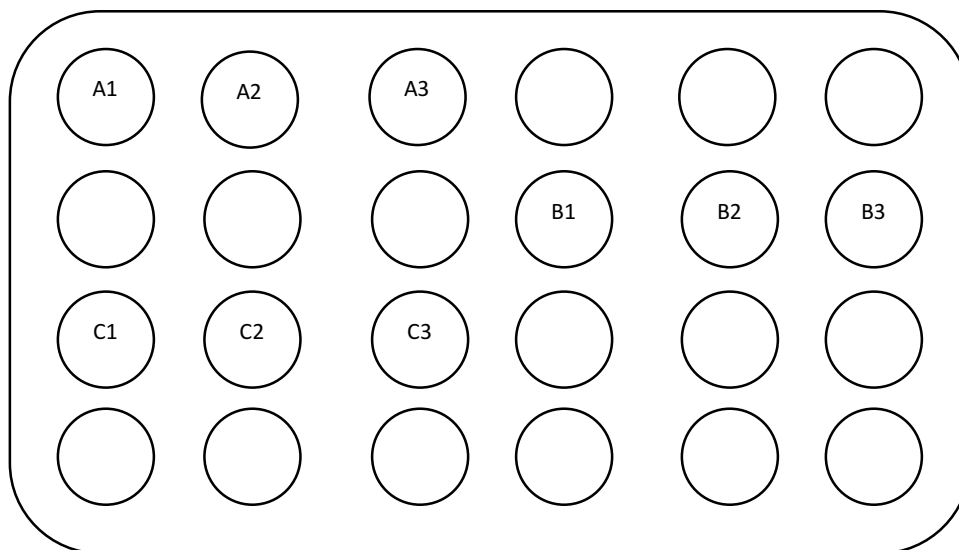


Figura 4: Distribución de los cultivos monocapa (A1-A3), matriz lisa (B1-B3) y matriz microestructurada (C1-C3), en placa de 24 pocillos. Elaboración propia.

Luego de 72 h de sembrar las células (determinado sobre la base de experimentos piloto), se procedió a sustituir el medio de cultivo por el medio inductor de diferenciación miogénica, excepto en los cultivos de día cero, los que fueron sometidos a extracción de ARN antes de iniciar el proceso de diferenciación miogénica. Al cumplirse el séptimo día de diferenciación se procedió a extraer ARN de los triplicados cultivados en cada una de las condiciones bajo evaluación.

La diferenciación se evaluó a través de la determinación de la expresión relativa de transcritos para genes asociados a diferentes etapas de la diferenciación miogénica, temprana (desmina), mediana (miogenina) y tardía (cadena pesada de miosina). Además se evaluó la expresión del gen constitutivo de la especie, PBGD.

Al obtenerse el ARN de las células cultivadas, se llevó a cabo la retrotranscripción de este material genético, para posteriormente someter a la amplificación y cuantificación relativa de los genes en interés por la técnica de PCR en tiempo real.

4. Viabilidad Celular

Para determinar la viabilidad celular en los cultivos con matrices poliméricas, se utilizó el método Resazurin®. Este ensayo se fundamenta en la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables de reducir esta molécula. El producto reducido es fluorescente y presenta una longitud de onda de excitación a 544 nm y una de emisión de 590 nm. La viabilidad se determina a partir de la relación de unidades relativas de fluorescencia (RFU) de las células, siendo la fluorescencia proporcional al número de células viables.³⁴ Por otra parte se calculó la adherencia a la matriz comparando el valor obtenido entre el pocillo contenedor de una matriz cultivada y aislada a un pocillo limpio, al momento de llevar a cabo este método, sobre el pocillo que contenía una matriz idéntica y cultivada pero sin aislar, esto con el fin

de observar cuanto se adherían las células a la matriz o pasaban directo a adherirse al pocillo.

5. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN desde las matrices se utilizó un kit comercial de extracción de ARN desde plantas "*Rneasy plant mini kit*" (Qiagen®, Hilde, Alemania), esto debido a la complejidad de la matriz tridimensional y sus componentes que deben eliminarse del producto final debido a su interferencia con la reacción de PCR. Éste consiste en la lisis de la matriz tridimensional y de las membranas celulares por distintos buffers caotrópicos, en el aislamiento del material genético por columnas de adhesión específicas, las cuales permiten eluir materias no deseables y conservan el ARN en las columnas hasta la elución con el buffer correspondiente, paso en el cual se recolecta el ARN en el volumen total de buffer utilizado. Todas estas acciones se realizaron estrictamente según el protocolo especificado por el fabricante, expuesto de manera esquematizada en la figura 6.

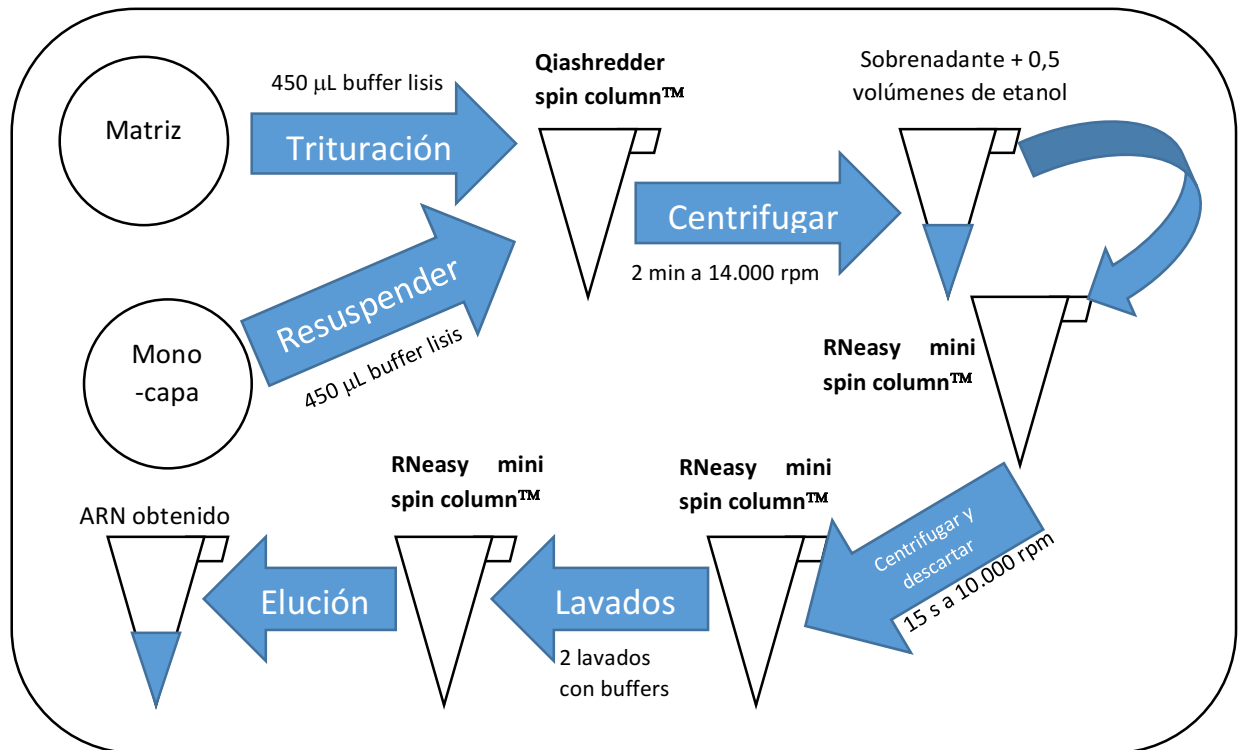


Figura 5: Protocolo de extracción de RNA por kit "RNeasy mini kit plant" resumido. Las matrices fueron sometidas a congelación con nitrógeno líquido, trituradas y se les aplicó el buffer de lisis. Al cultivo monocapa se le agregó el buffer de lisis directamente. Utilizando columnas propias del kit se procede a una serie de centrifugaciones, arraste del material de interés, lavado de resto no útiles y finalmente una elución del material genético retenido en la membrana de la columna. Figura de elaboración propia.

6. Calificación de ARN

La concentración y pureza del material genético extraído fue analizada mediante el espectrofotómetro NanoDrop® y el software NanoDrop 3.0.1 (Invitrogen®, California, EEUU). La cuantificación de ARN se efectuó a 260 nm, la presencia de proteínas a 280 nm y los compuestos orgánicos como solventes y polisacáridos se evaluaron mediante la absorbancia a 230 nm. Las puridades de las muestras fueron determinadas por las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm, con valores óptimos entre 1,8 y 2,0, respectivamente.

7. Retrotranscripción

La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador Thermo Electron PxE 0,5 por medio del kit ImProm-II™ (Promega®, Wisconsin, EEUU). El ARN obtenido se preparó añadiendo 500µg de oligo-dT, obteniendo un volumen final de 5 µL, esto sin superar una concentración mayor a 1µg de ARN. Luego esta mezcla es llevada a incubación 5 min a 70°C y luego a 4°C por el mismo tiempo.

Posteriormente, se adicionó a cada tubo con ARN tratado una solución que contiene MgCl₂ 3 mM, desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTP) 0,5 mM, 1 UI de inhibidor de ARN-asas, enzima transcriptasa reversa, solución tampón proporcionada por el fabricante y agua libre de nucleasas, reactivos proporcionados en el kit ImProm-II™, alcanzando un volumen final de 20 µL.

En conjunto con cada una de las muestras, se empleó un control sin enzima transcriptasa reversa con el fin de evaluar la potencial contaminación con ADN genómico en las reacciones posteriores de PCR.

8. PCR en tiempo real

7.1. Partidores

La reacción de amplificación se realizó utilizando las secuencias de los partidores diseñados mediante el software Amplifix© para los genes desmina (Des), miogenina (Myo) y cadena pesada de miosina (Myh2) y sintetizados en IDT-Integrated DNA technologies. Además, se amplificó el ADNc del gen de

referencia, PBGD. Las secuencias de los partidores, los tamaños de los amplicones y sus temperaturas de fusión se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Secuencias genéticas de los partidores, tamaños de amplicón y temperaturas de hibridación.

Gen	Secuencias de partidores	Tamaño amplicón	Temperatura de hibridación °C
Des	Fw: 5'-GATGCAGCCACTCTAGCTCGTATT-3' Rv: 5'-TTCTTAGCCGCGATGGTCTCATAC-3'	218 nucl.	60
Myog	Fw: 5'-AGAAGCGCAGGCTCAAGAAAGT-3' Rv: 5'-AGTTGCATTCACTGGGCACCAT-3'	222 nucl.	61
Myh2	Fw: 5'-CCTCTTATTTCCCAGCTGCACCTT-3' Rv: 5'-GTCATTTCCCTGCATCTTTGCTC-3'	242 nucl.	60
PBDG	Fw: 5'-TGGCGATGCTGAAAGCCTTGTA-3' Rv: 5'-GTTTTCCCGTTTGCAGATGGCT-3'	239 nucl.	60

7.2 Amplificación

Se preparó una solución de reacción PCR para un volumen final de 25 µL por tubo de lectura, a los cuales se les incorporó 12,5 µL de solución SYBR green master mix (Agilent®, California, EEUU), 0,2 µL del mix de partidores (sentido y antisentido), 0,375 µL de solución ROX (estándar basal), 10,925 µL de agua libre de nucleasas y finalmente 1 µL del ADN templado (ADNc) o 1 µL de agua libre de nucleasas para los controles negativos. El procedimiento se efectuó en el termociclador Mx 3000p qPCR System™ (Agilent®, California, EEUU), en el software MxPro QPCR Software™, en su versión 3.20 (Agilent®, California, EEUU).

Los ciclos de amplificación se configuraron con una fase inicial de “*Hot Start*”, que corresponde a una incubación de los capilares a 95°C por 10 min y posteriormente 40 ciclos de tres etapas: denaturación a 95°C por 30 s, hibridación a una temperatura específica para cada gen en estudio (ver tabla 1) por 1 min y extensión a 72 °C por 30 s. Los resultados de esta fase fueron registrados en curvas aritméticas de fluorescencia que permiten la obtención de los ciclos de cuantificación (Ct), requeridos para el cálculo de expresión relativa.

Para corroborar la existencia de un único producto de amplificación, se sometió a cada muestra a un análisis de denaturación (curva de melting) el cual se realizó inmediatamente después del proceso de amplificación. Este análisis consistió en un ciclo en el cual se elevó la temperatura del equipo a 95°C con el fin de denaturar la doble hebra obtenida. Posteriormente se efectuó un descenso hasta los 65°C con el fin de renaturalizar y se elevó finalmente la temperatura hasta los 95°C a 0,1°C por segundo, registrando la pérdida de fluorescencia en cada intervalo de aumento de temperatura.

7.3 Especificidad de la amplificación

Los productos amplificados (ADNc) fueron analizados, como respaldo, en geles de agarosa al 2%, con una corriente de 100V durante 1 h y 30 min, para verificar el tamaño de los amplicones, ya que, se efectuaron curvas de fusión dentro del mismo programa de PCR las que verifican la especificidad de la amplificación.

7.4 Cálculo de la expresión relativa

Se debe efectuar previamente la determinación de la eficiencia de amplificación de cada segmento génico. Para ello se construye una curva estándar de amplificación para cada gen, utilizando como estándar el material resultante de una reacción cuantificado espectrofotométricamente. Las curvas resultantes permiten el cálculo de eficiencia de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Eficiencia = (10^{-1/pendiente}) - 1$$

Si la diferencia entre las eficiencias de los partidores es menor al 5%, la expresión relativa de cada gen se calculará según la ecuación de Livak.³⁵ De lo contrario se debe aplicar la expresión de Pfaffl.³⁶

$$Exp. relativa (Livak) = \frac{2^{\Delta Ct objetivo (control-muestra)}}{2^{\Delta Ct constitutivo (control-muestra)}}$$

$$Exp. relativa (Pfaffl) = \frac{(Eficiencia objetivo)^{\Delta Ct objetivo (control-muestra)}}{(Eficiencia constitutivo)^{\Delta Ct constitutivo (control-muestra)}}$$

9. Análisis estadístico

Los ensayos de PCR en tiempo real fueron realizados en una única ocasión ($n=1$), dado el alto número de células C2C12 necesarias, alrededor de 12×10^6 células por placa, y la necesidad de unificar los extractos de ARN, obstaculizando la posibilidad de efectuar experiencias independientes, requisito para un análisis estadístico. Sin embargo, las muestras sometidas a PCR en tiempo real fueron determinadas por triplicado, correspondiendo a una pseudoréplica de medición del experimento.

RESULTADOS

1. Matrices

Las matrices fueron elaboradas estrictamente según las proporciones e indicaciones anteriormente descritas, obteniendo polímeros de aspecto blanco, cristalinos y semi rígidos. Sus estructuras internas, producto del entrecruzamiento, y sus estructuras superficiales se pueden apreciar en la figura 7.

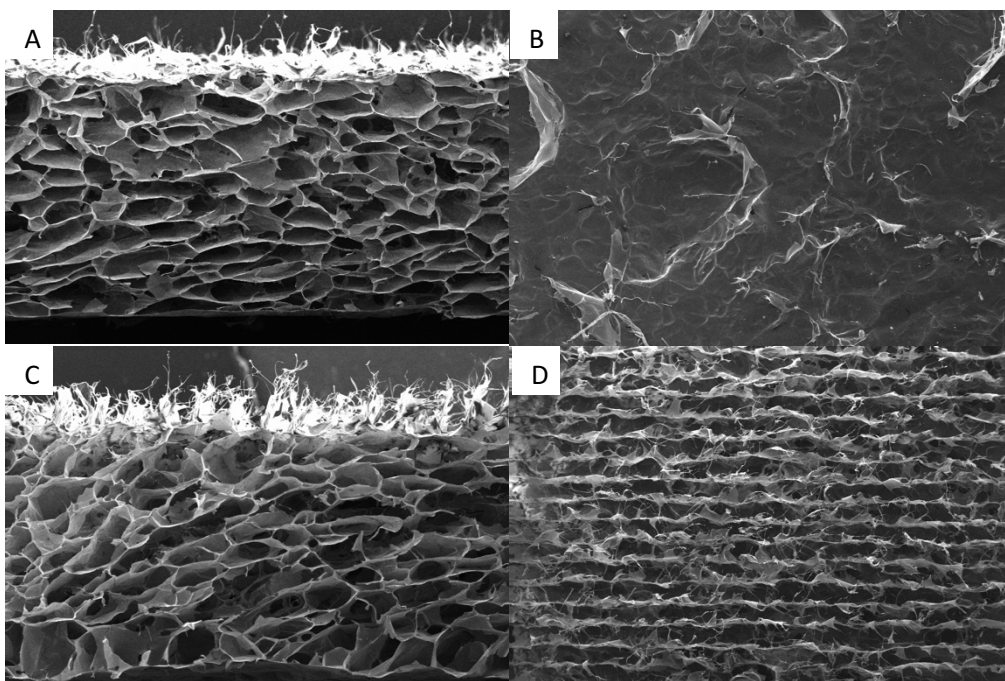


Figura 7: Fotografías por microscopía electrónica de barrido a las dos formulaciones de las matrices poliméricas. A. Fotografía transversal de la estructura porosa de matriz lisa. B. Fotografía superficial de matriz lisa. C. Fotografía transversal de la estructura porosa de matriz estructurada. D. Fotografía superficial de matriz estructurada

2. Viabilidad celular

Las células cultivadas en monocapa y en las matrices lisa y estructurada, fueron sometidas al ensayo con Resazurin® a las 48 h de haber sido sembradas. Se observó que las matrices son compatibles con las células ya que, la reducción de rezasurin no difiere entre cada condición de cultivo, exhibe altos porcentajes de viabilidad con respecto a los cultivos monocapa, como situación control. Los valores obtenidos, expresados en porcentaje, se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: Tabla resumen de los porcentajes de viabilidad y de adherencia de células en matriz.

Matriz Lisa	Porcentaje de viabilidad	92,49
	Porcentaje de Adherencia	98,94
Matriz Estructurada	Porcentaje de viabilidad	88,08
	Porcentaje de Adherencia	94,62

3. Calificación de ARN

La cuantificación de ARN obtenidos de los cultivos fue medido por nanodrop®, utilizando agua libre de nucleasas como blanco debido a ser ésta el buffer de elución. Para asegurar una mejor concentración para los procesos posteriores, se unificaron las extracciones de los triplicados en uno solo, obteniendo mejoras en la concentración final de ARN. Las matrices poliméricas fueron compatibles con la línea celular pero, se obtuvieron rendimientos muy bajos de ARN. Las concentraciones e índices obtenidos están descritos en la tabla 3. Se obtuvo material suficiente sólo desde los

cultivos en monocapa, para ser retro-transcrito y posteriormente sometido a PCR en tiempo real.

Tabla 3: Cuantificación de ARN por Nanodrop. Valores obtenidos para los índices 260/280, 260/230 y sus concentraciones a los distintos días de diferenciación, en cada cultivo de interés.

Calificación ARN		Criterio	Valor
Monocapa	Día 0	260/280	2,05
		260/230	1,57
		Concentración ng/uL	132,69
	Día 7	260/280	2,10
		260/230	2,09
		Concentración ng/uL	662,49
Polímero Liso	Día 0	260/280	1,97
		260/230	0,75
		Concentración ng/uL	12,97
	Día 7	260/280	1,79
		260/230	0,03
		Concentración ng/uL	6,55
Polímero Estructurado	Día 0	260/280	1,93
		260/230	0,33
		Concentración ng/uL	30,74
	Día 7	260/280	1,76
		260/230	0,03
		Concentración ng/uL	5,75

4. Expresión de marcadores por PCR en tiempo real

Debido a las concentraciones obtenidas se realizó retrotranscripción y PCR en tiempo real sólo a los ARN obtenidos desde los cultivos monocapa, revisando posteriormente la identidad de los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Se comprobó amplificación del gen constitutivo PBDG, para desmina (marcador temprano) y miogenina (marcador medio) en ambos días de diferenciación, a diferencia del gen miosina (marcador tardío) el cual solo amplificó el séptimo día de diferenciación, lo que se reflejó en el análisis electroforético (Fig. 8). Debido a los bajos valores de ARN obtenidos desde las matrices no se realizó la reacción de retrotranscripción ya que, por ser una reacción sustrato-enzima, ésta última no produciría el ADNc necesario para una reacción PCR en tiempo real, obteniéndose así amplicones específicos no correspondientes a los genes objetivos.

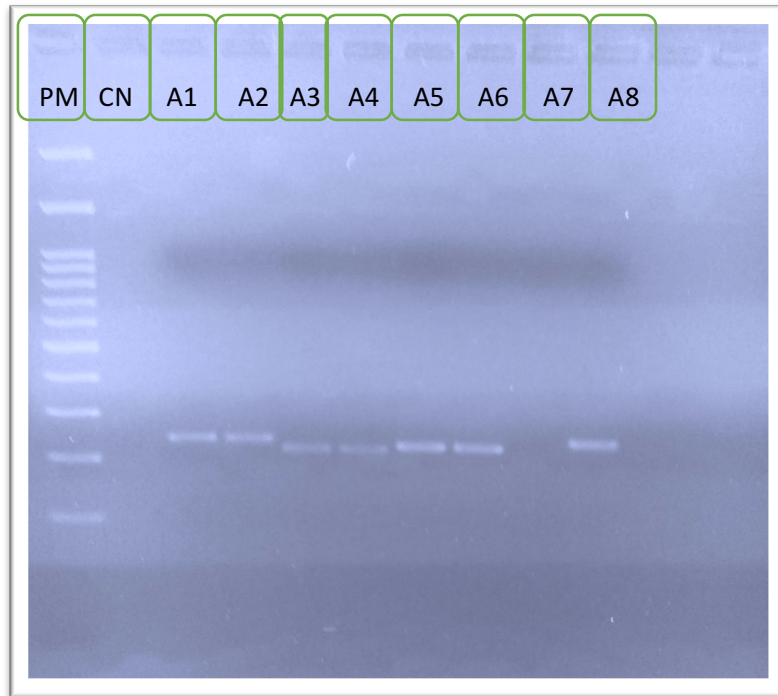


Figura 8: Electroforésis en gel de agarosa al 2%. Amplicones de los genes PBDG, desmina, miogenina y cadena pesada de miosina. PM. Marcador o escala de tamaño molecular. CN. Control negativo. A1. Gen PBDG al día 0 de diferenciación. A2. Gen PBDG al día 7 de diferenciación. A3. Desmina al día 0 de diferenciación. A4. Desmina al día 7 de diferenciación. A5. Miogenina al día 0 de diferenciación. A6. Miogenina al día 7 de diferenciación. A7. Miosina al día 0 de diferenciación. A8. Miosina al día 7 de diferenciación.

La amplificación de cada gen fue determinada por la fluorescencia emitida durante cada ciclo de amplificación y registradas por el software de qPCR en las siguientes curvas, Fluorescencia vs. Ciclo de amplificación. Figuras 9-12.

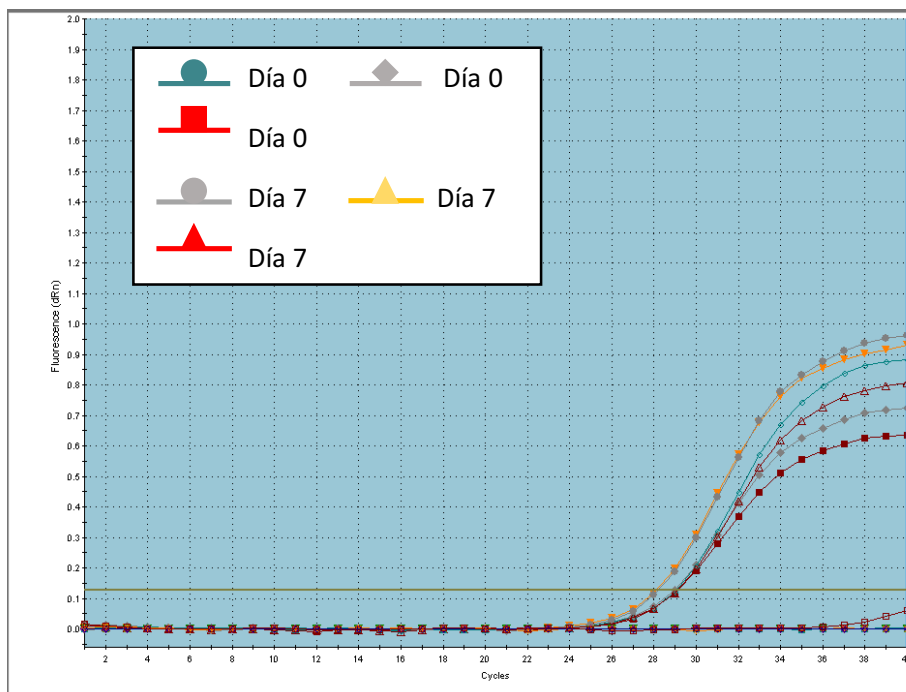


Figura 9: Gráfico de amplificación del gen PBDG. Se evidencia amplificación del gen constitutivo a los días cero y siete a partir de los ciclos número 29 y 28,5, respectivamente. No se evidencia amplificación de los controles negativos.

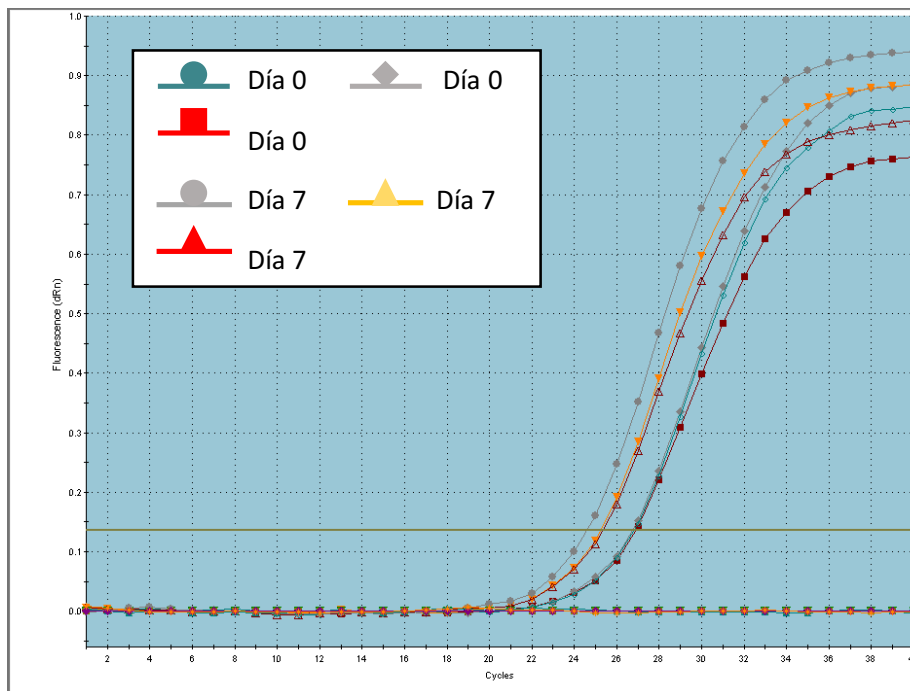


Figura 10: Gráfico de amplificación del gen desmina. Se evidencia amplificación a los días cero y siete a partir de los ciclos número 26,8 y 25, respectivamente. No se evidencia amplificación de los controles negativos.

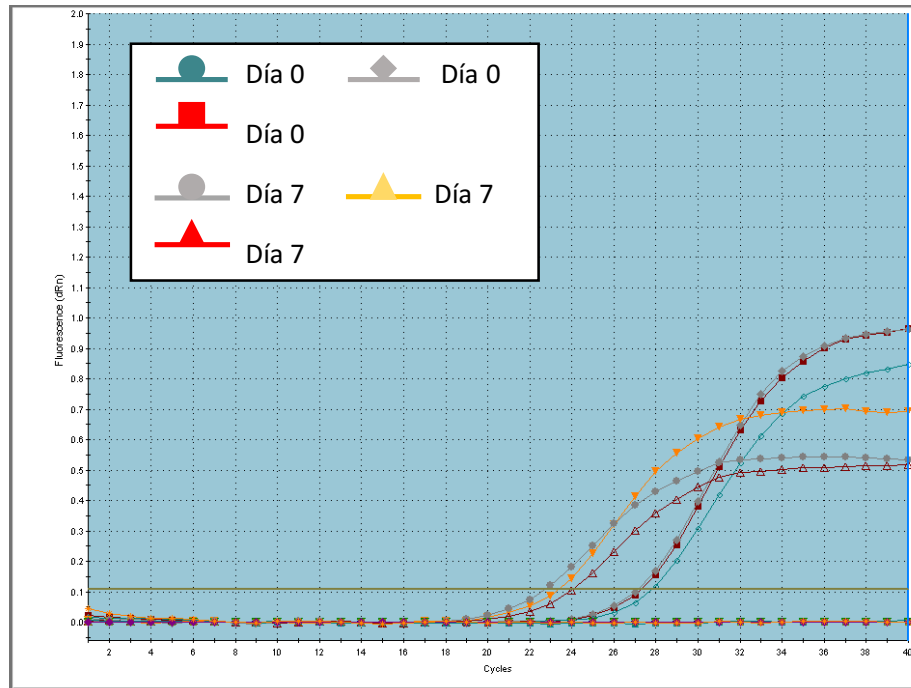


Figura 11: Gráfico de amplificación del gen miogenina. Se evidencia amplificación a los días cero y siete a partir de los ciclos número 27,6 y 23,6, respectivamente. No se evidencia amplificación de los controles negativos.

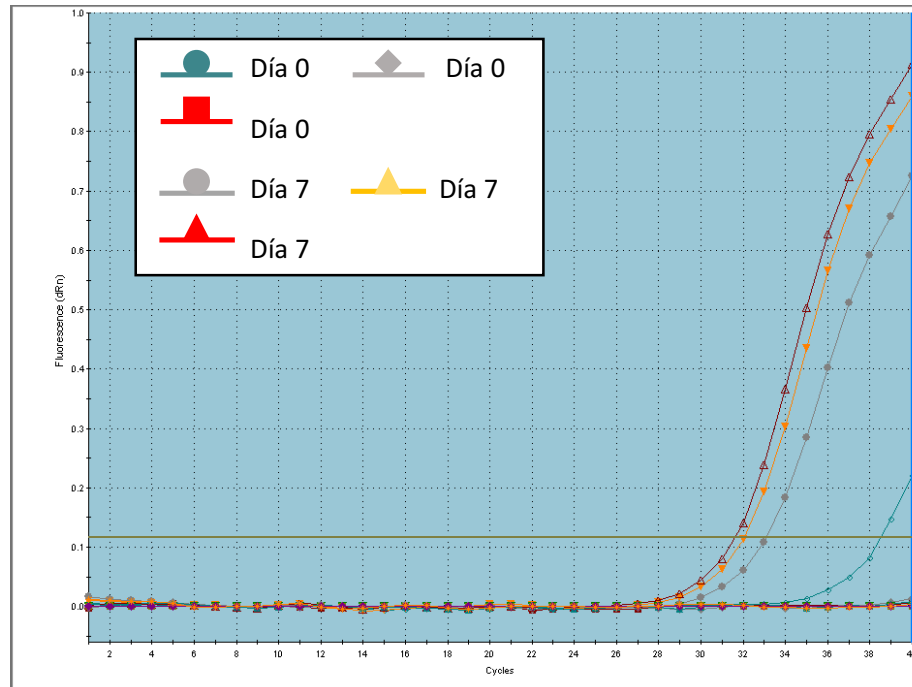


Figura 12: Gráfico de amplificación del gen miosina. Se evidencia amplificación sólo a día siete a partir del ciclo 32,3. No se evidencia amplificación de los controles negativos.

Las curvas de denaturación para cada gen objetivo evidenciaron una única temperatura de fusión asociada a su amplicón (Anexo 1). El gen PBDG presentó una temperatura de $81,75 \pm 0,24$ °C, el gen de desmina una temperatura de $84,60 \pm 0,24$ °C, el gen de miogenina una temperatura de $87,04 \pm 0,01$ °C y finalmente el gen de miosina una temperatura de $83,42 \pm 1,61$ °C. Es así como estas temperaturas son coincidentes con la terórica y se correlacionan con la presencia de un amplicón único observado en la electroforesis, corroborando amplificación selectiva.

Para el cálculo de la expresión relativa sólo se utilizaron los datos de puntos de corte correspondientes a las curvas de fluorescencia de células en monocapa. Para llevar a cabo este procedimiento fue necesario efectuar las curvas de eficiencia de los genes amplificados, cuyos datos se resumen en la tabla 3 y sus gráficas en el anexo 2. La curva de eficiencia para miosina no se pudo llevar a cabo por la nula amplificación en la situación control.

Tabla 4: Tabla resumen de los valores obtenidos en curvas de eficiencia de cada gen.

Criterio \ Gen	PBDG	Desmina	Miogenina	Miosina
Coeficiente de correlación (R^2)	0,913	0,985	0,956	0,996
Pendiente	-3,300	-4,005	-4,554	-2.841
Eficiencia	1,0092	0,7769	0,6581	1,2489

Finalmente, el cálculo de la expresión relativa de los genes amplificados se realizó por medio del método Pfaffl. Se estableció el día cero como condición basal en cada uno de estos genes. Como resultado puede observarse aumento de la expresión de desmina, miogenina y miosina, en 1,9; 5,6 y 104,7 veces mas, transcurridos los siete días desde el inicio del proceso de inducción de diferenciación (Fig. 13a-c).

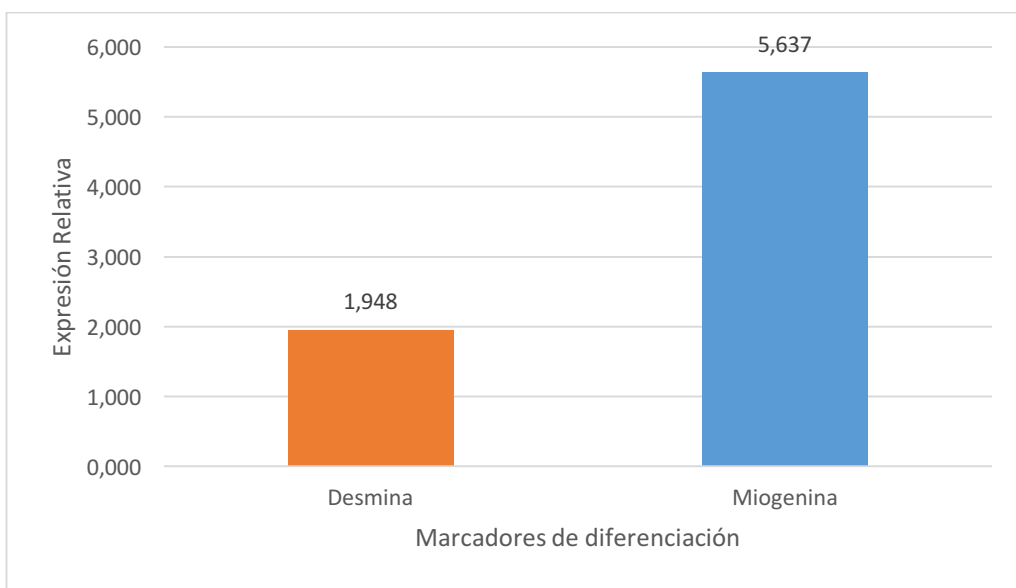


Figura 13a: Gráfico comparativo entre la expresión relativa de los genes desmina y miogenina, en células C2C12 cultivadas en monocapa al día 7 de diferenciación. Como situación control se estableció el día 0 de diferenciación. (n=1)

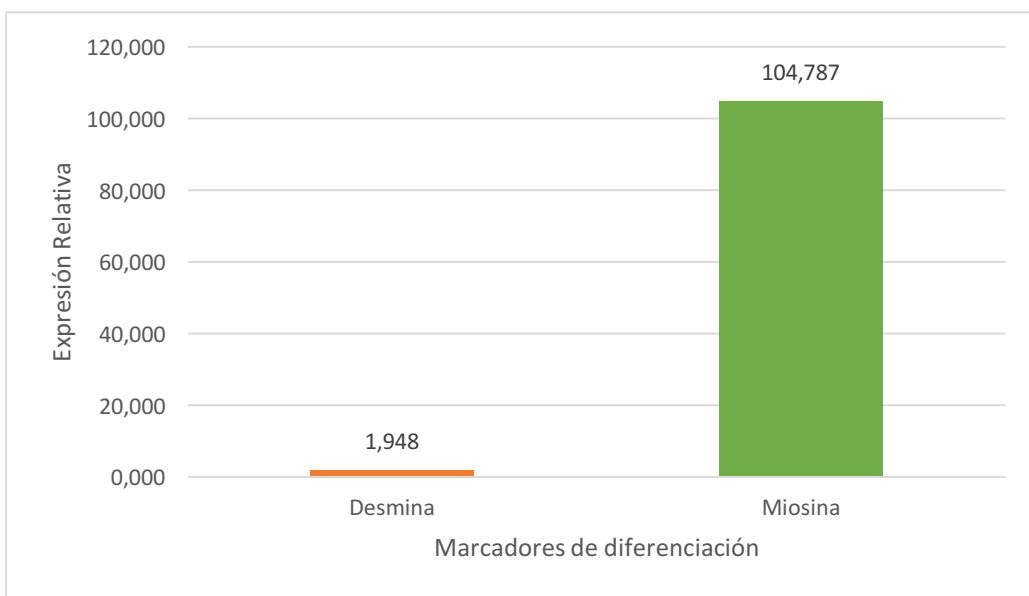


Figura 13b: Gráfico comparativo entre la expresión relativa de los genes desmina y miosina, en células C2C12 cultivadas en monocapa al día 7 de diferenciación. Como situación control se estableció el día 0 de diferenciación. (n=1)

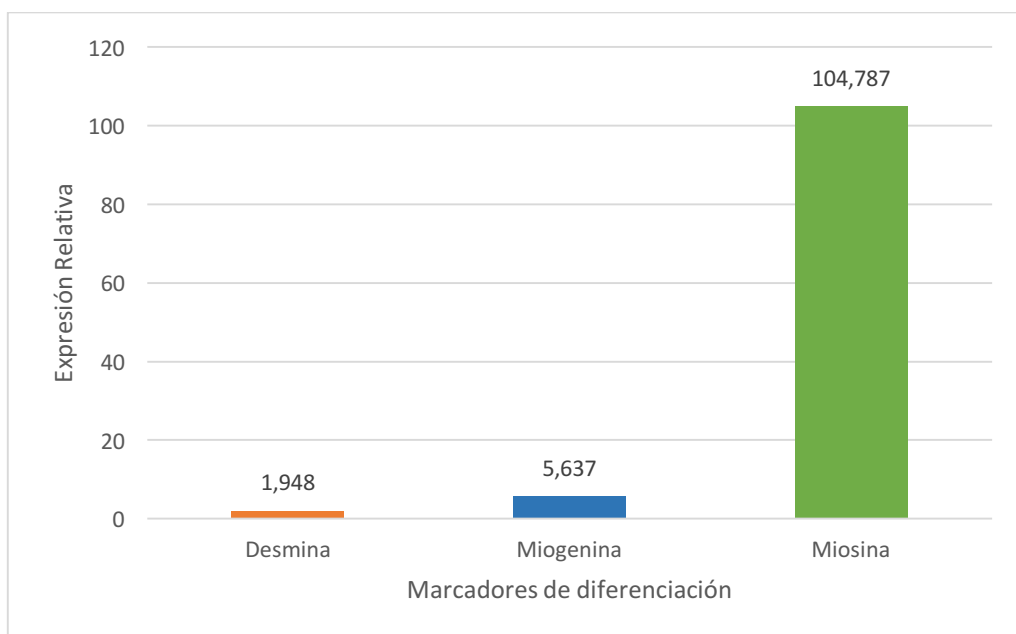


Figura 13c: Expresión relativa de los genes desmina, miogenina y miosina, en células C2C12 cultivadas en monocapa al día 7 de diferenciación. Como situación control se estableció el día 0 de diferenciación. (n=1)

DISCUSIÓN

Los antecedentes respecto a la ingeniería de tejidos y sus cultivos demuestran lo complejo de esta ciencia y sus aplicaciones. Para que la triada (Célula-Matriz-Factores de crecimiento) se vea favorecida deben poseer una sinergia única, alta comunicación y factores externos que promuevan el desarrollo celular, como fue explicado anteriormente. En esta investigación la unidad crítica fue la matriz de cultivo, la cual debía ser capaz de poseer afinidad, permitir adherencia, la extracción de ARN, viabilidad y la diferenciación de las células incorporadas a éstas. Los bajos rendimientos obtenidos de la extracción de ARN desde las matrices evaluadas, pueden deberse a la dificultad del proceso de extracción desde la matriz o un error en la elección del método de extracción. Es así como se enfatiza la complejidad del trabajo de formulación, entrecruzamiento y el acondicionamiento de las matrices, como un conjunto de factores que podrían interferir en el proceso de extracción.

Los resultados obtenidos en los experimentos de viabilidad y adherencia a 48 h sugieren que los resultados obtenidos en cuanto a la calidad y cantidad del ARN se atribuyen a una interferencia de los componentes de la matriz con la metodología para extracción de ácidos nucleicos. Sin embargo, aún es posible argumentar que a los 7 días de cultivo sobre las matrices estudiadas, las células pudieran perder viabilidad. Esto porque los experimentos en que se extrae ARN a día cero son efectuados justo antes de agregar el medio diferenciador, pero las células llevan por lo menos 72 h en la matriz bajo condiciones estándar de cultivo.

En consecuencia, se mantienen las interrogantes relacionadas con la biocompatibilidad célula-matriz y se debe esclarecer en qué forma la composición de la matriz polimérica juega un rol importante en la adherencia. Por ejemplo, puede presentar un déficit en esta característica debido a las proporciones utilizadas para su composición. La concentración final de gelatina puede jugar un rol importante en la formación de un buen complejo con el alginato, modificando los criterios de adhesión celular, debido a las propiedades eléctricas de este polímero, por el contrario, una alta concentración podría causar la pérdida de rigidez necesaria para una matriz biocompatible.³⁷ Por otra parte, el contenido de alginato, puede desfavorecer en la similitud con la MEC, ya que su entrecruzamiento podría generar una estructura tridimensional no homogénea, muy rígida o una alta fuerza de tensión, debiéndose ajustar sus concentraciones en estudios futuros.³⁸ Sin embargo, sus propiedades hidrofílicas, no inmunogénicas y de baja toxicidad, son favorables para el cultivo celular y para su uso posterior como alimento.

En la composición de las matrices, el contenido de sorbitol y agarosa podrían interferir como un impedimento químico por su polaridad, impedimento físico por su capacidad plastificante, tanto en la adhesión, proliferación y comunicación, impidiendo el paso de gases necesarios para las células como también la permeabilidad del agua.²⁹

Cabe destacar que en estudios anteriores las matrices entrecruzadas con fibrina como polímero, la cual es un gel formado por la polimerización después de la acción

de trombina, ha presentado mejorías en la proliferación, migración y diferenciación celular en los cultivos utilizados para trasplante de piel humana³⁹, siendo ésta, otra alternativa en la composición del polímero en estudio y sus aplicaciones, sin embargo, no cumple con las condiciones de búsqueda de matrices libres de componentes mamíferos.

La falta de estimulación física, química, mecánica de las células ya incorporadas en la matriz podría ser un factor importante durante la adherencia o diferenciación de las células con la matriz. Estudios realizados en matrices como cultivo, con distintas estimulaciones aplicadas como aplicaciones magnéticas, eléctricas, mecánicas o aumento de los niveles de calcio en el medio de cultivo, favorecieron el crecimiento y la diferenciación de estas células.⁴⁰

Otro factor importante al momento de generar una matriz polimérica es la distribución de las fibras o estructuras internas, con el fin de favorecer la similitud con la MEC generando mejoras en la comunicación, adherencia, proliferación y diferenciación celular. El proceso de *electrospinning* fue originalmente desarrollado para la producción de fibras ultra finas en polímeros, asemejando la arquitectura y propiedades mecánicas de la MEC. Se ha demostrado la similitud entre las fibras de matrices con las fibrillas de colágeno y éstas son capaces de favorecer las respuestas biológicas de las células sembradas.⁴¹ El *electrospinning* es un proceso simple y económico en la producción de matrices con polímeros biodegradables como componentes.⁴² Estos cultivos se han caracterizado por su alta porosidad con

un amplia distribución de los diámetros de estos poros, su extensa área superficial y similitudes a fibras de colágeno.^{42,43}

Es así como una modificación de la composición de la matriz, la aplicación de procesos de producción favorables y las aplicaciones de estímulos en el periodo de crecimiento y diferenciación podrían favorecer los parámetros en estudio con matrices poliméricas, permitiendo un mejor desarrollo de las células en éstas.

Respecto a la extracción de ácidos nucleicos desde las células adheridas a las matrices, la composición y sus proporciones podrían ser los factores de contaminación e interferencia prominentes en cuanto a la lectura de absorbancia y su posterior uso y análisis, por ejemplo, la gelatina podría interferir en el índice 260/280 por su naturaleza proteica e interferir eléctricamente con los buffers del kit comercial; alginato, sorbitol y agarosa, podrían interferir en el índice 260/230, por exceso de carbohidratos en la extracción final. Estos componentes interfieren en el uso posterior del ARN extraído, inhibiendo o impidiendo las acciones enzimáticas en las técnicas utilizadas.⁴⁴ Estos parámetros podrían beneficiarse al modificar el protocolo de extracción, ya que se ha evidenciado mejoría en éstos cuando se utiliza una mezcla de técnicas al momento de extracción, con solventes orgánicos y caotrópicos junto a las columnas de extracción por sistemas comerciales de extracción de ARN.⁴⁵ Sin embargo, sigue siendo una metodología de ensayo y error.

Existen parámetros en el área de cultivos celulares que pueden modificarse para observar avances en la expresión de los marcadores de diferenciación. Algunos de

interés son la composición y las proporciones del medio diferenciador y el estado de confluencia del cultivo. Evaluar distintas concentraciones del suero de caballo podría esclarecer la capacidad diferenciadora que poseen las células sometidas a esta condición, ya que a bajas concentraciones puede inducir la salida del ciclo celular, deteniendo o enlenteciendo la diferenciación celular, sin embargo, también es útil evaluar la diferenciación añadiendo al suero insulina, la cual ha evidenciado mejoría en los grados y velocidad de diferenciación.⁴⁶ Otro criterio importante a analizar es el estado de confluencia del cultivo, ya que, podría afectar también el desarrollo celular, un estado muy confluyente genera una inhibición por contacto, estado en que las células modifican sus patrones de expresión y secreción de factores de crecimiento.⁴⁷

Otra condición que vale la pena investigar son los días de diferenciación, se ha observado que a los días 14 y 21, tanto morfológicamente como genéticamente, se exhiben los marcadores más tardíos de la diferenciación⁴⁸ sin embargo, previo al estudio de esta condición se debe asegurar una optimización en la composición en las matrices poliméricas, permitiendo la adherencia y crecimiento de las células, parámetros que se pueden estudiar con cualquier técnica que permite examinar viabilidad celular.

Durante la miogénesis, se ha destacado la participación del ácido fólico en la diferenciación y crecimiento. Es así como Hwang y cols el año 2017 describieron que la deficiencia en ácido fólico en los tejidos musculares debilita la proliferación y

diferenciación de células mioblásticas y que al re-suplementar con ácido fólico los cultivos se revierte la inhibición de crecimiento y de diferenciación.⁴⁹ Por lo tanto se convierte en un candidato a incorporar en futuros estudios en la diferenciación mioblástica.

La retrotranscripción del ARN obtenido desde las matrices no fue realizada debido a la nulidad del contenido génico en éstas, ya que al ser una reacción sustrato-enzima, ésta última hubiese realizado su acción en muy poco ARN obteniéndose escaso ADNc. Esto último limitó la posibilidad de efectuar la posterior PCR en tiempo real, que hubiera estado interferida por proteínas y por carbohidratos que contaminaban estas muestras de bajo rendimiento.

Con respecto al material genético obtenido desde los cultivos en matrices, es necesario contar con un control positivo para la extracción de ARN y apoyarse con estudios de viabilidad, para determinar si estas matrices cumplen con las propiedades anteriormente mencionadas que favorezcan su adherencia y diferenciación. Además este tipo de control, permitirá determinar si el método seleccionado para obtener el ARN desde matrices es idóneo para análisis de retrotranscripción acoplada a PCR.

Por otra parte, el control de cultivo en monocapa, evidenció la expresión de los genes marcadores de diferenciación en comparación al estado basal de las células al día cero. Este resultado valida la técnica de PCR y la capacidad celular de

diferenciarse, bajo las condiciones utilizadas en este estudio, ya que todos los marcadores aumentaron su expresión relativa, especialmente los de diferenciación media y tardía.

También se comprobó que la amplificación de los genes evaluados fue específica mediante el análisis de las temperaturas de fusión y por el gel de agarosa que mostró un amplicón del tamaño esperado. Chen y cols. el año 2015, determinaron que la expresión de miogenina a nivel proteico en células C2C12, bajo condiciones de diferenciación, aumenta de 12 a 60 veces mas en los días 4 y 6, que no está tan lejano del aumento en la expresión relativa de cinco veces encontrado en este estudio a nivel de transcrito de ARNm.

Las expresiones relativas observadas a día siete de diferenciación en el cultivo monocapa para el gen desmina aumenta, aunque en menor proporción a los otros marcadores, y se puede atribuir a su rol importante en la regeneración y proliferación celular, pero que ocurriría en menor proporción que cuando la célula se encuentra en un estado netamente proliferativo.²²

En la determinación de la expresión relativa para el gen miosina, se observa un aumento considerable de ésta transcurridos los siete días de diferenciación. Chen y cols. el año 2015, determinaron un aumento de la expresión de miosina de entre 7 a 280 veces mas entre los días 2 y 6, evidenciando la normalidad de su alta expresión. Cabe destacar que para el cálculo de la expresión relativa de miosina,

solo se utilizó el único valor obtenido de las pseudoréplicas, siendo imposible determinar su significancia estadística.

Será interesante a futuro, investigar la expresión de otros marcadores de diferenciación, por ejemplo, α -actina, tropomiosina, troponina-C y troponina-I¹⁰, determinando así, el avance del cultivo de células mioblásticas en una matriz tridimensional.

CONCLUSIONES

1. Las matrices poliméricas libres de componentes mamíferos fueron compatibles en su cultivo con la línea celular murina C2C12.
2. Las matrices poliméricas no permitieron la extracción de ARN para su posterior estudio de diferenciación muscular.
3. Se exhibe expresión transcripcional relativa de los genes desmina, miogenina y miosina, en células C2C12 en cultivo monocapa en condiciones pro-miogénicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Steele K. 2013. An exploration of vegan experiences with vegans from Burlington. Environmental Studies Thesis. University of Vermont. 1-186.
2. Nielsen. 2016. ¿Qué hay en nuestra comida y en nuestra mente? http://www.nielsen.com/content/dam/nielsen-global/latam/docs/reports/2016/EstudioGlobal_NuestraComidaYMente.pdf. (página visitada el 3 de Marzo del 2017).
3. Carlson B. *Embriología Humana Y Biología Del Desarrollo*. Editorial Elsevier. Quinta edición. Barcelona, España. 2014. pp: 178-192.
4. Patz TM y cols. 2005. Two-dimensional differential adherence and alignment of C2C12 myoblasts. *Materials Science and Engineering B*. 123(3): 242-247.
5. American Type Culture Collection. 2017. C2C12 (ATCC® CRL-1772™). Product sheet:1-3.
6. De Klerk E y cols. 2015. Assessing the translational landscape of myogenic differentiation by ribosome profiling. *Nucleic Acids Research*. 43(9):4408-4428.

7. Du J y cols. 2016. MiR-145a-5p Promotes myoblast differentiation. *Biomed Research International*. Vol. 2016. Article ID: 5276271.
8. Kodaka Y, Rabu G y Asakura A. 2017. Skeletal muscle cell induction from pluripotent stem cells. *Hindawi, stem cells international*. Vol.2017:5030.
9. Li H y Capetanaki Y. 1993. Regulation of the mouse desmin gene: Transactivation by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. *Nucleic Acids Research*. 21(2):335-343.
10. Burattini S y cols. 2004. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *European Journal of histochemistry*. 48(3):223-233.
11. Li Z y cols. 1997. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *The Journal Cell Biology*. 139(1):129-144.
12. Buckingham M y Rigby P. 2014. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Development Cell Review*. 28(3):225-238.

13. Fuertes L y cols. 2013. Immunohistochemistry in Dermatopathology: A Review of the Most Commonly Used Antibodies (Part I). *ACTAS Dermosifiliográficas*. 104(2):99-127.
14. Walker M y cols. 2000. Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature*. 405(6788):804-807.
15. Morkin E. 2000. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microscopy Research and Technique*. 50(April):522-531.
16. Delling U y cols. 2000. A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Molecular and Cellular Biology*. 20(17):6600-6611.
17. Ono Y y Sakamoto K. 2017. Lipopolysaccharide inhibits myogenic differentiation of C2C12 myoblasts through the Toll-like receptor 4-nuclear factor- κ B signaling pathway and myoblast-derived tumor necrosis factor- α . *PLoS ONE*. 12(7): e0182040
18. Tanyel F y cols. 2005. Myogenesis within the human gubernaculum: Histological and immunohistochemical evaluation. *Eur J Pediatr Surg*. 15(3):175-179.

19. Cui S y cols. 1999. Evaluation of new monoclonal anti-MyoD1 and anti-myogenin antibodies for the diagnosis of rhabdomyosarcoma. *Pathology International*. 49(1):62-68.
20. Langen R y cols. 2004. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 18(2):227-237.
21. Gang E y cols. 2004. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochememical Biophysical Research Communications*. 321(1):102-108.
22. Chen Y y cols. 2015. Identification of histamine receptor subtypes in skeletal myogenesis. *Molecular Medicine Report*. 11(4):2624-2630.
23. Li W-J y cols. 2003. Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(e-caprolactone) scaffolds. *J Biomed Mater Res*. 67A(4):1105-1114.
24. Fabres C. 2010. Técnicas del futuro: Ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 21(3):488-493.

25. Wang L y cols. 2003. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials*. 24(20):3475-3481.
26. Kwak H y cols. 2017. Fabrication of an ultrafine fish gelatin nanofibrous web from an aqueous solution by electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*. 102:1092-1103.
27. Weinstein C y cols. 2017. Design of a hybrid biomaterial for tissue engineering: Biopolymer-scaffold integrated with an autologous hydrogel carrying mesenchymal stem-cells. *Materials Science and Engineering C*. 79:821-830.
28. Acevedo C y cols. 2015. Improvement of biomaterials used in tissue engineering by an ageing treatment. *Bioprocess Biosyst Eng*. 38(4):777-785.
29. Arvanitoyannis I y Biliaderis C. 1999. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydrate Polymers*. 38(1):47-58.
30. Olivas G y Barbosa-Cánovas G. 2008. Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT - Food Science Technology*. 41(2):359-366.

31. Doraiswamy A y cols. 2006. Two-dimensional differential adherence of neuroblasts in laser micromachined CAD/CAM agarose channels. *Applied Surface Science*. 252(13):4748-4753.
32. Kroehne V y cols. 2008. Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts. *Journal Cellular Molecular Medicine*. 12(5A):1640-1648.
33. Wang Y y cols. 2005. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 26(34):7082-7094.
34. Ahmed A, Gogal R y Walsh J. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *Journal Immunological Methods*. 170(2):211-224.
35. Livak K y Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods*. 25:402-408.
36. Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9):e45.

37. Karim A y Bhat R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocoll.* 23(3):563-576.
38. Stampella A y cols. 2015. Human hepatoma cell lines on gas foaming templated alginate scaffolds for in vitro drug-drug interaction and metabolism studies. *Toxicology in Vitro.* 30(1):331-340.
39. Weinstein C y cols. 2010. The effect of an autologous cellular gel-matrix integrated implant system on wound healing. *Journal of Translational Medicine.* 8:59.
40. Somers S y cols. 2017. Biophysical Stimulation for Engineering Functional Skeletal Muscle. *Tissue Engineering.* DOI: 10.1089.
41. Li W-J y cols. 2005. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials.* 26(25):5158-5166.
42. Yoshimoto H y cols. 2003. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 24(12):2077-2082.

43. Li W-J y cols. 2005. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 26(6):599-609.
44. Carvalhais V y cols. 2013. Controlled RNA contamination and degradation and its impact on qPCR gene expression in *S. epidermidis* biofilms. *Journal of Microbiological Methods*. 95(2):195-200.
45. Wang C y cols. 2008. RNA extraction from polysaccharide-based cell-laden hydrogel scaffolds. *Analytical Biochemistry*. 380(2):333-334.
46. Yafee D y Saxel O. 1977. A Myogenic Cell Line with Altered Serum Requirements for Differentiation. *Differentiation*. 7(1-3):159-166.
47. Veliça P y Bunce C. 2011. A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. *Muscle and Nerve*. 44(3):366-370.
48. Grabowska I y cols. 2011. Comparison of satellite cell-derived myoblasts and C2C12 differentiation in two- and three-dimensional cultures: changes in adhesion protein expression. *Cell Biology International*. 35(2):125-133.
49. Hwang S y cols. 2017. Folic acid is necessary for proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts. *Journal Cellular Physiology*. (9999):1-12.

ANEXOS

Anexo 1: Curvas de disociación de los genes marcadores de diferenciación miogénica, entregadas por el software de qPCR.

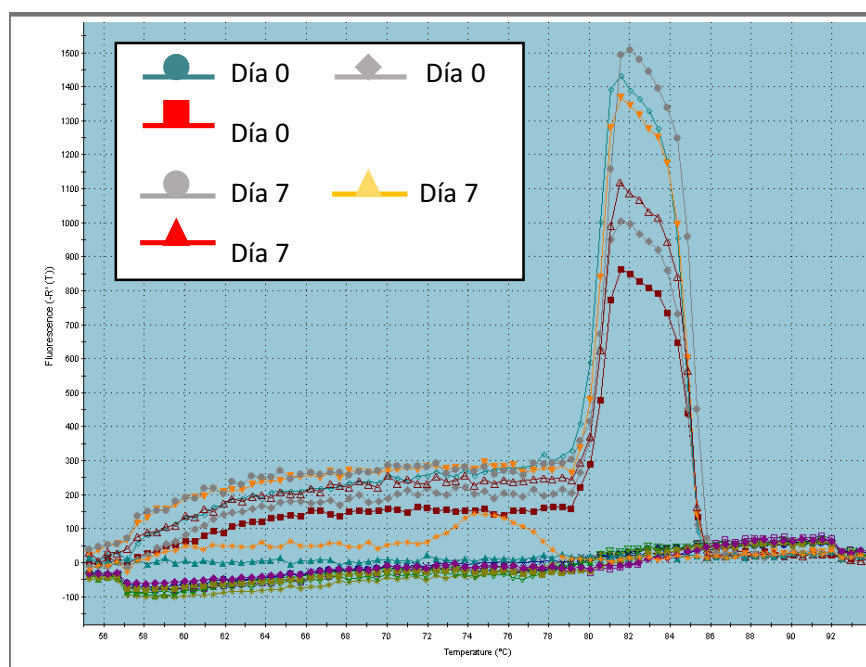


Ilustración 1: Curva de disociación gen PBDG.

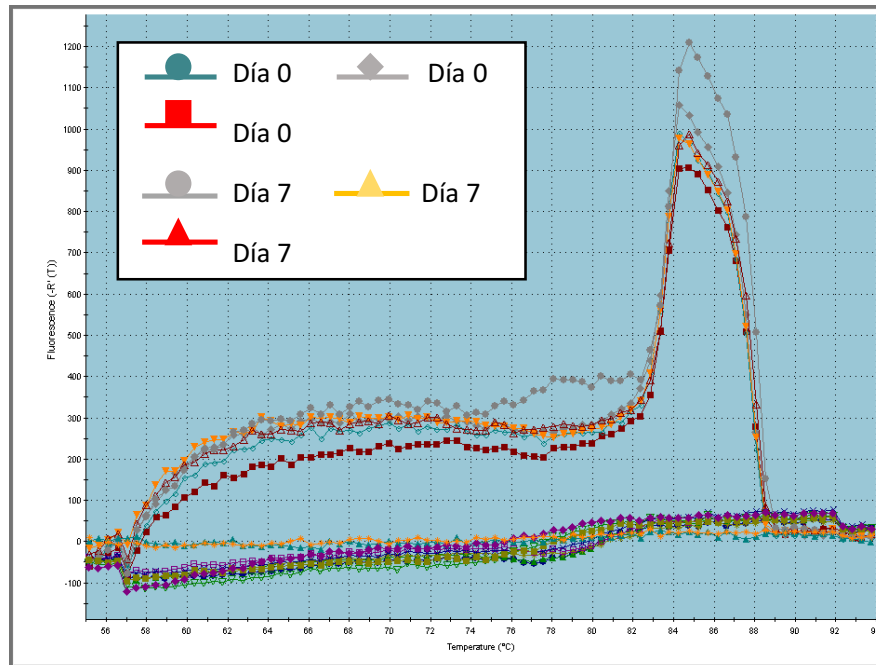


Ilustración 2: Curva de disociación gen desmina.

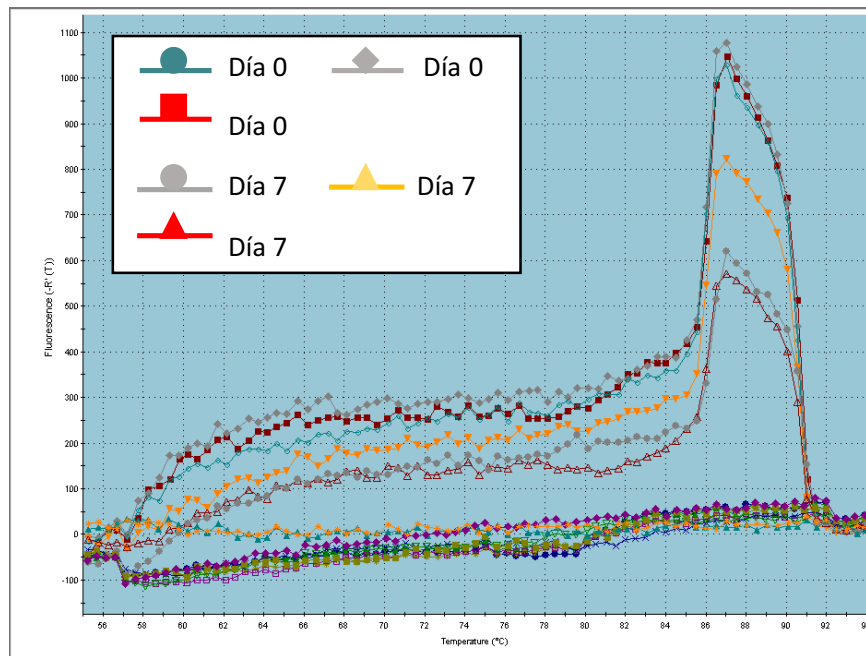


Ilustración 3: Curva de disociación gen miogenina.

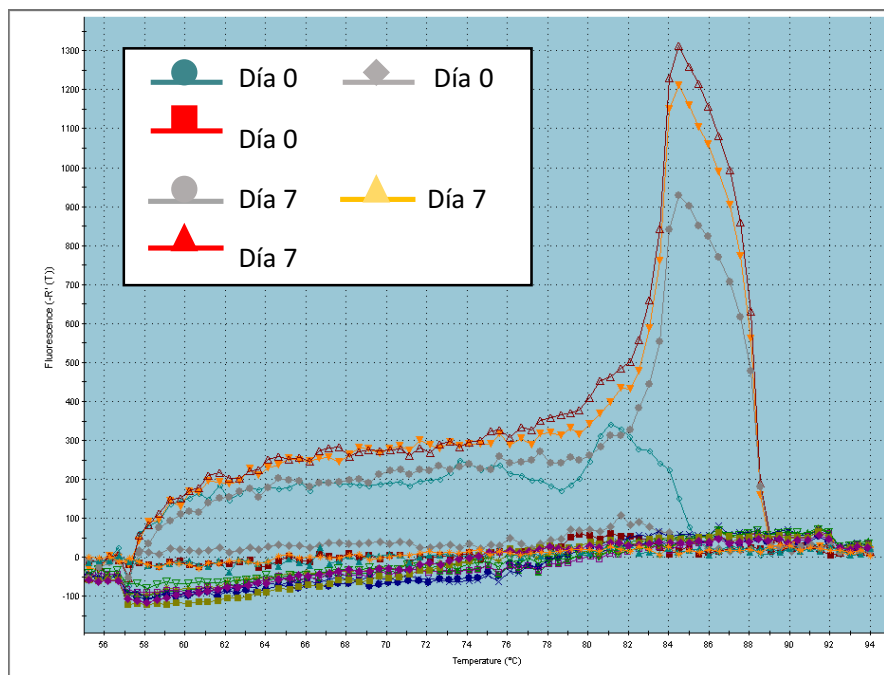


Ilustración 4: Curva de disociación gen miosina.

Anexo 2: Curvas de eficiencia de los marcadores de diferenciación miogénica.

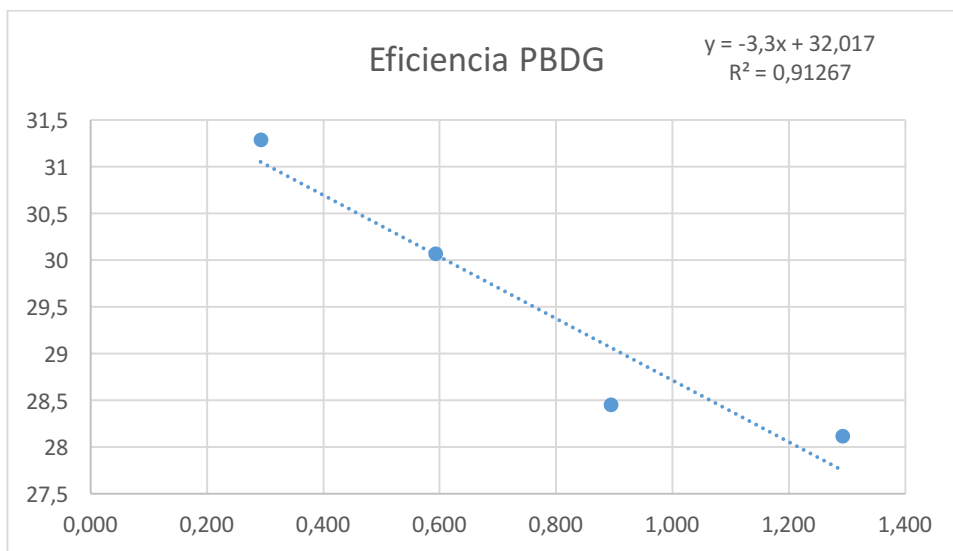


Ilustración 5: Gráfico Log de concentración vs Ct. Eficiencia del gen constitutivo PBDG.

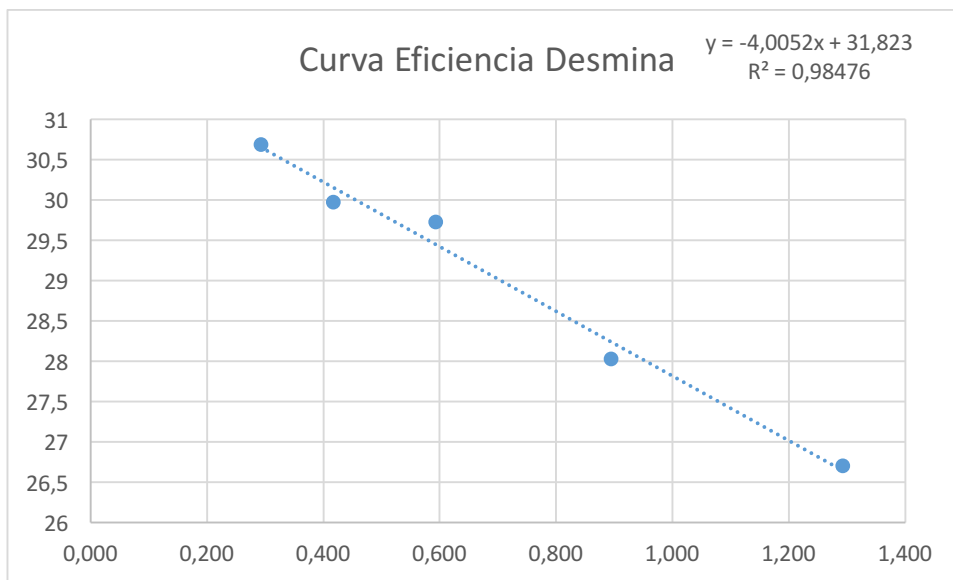


Ilustración 6: Gráfico Log de concentración vs Ct. Curva de eficiencia gen desmina.

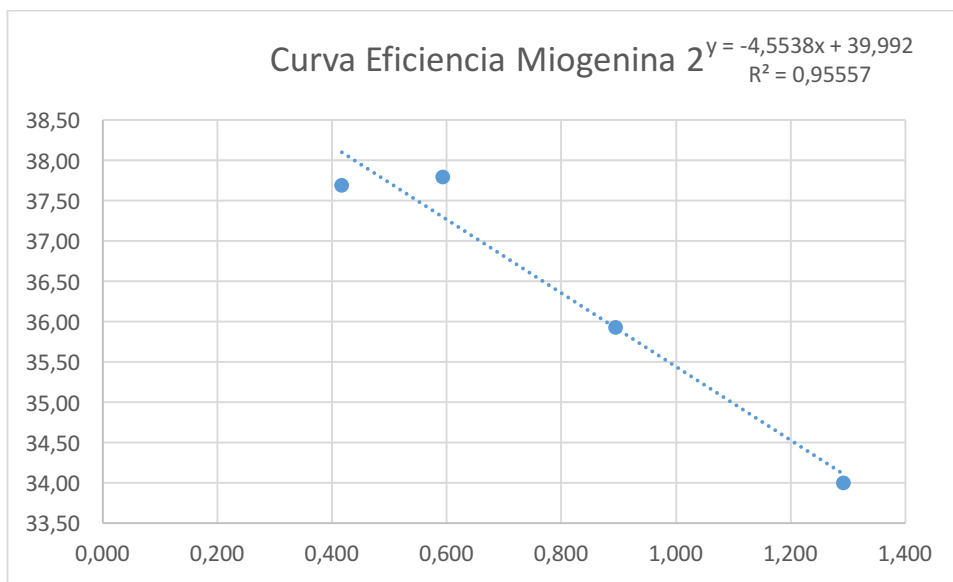


Ilustración 7: Gráfico Log de concentración vs Ct. Curva de eficiencia gen miogenina.

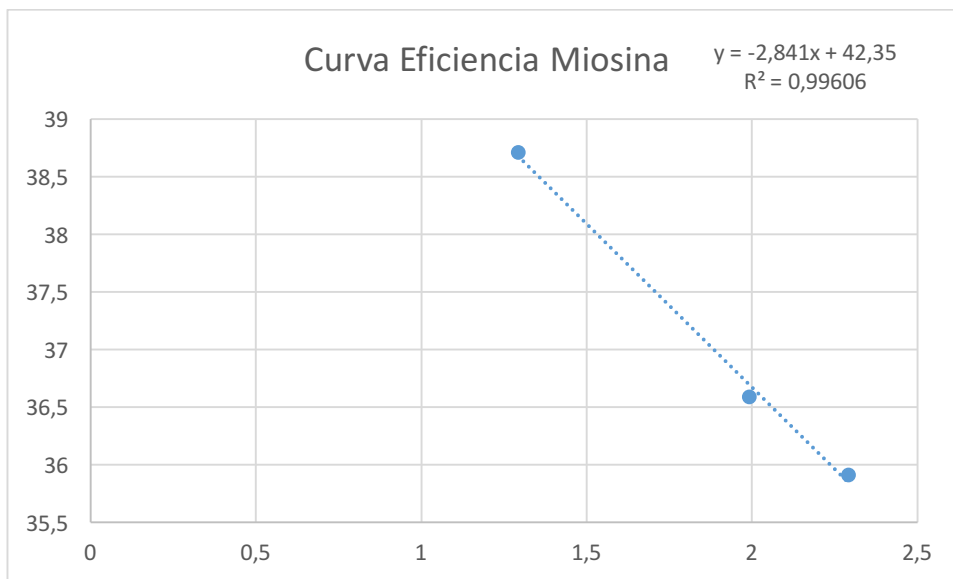


Ilustración 8: Gráfico Log de concentración vs Ct. Curva de eficiencia gen miosina.