



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE INNOVACIÓN TERAPÉUTICA Y DIAGNÓSTICO
MOLECULAR

**CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE CÉLULAS SATÉLITES DE
MÚSCULO EXTENSOR *DIGITORUM LONGUS* DE CONEJO**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

Cristian Víctor Manuel Meneses Zúñiga.

Director de Tesis: Dr. Cristian Acevedo.

Codirector de Tesis: Dra. Caroline Weinstein.

2018

Dedicado

A mis padres; Cristian y Marcela, todo esto es para ellos, por ellos y gracias a ellos

A mi abuelita Elena, mi tercer padre, la mujer más linda que hay

A mis hermanos Andrea, Karina y Benjamín

*A mi gran amor, amiga y compañera de vida Pamela,
nada sería ni remotamente lo feliz que es si no estuvieras conmigo para compartirlo*

A la profesora Caroline y a Tania quienes fueron una gran ayuda y apoyo en este trabajo

Muchas gracias

RESUMEN

Las células satélites son las células progenitoras del músculo esquelético en el adulto y se consideran como el principal tipo de célula implicada en la regeneración del músculo esquelético. En los últimos años el avance de la ciencia ha permitido comprender la biología y las aplicaciones de estas células.

De acuerdo con estos avances, la presente investigación se enfocó en establecer un protocolo y evaluar la expresión de transcritos como marcadores de diferenciación en células satélites expuestas a distintos medios miogénicos a partir de biopsias de músculo esquelético. Estas biopsias permitieron recuperar fibras musculares esqueléticas del músculo *extensor digitorum longus* de conejo, tratado con colagenasa tipo I y separación mecánica. Luego, se aislaron y cultivaron células satélites obtenidas a partir de estas fibras aisladas para someterlas a dos condiciones pro-miogénicas distintas: una más conservadora (EDL-A) y otra dirigida para promover su diferenciación (EDL-B). Las células satélite se caracterizaron mediante la expresión de un marcador transcripcional específico de estas, como Pax7, y el proceso de diferenciación se caracterizó mediante la evaluación de la expresión de marcadores transcripcionales asociados a sus diferentes etapas de diferenciación miogénica, temprana (desmina), intermedia (miogenina) y tardía (cadena pesada de miosina).

Se obtuvieron amplificaciones para pax-7 y desmina, las cuales establecen que se logró obtener cantidades suficientes de células satélite para lograr que estas se cultivaran y posteriormente diferenciaran en etapas tempranas de diferenciación. En tanto, las amplificaciones de los marcadores para etapas intermedias (miogenina) y tardías de diferenciación (cadena pesada de miosina) resultaron en amplificaciones indetectables.

Estos resultados, aunque requieren más estudios, sugieren que es posible aislar células satélite a partir del músculo *extensor digitorum longus* de conejo.

ABSTRACT

Satellite cells are the skeletal muscle progenitor cells in adults and they are considered as the main type of cell involved in the regeneration of skeletal muscle. In the past few years, the scientific advances had helped to understand the biology and application of these cells.

According to these advances, this research focuses on establishing a protocol and on evaluating the expression of transcripts as differentiation markers in satellite cells exposed to different myogenic environment, obtained from skeletal muscle biopsies. These biopsies allowed the recovery of skeletal muscle fibres from a rabbit *extensor digitorum longus* muscle. The fibers were treated with collagenase type I and mechanical separation. Afterwards, the satellite cells obtained from the fibers were isolated and cultivated to be subjected to two different pro-myogenic conditions: a conservative one (EDL-A) and other directed to promote their differentiation (EDL-B). The satellite cells were characterized by the expression of a specific transcriptional marker, such as Pax7; and the process of differentiation was characterized through the evaluation of the transcriptional markers expression associated to their myogenic differentiation stages: early (desmin), intermediate (myogenin) and late (myosin heavy chain).

Amplifications for Pax-7 and desmin were obtained, which means that enough quantities of satellite cells were obtained as to cultivate and differentiate them in early stages of differentiation. Meanwhile, the amplification of the differentiation markers for intermediate (myogenin) and late (myosin heavy chain) stages turned out as undetectable.

These results suggest that it is possible to isolate satellite cells from rabbit *extensor digitorum longus* muscle, although more research is needed.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

1- Introducción	10
1.1- Tejido muscular esquelético.....	10
1.2- Reparación muscular.....	11
1.3- Célula satélite.....	13
1.4- Marcadores transcripcionales.....	14
1.4.1- Pax-7.....	15
1.4.2- Desmina	16
1.4.3- Miogenina	17
1.4.3- Cadena pesada de miosina	17
2- Hipótesis.....	19
3-Objetivos	20
3.1-Objetivo General	20
3.2-Objetivos Específicos	20
4-Materiales y Métodos.....	21
4.1-Biopsia de músculo extensor digitorum longus.....	21
4.2-Obtención de fibras musculares desde biopsia de musculo EDL.....	21
4.3-Caracterización de células satélite y células musculares.....	24
4.4-Extracción de ARN	24
4.4.1-Transcripción reversa.....	25
4.4.2-Reacción de polimerasa en cadena en tiempo real q-PCR.....	26
4.4.2.1- Partidores	26
4.4.2.2- Amplificación	27
4.4.2.3- Especificidad de la amplificación	27
4.4.2.4- Determinación de expresión relativa	28
4.5-Análisis Estadístico.....	30

5-Resultados.....	31
5.1- Optimizar un protocolo para obtener y cultivar células satélite de conejo en cultivo primario	31
5.1.1- Tiempo de digestión	31
5.1.2- Evolución de los cultivos celulares	31
5.2- Evaluar la expresión de marcadores de miogénesis en cultivos sometidos a medios miogénicos o de proliferación celular	34
5.2.1- Extracción de ARN	34
5.2.2- q-PCR	34
5.2.2.1- Amplificación del gen constitutivo	34
5.2.2.1- Amplificación de marcadores transcripcionales	35
5.2.3- Expresión relativa de pax-7 y desmina	39
6- Discusión	40
7- Conclusión	46
8- Bibliografía	47
9- Anexos	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4-1. Suplementación de los medios de cultivo utilizados.....	24
Tabla 4-2. Tabla de Partidores.....	26
Tabla 5-1. Características de ARN extraído desde EDL-A y EDL-B.....	34
Tabla 5-2. Parámetros de curvas de eficiencia para GAPDH, Desmina y Pax-7.....	39
Tabla 5-3. Expresión relativa de Pax-7 y Desmina.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Representación gráfica de la estructura compleja de las envolturas del tejido conectivo rodeando a cada uno de los elementos formadores de músculo	11
Figura 1-2. Sección transversal que muestra una célula satélite	12
Figura 1-3. Esquema de la miogénesis de células satélite y marcadores típicos de cada etapa	15
Figura 4-1. Esquema de procesamiento de biopsias y condiciones de cultivo aplicados....	23
Figura 5-1. Fotografías de los cultivos EDL-A	32
Figura 5-2. Fotografías de los cultivos EDL-B	33
Figura 5-3. Amplificación del gen de referencia GAPDH en cultivos EDL-A y EDL-B.....	35
Figura 5-4. Amplificación del gen transcrito Pax-7 en cultivos EDL-A y EDL-B.....	36
Figura 5-5. Amplificación del gen del transcrito Desmina en cultivo EDL-B.....	37
Figura 5-6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para amplicones obtenidos por q-PCR.	38

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

El tejido muscular esquelético está constituido por fibras musculares que representan hasta la mitad de la masa del cuerpo humano. Su principal función es permitir la locomoción al producir las fuerzas contráctiles que resultan en el movimiento del esqueleto¹.

Las fibras, o células de los músculos esqueléticos, tienen forma alargada con una longitud que varía de 1 a 50 mm y con un calibre de 10 a 100 μm , incluso dentro de un mismo músculo. Cada célula muscular contiene numerosos núcleos alargados en el sentido de la fibra y dispuestos en su periferia. El sarcolema (membrana plasmática muscular) está rodeada por una membrana basal que, como en las células epiteliales, consta de una lámina basal y una capa de fibras reticulares. Las fibras musculares están rodeadas y protegidas por una vaina de tejido conjuntivo denso llamado epimisio. De esta vaina parten tabiques que se ramifican profusamente en el interior del músculo, dividiéndolo en fascículos de fibras y grupos de fascículos, todas estas ramificaciones constituyen el perimisio, de modo que grupos pequeños de fibras musculares, envueltas cada una de ellas por su perimisio, forman grupos mayores envueltos también por perimisio (Figura 1.1). Cada fibra muscular, a su vez, está recubierta de una delgada red de tejido conjuntivo reticular que contiene vasos sanguíneos y nervios. Este tejido conjuntivo situado entre las células se denomina endomisio¹.

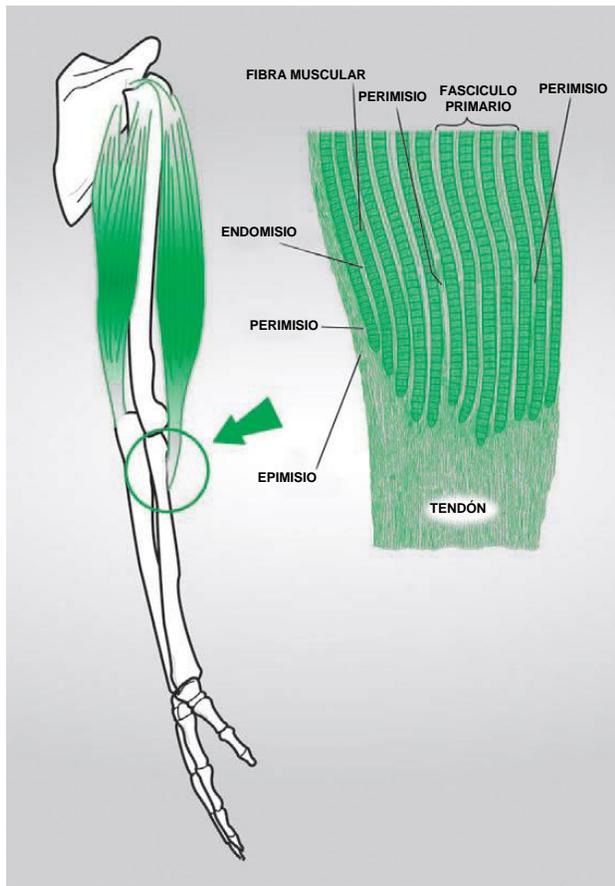


Figura 1.1. Representación gráfica de la estructura compleja de las envolturas del tejido conectivo rodeando a cada uno de los elementos formadores del músculo².

1.2. REPARACIÓN MUSCULAR

El tejido muscular esquelético proporciona la fuerza mecánica requerida para la locomoción de todos los animales vertebrados y debido a esto es propenso al daño por trauma o estrés fisiológico. Para responder a este daño, el músculo esquelético posee una tremenda capacidad de reparación. Sin embargo, los mecanismos de reparación no se describieron sino hasta el descubrimiento de las células satélite por Alexander Mauro, quien las denominó satélite por su localización en la periferia de las fibras esqueléticas maduras entre la lámina basal y el sarcolema³. Estudios ultraestructurales permitieron identificar estas células mononucleadas como nuevas entidades y distinguirlas de entre los múltiples núcleos de las células musculares. La principal característica de las células satélite es que están rodeadas por la misma

lámina basal que rodea a la fibra muscular. Además, su citoplasma es escaso y contiene los organelos comunes de cualquier célula, mientras que su núcleo tiene cromatina más densa en comparación a las células musculares¹.

Las células satélite se consideran mioblastos, es decir, células madre capaces de proliferar y fusionarse con las fibras musculares⁴. La cercana interacción entre las células satélite y las células musculares, que se observa en la Figura 1.2, confiere a las primeras una alta sensibilidad y rápida respuesta a la lesión muscular⁴.

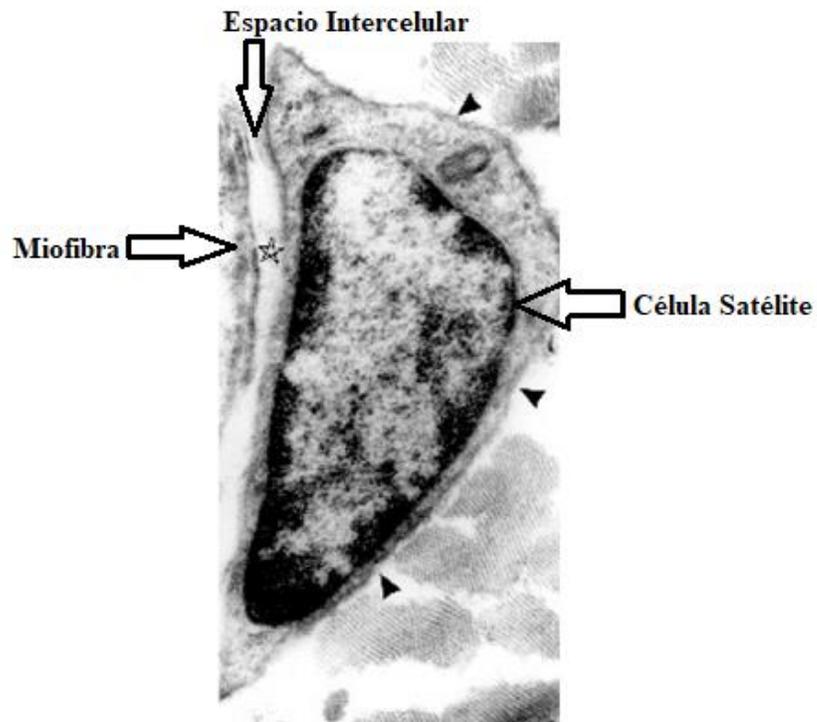


Figura 1.2. Sección transversal que muestra una célula satélite. Su citoplasma queda separado del citoplasma de las células musculares por la membrana plasmática. La estrella representa el espacio intercelular entre dos células musculares¹.

Lepper y colaboradores (2011) informaron que al eliminar las células satélites e inducir un daño a nivel muscular se bloquea completamente la miogénesis regenerativa después de una lesión aguda en el músculo esquelético en animales. Estos datos fueron esenciales para definir el rol de las células satélites en la regeneración muscular inducida por lesión⁵.

1.3. CÉLULAS SATÉLITE

Antes de la identificación de las células satélite, se desconocían los mecanismos por los cuales las miofibras aumentaban su tamaño y contenido en ausencia de cualquier división nuclear observable dentro de la misma⁶. Después se observó que la célula satélite ocupa una posición anatómica idéntica en la mayoría de los vertebrados y adquirió una candidatura inmediata y casi incuestionable como fuente de células miogénicas para el crecimiento y la reparación del músculo esquelético posnatal.

La evidencia de que las células satélites funcionan como precursores miogénicos se basó inicialmente en estudios⁷ que condujeron a la visión comúnmente aceptada de que las células satélites se dividen para proporcionar mionúcleos a las miofibras en crecimiento (Schultz et al., 1978) antes de convertirse a mitóticamente inactivas en el músculo maduro normal⁸.

La prueba de que las células satélites dan lugar directamente a mioblastos se mostró inicialmente con miofibras aisladas^[9,10], posteriormente se desarrollaron estudios en los cuales las miofibras musculares viables se aislaron del músculo mediante digestión enzimática completa con su cohorte de células satélite que aún permanecían debajo de la lámina basal. Las células satélites proliferaron en cultivo y dieron lugar a mioblastos derivados de células satélite que se diferenciaron para producir miotubos multinucleados¹¹.

Para cumplir su función en el mantenimiento muscular (hipertrofia y reparación) las células satélites deben activarse primero desde un estado inactivo para producir

una progenie de mioblastos^[12,13]. Los mioblastos derivados de células satélite se caracterizan generalmente por el mismo conjunto de marcadores que los mioblastos derivados de casi cualquier etapa de desarrollo. Cuando las células satélites se activan, inician rápidamente la expresión de MyoD^[14,15], manteniendo la expresión de Pax-7, M-cadherina, y Myf5. La expresión de miogenina marca el inicio de la diferenciación miogénica^[16,17].

Más recientemente, se injertaron miofibras sanas individuales en los músculos tibiales anteriores (TA) de ratones que sus extremidades fueron irradiadas para eliminar la función propia de las células satélite del animal, y demostraron que las células satélites son autosuficientes como fuente de regeneración muscular y actúa en realidad *in vivo* como una célula madre miogénica, capaz de dar lugar a nuevas miofibras y, sobre todo, a muchas nuevas células satélite¹⁸.

En la sección siguiente se describen los marcadores transcripcionales (transcritos o ARNm) propuestos en este estudio y que reflejan los estados que transcurren entre la célula satélite y sus diferentes etapas de diferenciación miogénica.

1.4. MARCADORES TRANSCRIPCIONALES

En el músculo maduro normal, las células satélites son mitóticamente quiescentes¹⁹ y expresan Pax-7²⁰, M-cadherina²¹ y CD34¹¹ (Figura 1.3). Dentro de estos marcadores característicos Pax-7 es el marcador más útil para identificar células satélites inactivas^[17,20,22,23], se ha observado por ejemplo en ratones Pax-7 -/- evidencia de que no tienen defectos graves en la formación muscular. Sin embargo, en ausencia de Pax-7, los músculos esqueléticos adultos están completamente desprovistos de células satélite^[20,24]. Debe observarse que los marcadores tales como CD34 no son específicos de las células satélite, sino que son marcadores inespecíficos que solo son útiles en las miofibras aisladas porque es más difícil distinguir las células satélites de otras células positivas para CD34 (por ejemplo, células endoteliales) en las secciones musculares.

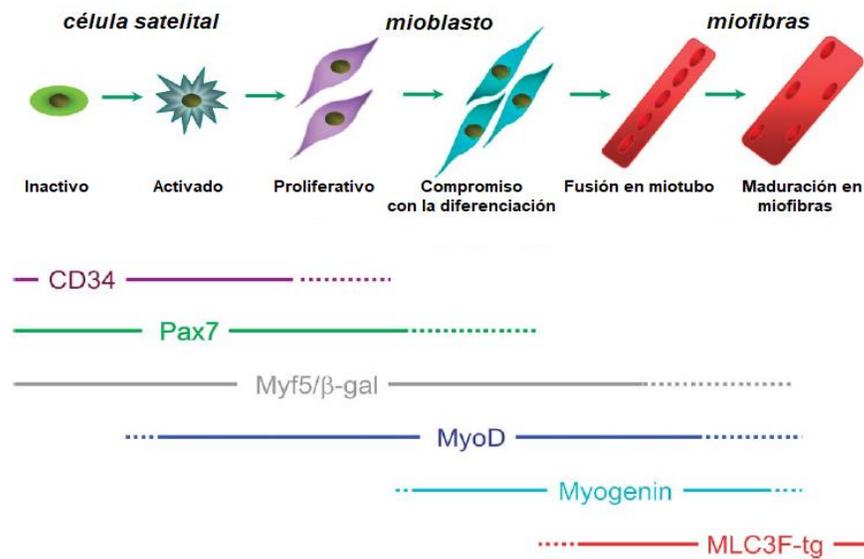


Figura 1.3. Esquema de la miogénesis de células satélite y marcadores típicos de cada etapa. MyoD: Proteína 1 de diferenciación miogénica; MLC3-tg: Cadena ligera de miosina alcalina¹.

1.4.1 PAX-7

La familia del gen Pax define a un grupo evolutivo conservado de factores de transcripción que desempeñan papeles críticos durante la organogénesis y la homeostasis tisular^[25,26].

Pax-7 es uno de los miembros de esta familia que participa en la especificación y mantenimiento de progenitores de músculo esquelético. También, se ha descrito que Pax-7 es un factor crítico para la supervivencia y la autorrenovación de esta población celular^[20,27]. Pax-7 es esencial para regular la diferenciación de las células satélite durante la miogénesis adulta.

Von Maltzahn observó que ratones que portaban mutaciones en Pax-7 fueron perdiendo progresivamente el linaje de células satélite, lo que provocó atrofias musculares graves e incluso muerte. Además, observó que después de las 3 semanas de edad, Pax-7 era completamente imprescindible para la correcta función de las células satélite, tras la eliminación de Pax-7 las células satélites presentaron

una detención en el ciclo celular y una desregulación de los factores reguladores miogénicos, concluyendo que Pax-7 es esencial para regular la diferenciación de las células satélite durante la miogénesis adulta²⁸.

En el músculo adulto, las células satélite inactivas expresan Pax-7, mientras que otros factores transcripcionales como Myf5 y MyoD presentan expresión baja o no detectable^[20,29]. Pax7 persiste a niveles más bajos en las células satélite que proliferan recientemente, desciende en células que están comprometidas con la diferenciación y desaparece una vez diferenciada la célula^[17,30].

1.4.2 DESMINA

La desmina es una proteína de 52 kD que ha sido identificada como la subunidad constitutiva de los filamentos intermedios en los músculos esquelético, cardíaco y liso. Durante la embriogénesis de ratón, la desmina se detecta por primera vez en el embrión a los 8,5 días después del coito. Cuando las células satelitales comienzan su diferenciación, el marcador reconocible más preciso es la síntesis de desmina en la replicación de los mioblastos, esto debido a que en la proliferación de células precursoras miogénicas *in vivo* o mioblastos *in vitro* expresan desmina, pero células satélites no expresan desmina³¹.

Al usar un enfoque genético en ratones, se demostró que la desmina no desempeña un papel esencial durante la miogénesis, ya que los ratones que carecen de desmina desarrollan músculos esqueléticos normales³². Los resultados indican que la desmina no es necesaria para el compromiso, la diferenciación y la fusión miogénica, pero es esencial para mantener la resistencia a la tracción y la integridad de las fibras musculares.

Otras proteínas específicas de músculo, tales como actinas, miosinas y miomasina, aparecen solo en los mioblastos mononucleados posmitóticos³³.

1.4.3. MIOGENINA

La familia MyoD de factores reguladores miogénicos controla la formación del músculo esquelético. En la literatura se ha presentado evidencia de que los miembros de esta familia cuando se sobre expresan en células que no son de músculo, activan el programa miogénico³⁴. Hay cuatro miembros de la familia MyoD y los estudios han demostrado que MyoD, Myf5 y Mrf4 funcionan como factores de determinación miogénicos. El cuarto miembro, miogenina, actúa como un factor de diferenciación, controla la diferenciación de mioblastos en fibras de músculo esquelético en etapas intermedias haciéndolo un marcador útil para este estudio³⁵.

1.4.4. CADENA PESADA DE MIOSINA

La miosina es el componente proteico más abundante expresado en células musculares estriadas, es el elemento responsable de funciones moduladores durante la contracción muscular y sirve como una proteína estructural y reguladora, también participa en la generación del trabajo mecánico y la potencia muscular³⁶. Cada molécula de miosina contiene dos cadenas pesadas (MHC) que forman la cabeza y la cola de la miosina, a estas cadenas se les asocia la actividad ATPasa, las que facilitan la obtención de energía para la contracción, y cuatro cadenas ligeras (MLC) las que permiten la unión de las cadenas pesadas. La miosina es una proteína fibrosa, abundante en el músculo esquelético, representa aproximadamente el 70% de las proteínas musculares³⁷. La cadena pesada de miosina tipo II, es un marcador de miogénesis útil en los estudios de diferenciación de estadio tardío en músculo liso y estriado³⁸.

Para contribuir al conocimiento futuro sobre las células satélite del tejido muscular con miras a su aplicación biotecnológica, el objetivo de esta investigación fue evaluar e intentar establecer protocolos de aislamiento y diferenciación miogénica en otra especie diferente a las comúnmente estudiadas hasta la fecha para células satélite, usando la expresión de transcritos como marcadores de diferenciación la cual es una técnica que no ha sido comúnmente utilizada en los estudios actuales y que puede presentar ventajas como método de seguimiento de las etapas de diferenciación alcanzadas.

2. HIPÓTESIS

Células satélites en cultivo primario *in vitro* obtenidas desde músculo extensor *digitorum longus* de conejo expresan transcritos como marcadores de diferenciación muscular al ser expuestas a un medio miogénico.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Diferenciar células satélite de músculo extensor *digitorum longus* de conejo hacia linaje miogénico.

3.2 ESPECÍFICOS

Optimizar un protocolo para obtener y cultivar células satélites de conejo en cultivo primario.

Evaluar la expresión de marcadores tempranos, intermedios y tardíos de miogénesis en cultivos sometidos a medios miogénicos o de proliferación celular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. BIOPSIA DE MÚSCULO *EXTENSOR DIGITORUM LONGUS*

Los protocolos aplicados a los animales de experimentación fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia (Acta de Aprobación en Anexo A1). El médico veterinario Dr. Patricio Morales contratado por el proyecto FONDECYT que financia esta tesis proveyó los animales y efectuó los procedimientos quirúrgicos.

Las células satélites fueron obtenidas desde biopsias del músculo *extensor Digitorum longus* (EDL) de conejo. Los animales fueron anestesiados usando Ketamina/Xylazina 100/10 mg/Kg 1 mg/Kg de Acepromazina vía inyección intraperitoneal. Previa desinfección con clorhexidina y rasuración del área, se extrajeron los músculos *extensor digitorum longus* (EDL) de ambas piernas en condiciones asépticas para posteriormente aislar las fibras musculares para su cultivo.

4.2. OBTENCIÓN DE FIBRAS MUSCULARES CON CÉLULAS SATÉLITES DESDE BIOPSIA DE MUSCULO EDL

Se separaron fibras musculares desde los músculos EDL de conejo basándose en lo descrito por Pasut en 2013, quien estableció protocolos para aislamiento de fibras musculares de ratón con el objetivo de crear un sistema *in vitro* en el que se conserva la asociación física entre la miofibra y sus células madre³⁹. En este protocolo se establece una etapa inicial de digestión enzimática, para posteriormente extraer manualmente, a través de pipetas Pasteur modificadas, las fibras de manera individual sin generar daño al tejido para obtener células satélites no activadas. En esta tesis, además de reproducir lo propuesto por Pasut (denominado EDL-A), en paralelo se generó una variante de este protocolo que consideró un proceso de digestión y cultivo modificado para obtener fibras con sus células satélites activadas, con el objeto de promover la diferenciación celular (denominado EDL-B) y así poder evaluar de manera paralela tanto las células

satélite inactivas como su posterior diferenciación miogénica. EDL-B además del tratamiento con colagenasa tipo I, contó con una etapa de trituración mecánica, que según Syverud en 2015⁴⁰, promueve la activación de las células satélites, esta se efectuó manualmente utilizando pinzas con las cuales se destruyeron las fibras musculares activando los procesos inflamatorios estimulando a las células satélite para promover su diferenciación.

En cuanto a la fase de digestión enzimática, ambos procedimientos utilizados abarcaron un tratamiento por un periodo de tiempo con colagenasa tipo I en una concentración de 2 mg/mL. Los tiempos de digestión fueron ajustados debido a la diferencia de tamaño del músculo EDL de conejo versus al de ratón para que estas no fueran dañadas debido al tratamiento enzimático³⁹, especialmente para el protocolo EDL-A, el cual requiere que las miofibras se encuentren lo más intactas posible. Los tiempos de digestión evaluados fueron de 105, 120, 135 y 150 min (Figura 1.4), posteriormente las fibras musculares fueron separadas con ayuda de pipetas pasteur recubiertas en suero de caballo para evitar que las fibras se adhieran a las paredes de vidrio y luego sembrados en sus respectivos medios de cultivo en Placas de Petri de 35 mm recubiertas con Matrigel^{®41} que es una mezcla de proteínas extraídas del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumor rico en proteínas de matriz extracelular, que mimetiza el complejo ambiente extracelular en el que se encuentran los tejidos *in vivo*⁴² y es efectiva para la sujeción y diferenciación de diferentes tipos celulares. El recubrimiento con Matrigel[®] para cada placa fue elaborado el día previo a la aislación de las fibras en una relación Matrigel/DMEM 1:10, trabajando las soluciones y las placas en hielo, para evitar su solidificación prematura. Luego, durante la incubación de 24h. a 37°C, las proteínas que componen Matrigel[®] solidifican uniformemente en la placa para producir un gel que recubre la superficie para transferir posteriormente las fibras aisladas (el protocolo detallado se describe en Anexo A2 Recubrimiento de placas con Matrigel[®]). La figura 4.1 es una representación esquemática del procedimiento efectuado para EDL-A y EDL-B desde el procesamiento de la biopsia hasta el inicio del cultivo celular.

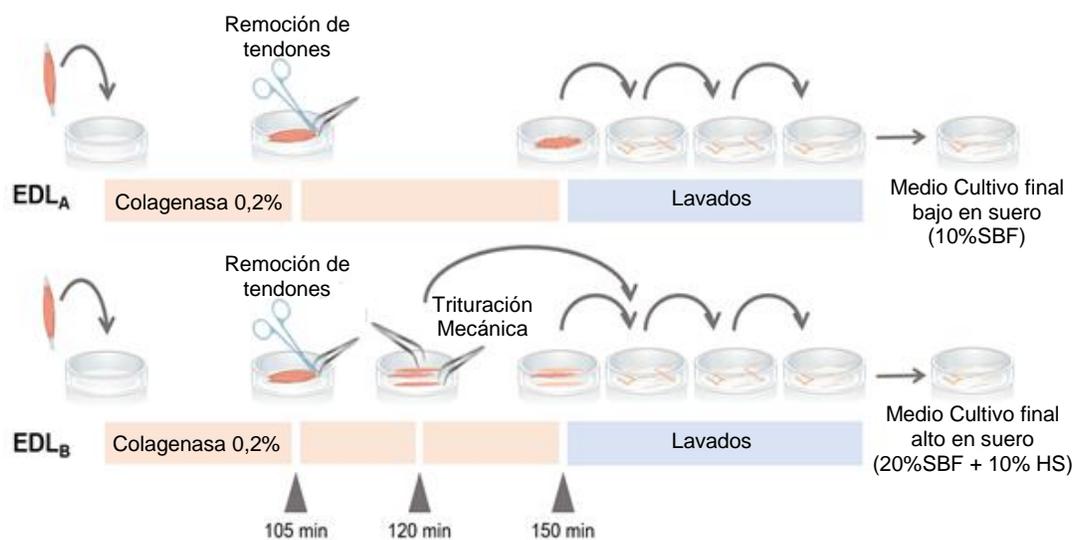


Figura 4.1. Esquema de procesamiento de biopsias y condiciones de cultivo aplicados.

Las fibras aisladas fueron transferidas a las placas con Matrigel® obteniendo dos cultivos primarios (EDL-A y EDL-B) preparados en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM®, Thermo Fisher Scientific Inc.®, Massachusetts, USA) el cual contiene glucosa; piruvato de sodio; L-glutamina y rojo fenol como indicador, además fue suplementado con Glutamax® (Invitrogen®, California, USA), penicilina (Invitrogen®, California, USA), estreptomycin (Invitrogen®, California, USA), anfotericina B (Invitrogen®, California, USA), suero bovino fetal (Biological Industries®, Israel) y suero de caballo (Invitrogen®, California, USA) sólo para el cultivo EDL-B. La composición de los medios de cultivo para EDL-A y EDL-B se presentan en la Tabla 4.1. La composición de los medios de cultivo se centró en las investigaciones de Anderson (2012) quien demostró que diferentes concentraciones de suero tienen un efecto sobre la transición de la inactividad a la activación de las células satélite. Sus observaciones señalan que para preservar el estado de inactividad de las células satélite asociadas a cada fibra, estas deben mantenerse en medio de cultivo bajo en suero, ya que, en un medio rico en suero, las células satelitales se activan, proliferan, migran y se diferencian rápidamente, simulando así el proceso regenerativo *in vivo*⁴³. Ambos cultivos fueron incubados

posteriormente por triplicado bajo ambiente humidificado, 5% CO₂ y 37°C en un incubador Forma[®] serie II (Thermo Fisher Scientific Inc. [®], Massachusetts, USA).

Tabla 4.1. Suplementación de los medios de cultivo utilizados.

Componentes	Cultivo EDL-A	Cultivo EDL B
Glutamax[®] (mM)	200	200
Penicilina (UI/mL)	10.000	10.000
Estreptomicina (µg/mL)	10.000	10.000
Anfotericina B (µg/mL)	10.000	10.000
Suero bovino fetal (%)	10	20
Suero de caballo (%)	---	10

4.3. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS SATELITE Y CÉLULAS MUSCULARES

Se realizó mediante la determinación de la expresión relativa de transcritos para genes de Pax-7 para células satélite y de marcadores de las etapas de la diferenciación miogénica, temprana (desmina), mediana (miogenina) y tardía (cadena pesada de miosina) para las células diferenciadas. Además, se evaluó la expresión del gen constitutivo GAPDH para posteriormente establecer la expresión relativa de los marcadores antes mencionados.

4.4. EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción del ARN se desarrolló en un gabinete de Bioseguridad clase II (ESCO, Singapur) para proteger el ARN de ARNsas y contaminación por otros ácidos nucleicos ambientales. En primera instancia las células se recolectaron mecánicamente utilizando un raspador celular para despegarlas de la superficie de Matrigel[®] (Corning, Tewksbury, USA), luego las células fueron centrifugadas a 1500 rpm por cinco minutos para posteriormente aplicar el método de Trizol[®]. Para esto

se agregó 0,5 mL reactivo Trizol[®] a cada pellet proveniente de cultivo miogénico, luego se homogenizó con micropipeta de 1 mL. A continuación se agregó 0,1 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 s. Se centrifugó a 8500 rpm por 15 min en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5810 R. Luego se separó la fase acuosa donde se encontraba el ARN. Esta última se lavó con 0,25 mL de alcohol isopropílico puro, luego se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó por otros 15 min a 8500 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 0,5 mL de etanol al 75%, para después ser centrifugado por 10 min a 7500 rpm. El excedente se descartó y el pellet que contenía el ARN se secó a temperatura ambiente. A continuación, se resuspendió el pellet en agua libre de ácidos nucleicos y se incubó por 10 min a 55 °C. Sobre la solución anterior se determinó pureza y rendimiento por lectura espectrofotométrica en Nanodrop[®] utilizando el software NanoDrop 3.0.1 (Coleman Technologies[®], Pensilvania, USA), por lectura a 280, 230 y 260. Se consideró una relación 260/280 cercana a 2.0 y de 260/230 cercana a 1.8 como valores aceptables de pureza para el ARN recuperado y como rendimiento se aceptó una concentración igual o superior a 250 ng/μl, la cual es apropiada para el proceso de retrotranscripción. El ARN recuperado se almacenó a -80°C hasta su uso.

4.4.1. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

A partir de los datos espectrofotométricos, se determinó el volumen necesario para retrotranscribir 1 μg de ARN mediante el sistema Improm II, según las instrucciones del fabricante Invitrogen[®], (California, USA). Para ello, a 1 μg de ARN disuelto en agua libre de nucleasas se le agregó 0,5 μg de oligo dT y la cantidad suficiente de agua libre de nucleasas para completar 5 μL. Luego se incubó a 70 °C por 5 min en un Termociclador PXE 0.2[®] (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA) y luego incubó nuevamente sobre hielo por 5 min.

A continuación, se preparó una mezcla con 4 μL de buffer de Improm II, 0,5 μL ARN, 1 μL dNTP, 1 μL enzima Improm II, 2,4 μL MgCl₂ y la cantidad suficiente de agua

para obtener 15 μ L como volumen final. Luego se adicionó esta mezcla al tubo que contiene el ARN, obteniéndose un volumen final de 20 μ L en cada tubo. Se incubó nuevamente en Termociclador PXE 0.2[®] siguiendo el siguiente esquema: 42 °C durante 50 min, 70 °C por 5 min y 4 °C por 5 min. El cADN resultante se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.4.2. REACCION DE POLIMERASA EN CADENA EN TIEMPO REAL

4.4.2.1 PARTIDORES

Los partidores específicos para cada gen se diseñaron usando el programa AmplifX[®] 1.7 utilizando la secuencia de ARN publicada en base de datos PubMed (Anexo A3. secuencias de ARN para los marcadores miogénicos).

Las secuencias, temperaturas de fusión y tamaños teóricos de cada amplicón se observan en la Tabla 4.2. La síntesis de los partidores se encargó a Integrated DNA Technologies[®] (Illinois, USA), los partidores se resuspendieron a una concentración 100 mM en agua libre de ADNasas.

Tabla 4.2. Tabla de Partidores

PARTIDOR	T° FUSION (°C)	TAMAÑO DE AMPLICON (pb)	SECUENCIA (5' – 3')
GAPDH S	59	296	CAAATCAAGTGGGGCGATGC
GAPDH AS	59	296	TGTGGTCATGAGTCCTTCCACG
PAX-7 S	59	206	AGAAGGTGGCATTCCAACGCTA
PAX-7 AS	59	206	TGCCTTCCAAAATCCCTGTTGGAC
DESMINA S	59	241	AAGCCCAACTTCAGGAACAGCA
DESMINA AS	59	241	ATCCTGACCTAGACCACAGCCATAAG
MIOGENINA S	59	287	AAGAAAGTGAACGAGGCCTTCGAG
MIOGENINA AS	59	287	CGTTCGTATACCAGAGGCCCAA
C.P MIOSINA S	59	221	CAACCCAGCAAACCCTACTTAGCA
C.P MIOSINA AS	59	221	CTGGCCAAGTACACCGACATAGAA

Sentido (S), Antisentido (AS), C.P Miosina: Cadena Pesada de Miosina °C: Grados Celsius, pb: Pares de Bases, secuencias respectivas descritas en sentido de 5' a 3'.

4.4.2.2 AMPLIFICACIÓN

Se preparó una mezcla con 5 μL de agua libre de nucleasas, 1 μL de MgCl_2 , 1 μL de sonda marcada con fluorocromo, enzima Taq polimerasa, dNTP, 0,5 μL de partidores sentido, 0,5 μL de partidores antisentido específicos para cada gen a amplificar. La mezcla se homogenizó y se agregó 8 μL de la misma a cada una de las muestras. Estas se trasvasijaron a capilares de 20 μL (Roche®, Penzberg, Alemania) los cuales fueron centrifugados brevemente para asegurar que el volumen se encuentre dentro del capilar, posteriormente fueron colocados en el termociclador LightCycler 1,5 (Roche®, Penzberg, Alemania). Se amplificó el gen constitutivo GAPDH y los genes en estudio Pax-7, desmina, miogenina y cadena pesada de miosina.

4.4.2.3 ESPECIFICIDAD DE LA AMPLIFICACIÓN

Se realizó un análisis de denaturación (Curva de Melting) para cada amplicón con el fin de demostrar la especificidad de la amplificación. Esto se realizó un ciclo después de la amplificación y consistió en aumentar la temperatura a 95 °C a 20 °C/s para conseguir la denaturación total de la doble hebra de ADN amplificada, luego se bajó la temperatura hasta 65 °C a una velocidad de 20 °C/s para promover la renaturación y finalmente se elevó la temperatura hasta 95 °C a una velocidad de 0,1 °C/s, registrando la pérdida de fluorescencia cada 0,1 °C. La existencia de una temperatura única de denaturación indica un solo producto de amplificación.

Por otra parte, para cada amplicón se comprobó electroforéticamente su tamaño para corroborar que correspondieran al teórico descrito en la tabla 4.2. Para ello, se prepararon geles de agarosa al 2% en el cual se cargaron las muestras y un estándar de tamaño molecular de 100 pb (GeneRuler® DNA Ladder 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: Fermentas LifeSciences. Hanover, MD, USA) y se procedió a efectuar la electroforesis aplicando un voltaje de 70 V de manera constante. Luego, los geles fueron teñidos con SafeView® (Applied Biological Materials Inc., Richmond, Canada). Finalmente se registró fotográficamente el gel mediante un sistema de documentación.

4.4.2.4 DETERMINACIÓN DE EXPRESIÓN RELATIVA

Uno de los principales componentes para evaluar la expresión relativa de un gen versus un gen constitutivo es la determinación de su eficiencia el cual está ligado a la cantidad total de ADN producido tras cada ciclo de amplificación. En teoría la cantidad de material total generado se expresa como 2^X , donde X es el número de ciclos al que fue sometida la muestra. Esto siempre asumiendo que los partidores son capaces de unirse de principio a fin al 100% del ADN disponible, capacidad que no siempre es del todo real y que es necesaria determinar para lograr una correcta comparación entre partidores de distintos genes. Para establecer la eficiencia de una pareja de partidores (sentido y antisentido) debe realizarse una curva de eficiencia, que corresponde a una curva concentración/respuesta. Esta curva es realizada a partir del material ya amplificado utilizando los partidores en cuestión, a los cuales se les determina su concentración mediante métodos espectroscópicos para después realizar diluciones seriadas de concentraciones conocidas y exponerlas al proceso de amplificación para determinar su respuesta. La respuesta corresponde al ciclo umbral de cada amplificación (Ct, cycle threshold). Los gráficos de curvas de eficiencia relacionan los Ct versus el logaritmo de la concentración, el cual exhibe una relación lineal de pendiente negativa cuyo valor se utiliza para establecer la eficiencia de los pares de partidores mediante la ecuación (1)⁴⁴.

$$(1) E = 10^{\left(-\frac{1}{pendiente}\right)}$$

Ecuación de ecuación de cálculo de eficacia.

Para la determinación de la eficiencia de los partidores, se utilizó ADN amplificado en el laboratorio para cada uno de los genes en estudio. Se precipitaron los amplicones mencionados con una solución de acetato de amonio 10 M (Merck, Darmstadt, Alemania) y etanol absoluto a 4 °C. Tras centrifugar y resuspender el precipitado en 8 µl de agua libre de nucleasas, se determinó la concentración por lectura espectrofotométrica en Nanodrop® utilizando el software NanoDrop 3.0.1 (Coleman Technologies®, Pensilvania, USA), posteriormente se creó una escalera de concentraciones 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 ng/µL para realizar nuevamente un PCR en tiempo real en el cual se estima C_t para cada punto de la curva, se obtuvo una ecuación de la recta y con esta se determinó la eficiencia de cada partidador. Para establecer la expresión relativa utilizando la ecuación de Pfaffl (2)⁴⁵, se necesita de condiciones controles, las cuales no se logran obtener debido a que a tiempo cero no hay cantidad de material genético suficiente para realizar un q-PCR a tiempo 0 y establecer los valores control, debido a que para esta situación no es posible realizar esta condición control a tiempo 0, se realizó una adaptación de la ecuación de Pfaffl (3), la cual solo considera la condición experimental, de esta manera nos permite establecer la expresión relativa sin parámetros iniciales, al realizar esto no se puede evaluar los cambios de expresión de estos marcadores en el tiempo, pero nos permiten caracterizar en el momento si estos marcadores están presentes y en qué proporción se encuentran versus GAPDH.

$$(2) E. Relativa (Pfaffl) = \frac{Ef_{gen\ objetivo}^{(Ct\ cond.\ control - Ct\ cond.\ experimental)}}{Ef_{gen\ referencial}^{(Ct\ cond.\ control - Ct\ cond.\ experimental)}}$$

$$(3) E. Relativa (Pfaffl\ modificado) = \frac{Ef_{gen\ objetivo}^{(Ct\ cond.\ experimental)}}{Ef_{gen\ referencial}^{(Ct\ cond.\ experimental)}}$$

Esquema de las ecuaciones utilizadas. (2) ecuación del método Pfaffl, (3) ecuación del método Pfaffl modificado para cálculo de expresión relativa.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

No se aplicó análisis estadístico de los resultados por tratarse de un estudio piloto. Se implementaron las técnicas necesarias y no hubo suficientes experimentos independientes para aplicar análisis estadísticos apropiados. Todos los cultivos se obtuvieron de un mismo conejo, motivo por el cual los triplicados son pseudoréplicas.

5. RESULTADOS

En el siguiente apartado se presentan los resultados organizados según su contribución al cumplimiento de los objetivos específicos:

5.1. OPTIMIZAR UN PROTOCOLO PARA OBTENER Y CULTIVAR CÉLULAS SATÉLITES DE CONEJO EN CULTIVO PRIMARIO

5.1.1 TIEMPO DE DIGESTIÓN

Los tiempos de digestión con colagenasa evaluados fueron: 105, 120, 135 y 150 min. Se determinó que 105, 120 y 135 min fueron insuficientes para lograr una correcta separación de las fibras musculares. Finalmente, a los 150 min se comenzaron a separar las fibras, por lo que se estableció este como el definitivo.

5.1.2 EVOLUCIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES

Para el cultivo EDL-A como para cultivo EDL-B, se realizó seguimiento por microscopía óptica y se capturaron imágenes para realizar un seguimiento del desarrollo celular y su diferenciación. Las figuras 5.1 y 5.2 muestran la recopilación de imágenes que permiten visualizar el crecimiento como también el proceso de diferenciación celular. En general, se observa que en un comienzo apenas son visibles un pequeño número de células las cuales poseen una forma más bien circular, EDL-A al día 16 vio su crecimiento aumentado levemente en el número de células y su morfología pasa de circular a tener forma de huso. EDL-B por su parte fue el cultivo que generó la mayor velocidad de crecimiento presentando al día 11 cambios significativos y visibles en cada uno de los cultivos, cuyas células presentan predominantemente una morfología en forma de huso.

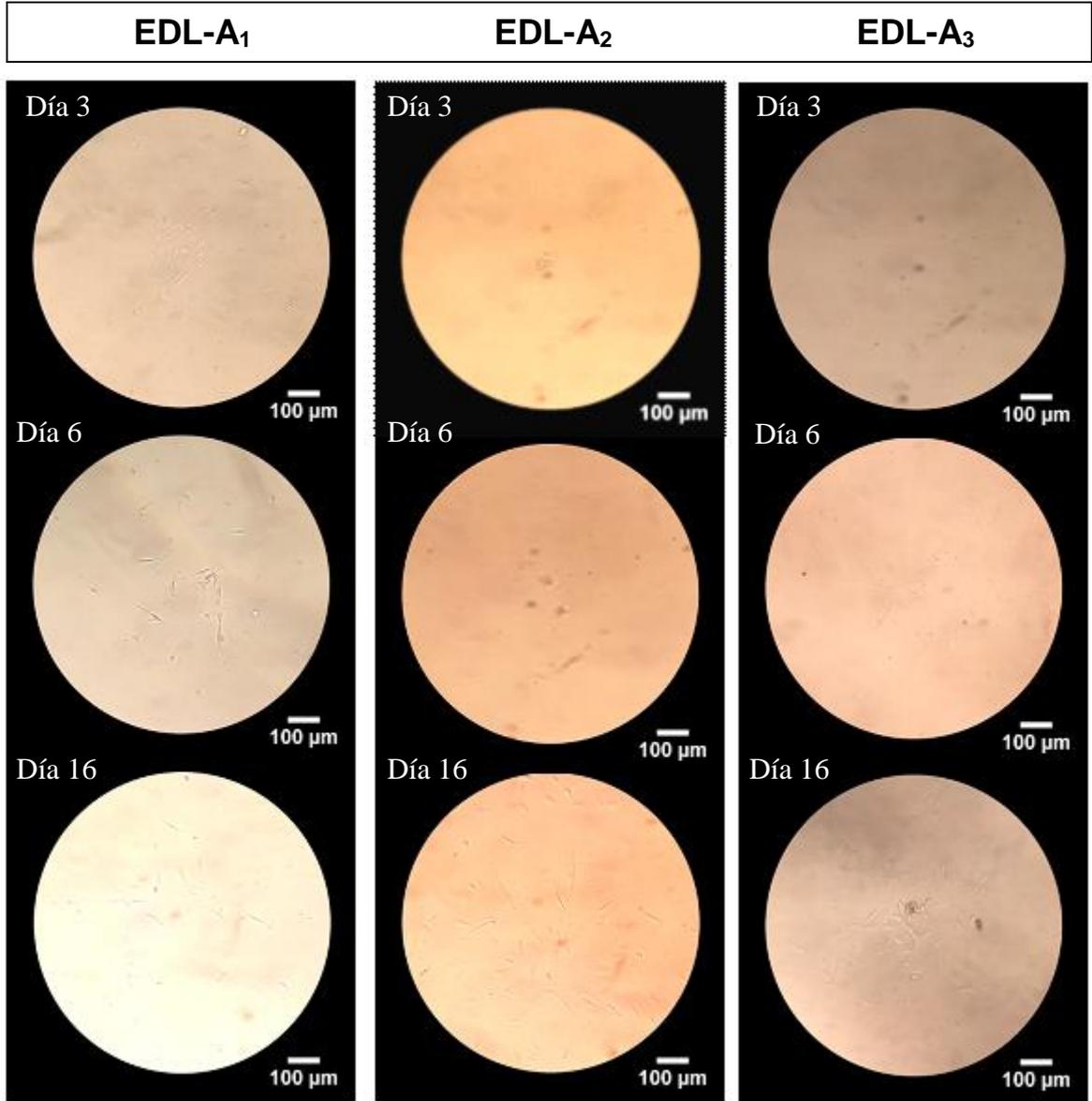


Figura 5.1. Fotografías de los cultivos EDL-A en triplicado (A1, A2, A3) a los días 3, 6 y 16 de haber sido sembrados en DMEM, 4,5 g/L glucosa; piruvato de sodio; L-glutamina, enriquecido con Suero Bovino Fetal 10 %, antibiótico más antifúngico al 1 %, glutamina al 1 %. Imágenes con aumento tomada a través de microscopio con lente 10X. La amplificación de barra representa 100 μm

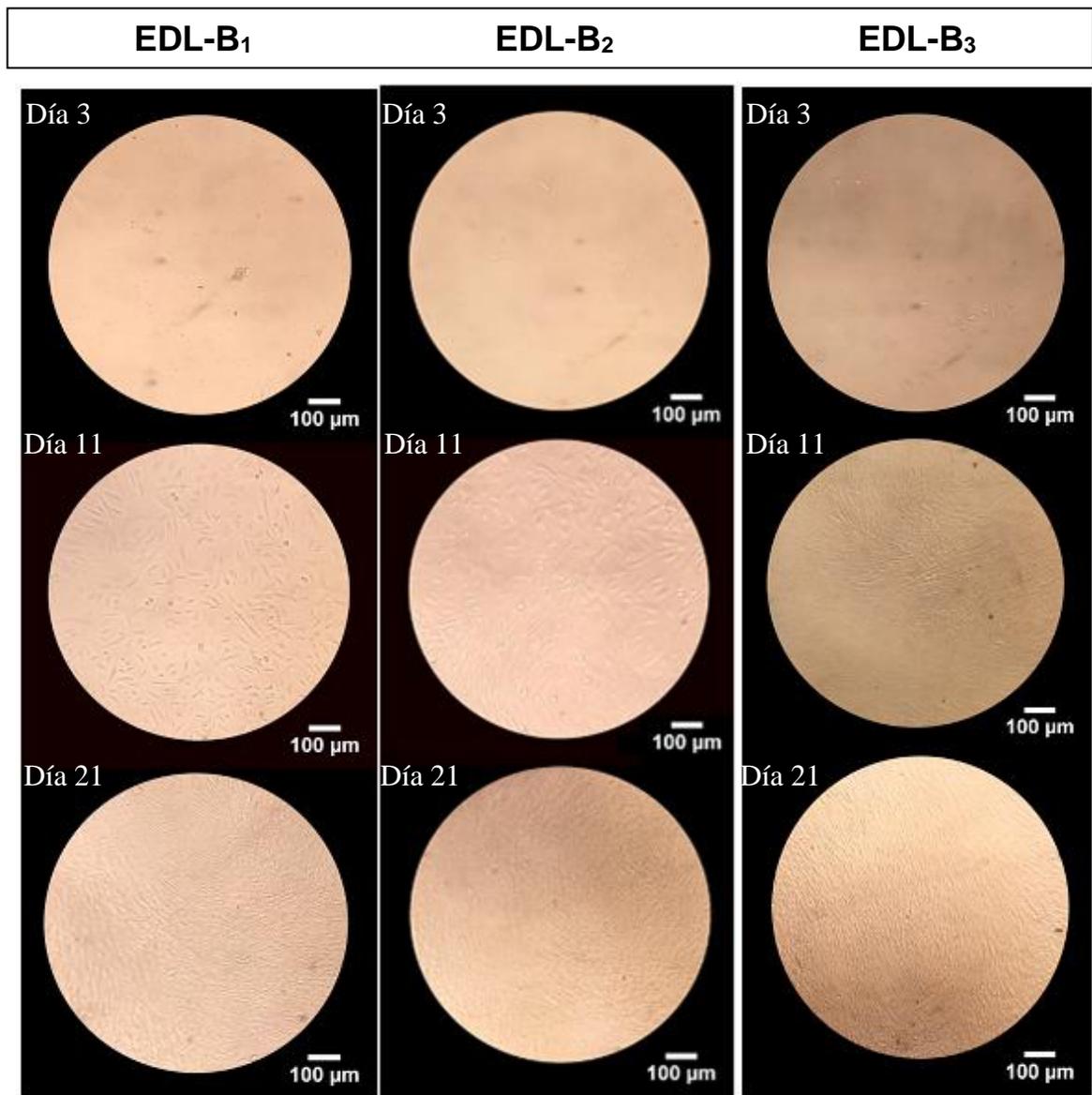


Figura 5.2. Fotografías de los cultivos EDL-B en triplicado (B1, B2, B3) a los días 3, 11 y 21 de haber sido sembrados en DMEM, 4,5 g/L glucosa; piruvato de sodio; L-glutamina, enriquecido con Suero Bovino Fetal 20 %, Suero de Caballo 10%, antibiótico más antifúngico al 1 %, glutamina al 1 %. Imágenes con aumento tomada a través de microscopio con lente 10X. La amplificación de barra representa 100 μm

5.2. EVALUAR LA EXPRESIÓN DE MARCADORES TEMPRANOS, INTERMEDIOS Y TARDÍOS DE MIOGÉNESIS EN CULTIVOS SOMETIDOS A MEDIOS MIOGÉNICOS O DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

5.2.1. EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN presentó rendimientos bajos pero suficientes para realizar una retrotranscripción adecuada. La tabla 5.1 resume las relaciones de absorbancias que reflejan pureza respecto a proteínas (260/280), a moléculas orgánicas y/o polisacáridos (260/230) y el rendimiento expresado como concentración de ARN. Ambas muestras presentaron una pureza apropiada respecto a proteínas, pero EDL-B presentó una relación 260/230 inferior al ideal. Sin embargo, es la pureza respecto a proteínas la más determinante para una posterior PCR satisfactoria. Así, ARN proveniente de EDL-A y EDL-B fueron utilizados para la retrotranscripción.

Tabla 5.1. Características de ARN extraído desde EDL-A y EDL-B.

	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230	Concentración ng/ μ L
<i>EDL-A</i>	1,93	1,54	566,3
<i>EDL-B</i>	1,85	0,83	382,0

5.2.2. Q-PCR

5.2.2.1 AMPLIFICACION DEL GEN CONSTITUTIVO

Se comprobó la amplificación del gen constitutivo GAPDH para cultivos A y B. Los Ct fueron para EDL-A de 14,54 y para EDL-B de 21,55 (Figura 5.3A). La temperatura de fusión del amplicón fue para EDL-A de 89,66 °C y para EDL-B de 89,47 °C (Figura 5.3B) y el tamaño del amplicón según su movilidad electroforética fue de aproximadamente 200 pb (Figura 5.6). La amplificación del gen constitutivo GAPDH permitió confirmar que la calidad del ARN aislado fue suficiente para el proceso de análisis de los genes de estudio.

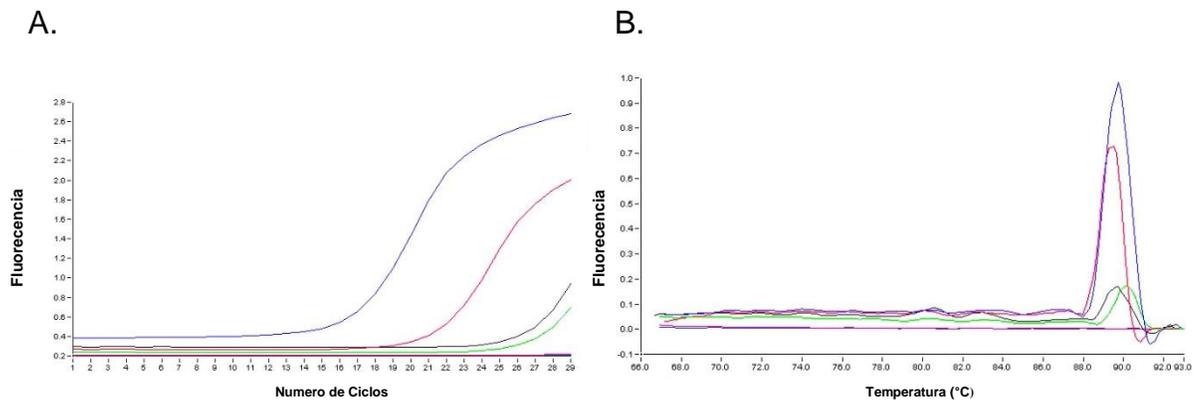


Figura 5.3. Amplificación del gen de referencia GAPDH en cultivos EDL-A y EDL-B. A) Curva de amplificación. El Ct para EDL-A fue de 14,54 y para EDL-B de 21,55. B) Curva de melting. La temperatura de fusión es para EDL-A de 89,66 °C y para EDL-B de 89,47 °C. La línea azul corresponde a EDL-A positivo, la línea verde a EDL-A negativo, la línea roja corresponde a EDL-B positivo y la línea negra corresponde EDL-B negativo

-Curva de amplificación (A) y de melting (B) para el transcrito del gen constitutivo GAPDH en cultivos EDL-A y EDL-B. La línea azul corresponde a EDL-A positivo, la línea verde a EDL-A negativo, la línea roja corresponde a EDL-B positivo, la línea negra corresponde EDL-B negativo. Los Ct son para EDL-A de 14,54 y para EDL-B de 21,55. La temperatura de fusión es para EDL-A de 89,66 °C y para EDL-B de 89,47 °C.

5.2.2.2 AMPLIFICACION DE MARCADORES TRANSCRIPCIONALES

Se comprobó la amplificación del gen Pax-7. En la Figura 5.4 se presentan las curvas de amplificación y sus controles negativos, así como las curvas de fusión de los amplicones. Los Ct fueron para EDL-A de 30,95 y para EDL-B de 42,43. La temperatura de fusión del amplicón fue para EDL-A de 82,07 °C y para EDL-B de 88,23 °C y el tamaño del amplicón según su movilidad electroforética demostró la presencia de dos amplicones de aproximadamente 200 y 300pb (Fig.5.6).

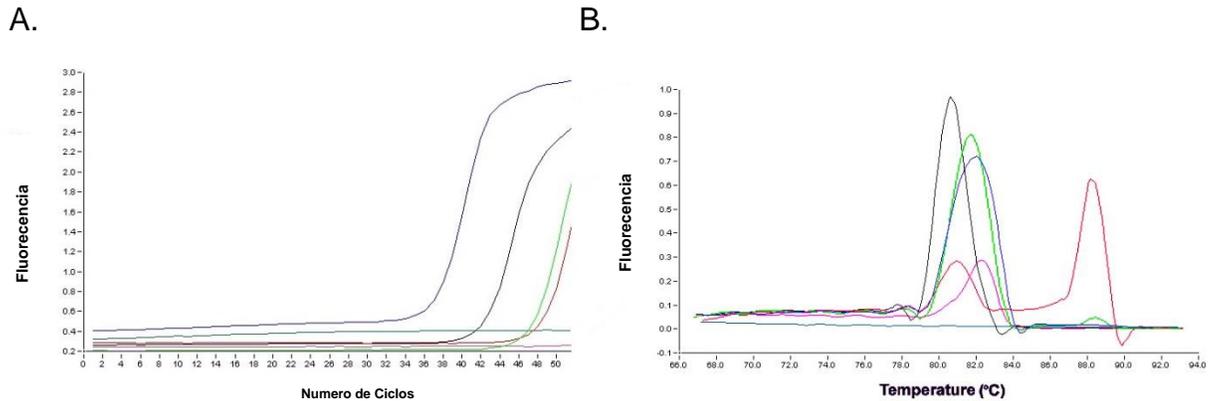


Figura 5.4. Amplificación del gen transcrito Pax-7 en cultivos EDL-A y EDL-B. A) Curva de amplificación. El Ct para EDL-A fue de 30,95 y para EDL-B de 42,43. B) Curva de melting. La temperatura de fusión es para EDL-A de 82,03 °C y para EDL-B de 88,23 °C. La línea azul corresponde a EDL-A positivo, la línea verde a EDL-A negativo, la línea negra corresponde a EDL-B positivo y la línea roja corresponde EDL-B negativo.

-Curva de amplificación (A) y de melting (B) para el transcrito Pax-7 en cultivos EDL-A y EDL-B. La línea azul corresponde a EDL-A positivo, la línea verde a EDL-A negativo, la línea negra corresponde a EDL-B positivo, la línea roja corresponde EDL-B negativo. Los Ct son para EDL-A de 30,95 y para EDL-B de 42,43. La temperatura de fusión es para EDL-A de 82,03 °C y para EDL-B de 88,23 °C.

Se comprobó la amplificación del gen desmina solo para EDL-B (Figura 5.5). El valor de Ct fue de 43,63. La temperatura de fusión del amplicón para EDL-B de 84,70 °C y el tamaño del amplicón según su movilidad electroforética fue de aproximadamente 300 pb (Figura 5.5).

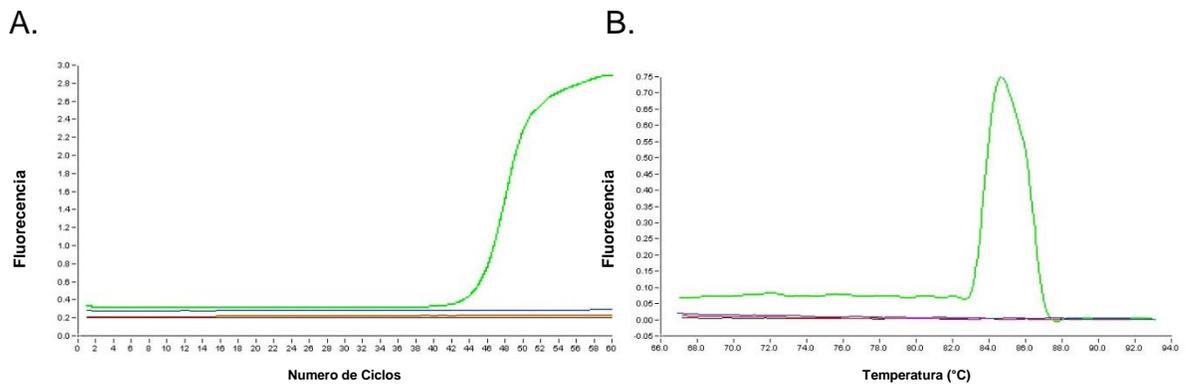


Figura 5.5. Amplificación del transcrito Desmina en cultivo EDL-B. A) Curva de amplificación. El Ct fue de 43,63. B) Curva de melting. La temperatura de fusión fue de 84,70 °C. La línea verde corresponde a EDL-B positivo y la línea negra corresponde EDL-B negativo. [EL RESTO SON LAS LINEAS DE EDL-A?]

-Curva de amplificación (A) y de melting (B) para el transcrito de diferenciación temprana desmina en cultivo EDL-B. La línea verde corresponde a EDL-B positivo, la línea negra corresponde a EDL-B negativo. El valor de Ct son para EDL-B de 43,63. La temperatura de fusión para EDL-B es de 84,70 °C.

Para complementar la información obtenida de las curvas de fusión, se evaluó el tamaño de los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se efectuó para desmina, Pax-7 y GAPDH. En el caso de Pax-7 este generó dos amplicones (carriles 3 y 4), siendo el de aproximadamente 200 pb el que concuerda con el teórico (Figura 5.6).

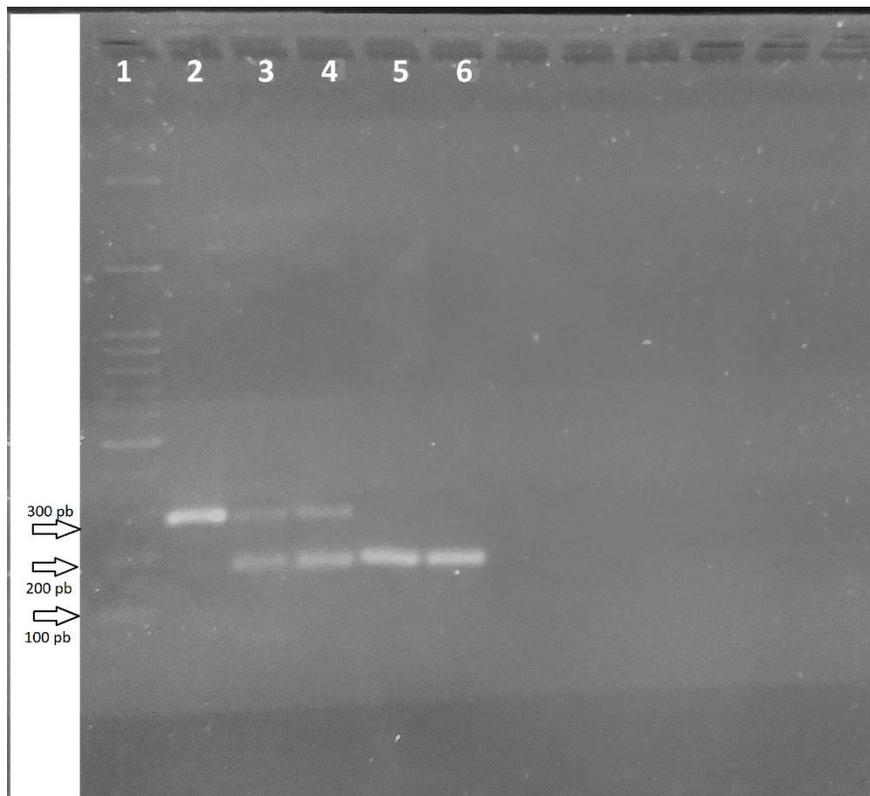


Figura 5.6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para amplicones obtenidos por q-PCR. En el carril 1 marcador de tamaño de ADN de 100 pb; en el carril, 2 amplicón para desmina; en los carriles 3 y 4 amplicones de Pax-7 y en los carriles 5 y 6 amplicones para GAPDH.

Además de los transcritos reportados anteriormente, se estudiaron los transcritos correspondientes a miogenina y cadena pesada de actina. Estos no mostraron una señal por sobre los controles negativos, por lo que se reportan con expresión bajo el límite de detección para los cultivos EDL-A y EDL-B.

5.2.3. EXPRESIÓN RELATIVA DE PAX-7 Y DESMINA

Para el cálculo de la expresión relativa se requiere determinar la eficiencia de cada una de las reacciones de amplificación. Los resultados de las curvas de eficiencia para los 3 genes amplificados se presentan en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Parámetros obtenidos en las curvas de eficiencia de GAPDH, Desmina y Pax-7.

Criterio / Gen	GAPDH	DESMINA	PAX-7
Coeficiente de correlación (r^2)	0,9996	0,995	0,994
Pendiente	-3,3169	-3,5525	-3,7704
Eficiencia	1,0021	0,9120	0,8417

El cálculo de la expresión relativa de desmina y Pax-7, por medio de una adaptación del método de Pfaffl, generó los resultados que se presentan en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Expresión relativa de Pax-7 y Desmina.

Transcrito	Expresión relativa EDL-A	Expresión relativa EDL-B
Desmina	--	$1,72 \times 10^{-2}$
Pax-7	$4,68 \times 10^{-3}$	$6,47 \times 10^{-4}$

6. DISCUSIÓN

En esta tesis se consiguió adecuar a conejos un protocolo para cultivar precursores miogénicos descrito en la literatura para ratón. El interés en adaptar dicho protocolo a esta nueva especie es para establecer las bases para un futuro proyecto en el área de la ingeniería de alimentos. Específicamente, el objetivo es poder aislar y cultivar precursores de célula muscular de conejo para la potencial generación de carne *in vitro*. De este modo, utilizar células de conejo, un animal comestible en la cultura occidental, acerca a este objetivo de forma más plausible y aceptable en comparación a las células de roedores y otras especies reportadas en los protocolos, que podrían generar algún tipo de rechazo de la población.

Con respecto a los desafíos técnicos en esta adaptación, se encontró que la etapa inicial de digestión enzimática fue un parámetro crítico. Los primeros tiempos 105, 120 y 135 min no resultaron suficientes para lograr una correcta aislación de las fibras musculares. Estos resultados se pueden atribuir a que el músculo EDL es más grande en conejos con más material fibroso que recubre la capa más externa (epimisio) que en otras especies descritas en protocolos de aislamiento de células satélite, como ratón o conejillos de India⁴⁶. Por lo tanto, los tiempos utilizados para tratar las biopsias en estos animales más pequeños, no permitieron la separación de cada fibra del EDL de conejo manera individual, sin embargo, a los 150 min, se comenzaron a separar las fibras y por lo tanto, se definió como el tiempo establecido para el protocolo propuesto. Tiempos más prolongados de digestión pueden ocasionar daños en las fibras, obteniéndose una sobre digestión enzimática³⁹. Tiempos mayores de digestión fueron evitados para no correr riesgos de daños en las fibras por sobre digestión, lo cual generaría fibras hipercontraídas, que son fibras muertas, no útiles para el ensayo, las cuales estimulan la diferenciación de células satélite ya que liberan factores proinflamatorios, lo que no permite la correcta obtención de células satélite³⁹.

En cuanto a la evolución de los cultivos celulares, la demora en crecimiento para EDL-A (Figura 5.1) y el acelerado crecimiento y diferenciación de EDL-B (Figura 5.2) concuerdan con lo reportado tanto en los estudios de Pasut en 2013³⁹ como los de Syverud en 2014⁴⁰. El procedimiento de EDL-A, basado en lo establecido por Pasut, hace énfasis en la necesidad de extraer la fibra muscular lo más intacta posible para prevenir la activación y diferenciación de las células satélite, hace que la tasa de crecimiento sea mucho más baja, además de considerar el uso de un medio bajo en suero para mantenerlas inactivas³⁹. Por otro lado, se desarrollaron las variaciones para los cultivos EDL-B según lo propuesto por Syverud en 2014. En este procedimiento se considera que el daño producido a la fibra durante la separación mecánica del músculo, junto con el uso de medio concentrado en suero de caballo y suero bovino fetal, inducen la activación y al aumento de la división de las células satélite, en una respuesta de regeneración muscular donde están involucradas las células satélite⁴⁰. Estas respuestas celulares se vieron reflejadas en la velocidad en que cada cultivo se fue desarrollando.

La extracción de ARN presentó rendimientos bajos en pureza respecto a moléculas orgánicas y/o polisacáridos (260/230) [REF]. Esta baja pureza (Tabla 5.1) puede deberse al uso de Matrigel® en las placas de cultivo. Este material se utiliza para promover la adherencia de las células a la placa y prevenir la pérdida de éstas durante los cambios de medio. Matrigel® se asemeja al complejo ambiente extracelular que se encuentra en muchos tejidos y es utilizado como sustrato para el cultivo de células. Sin embargo, al momento de recuperar las células desde la placa para el aislamiento del ARN no es posible remover completamente el Matrigel® en el proceso de extracción con Trizol®. Matrigel® es un agente compuesto principalmente por laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicano de heparan sulfato⁴², este último es un polisacárido que compone generalmente la matriz extracelular y por lo tanto interfiere con los valores de pureza finales. Ambos cultivos EDL-A y EDL-B presentaron una pureza apropiada respecto a proteínas, siendo este valor el más determinante para una posterior PCR satisfactoria.

En relación con el proceso de q-PCR la presencia de Pax-7 en ambas muestras confirma la presencia de células satélite incluso en etapas avanzadas de diferenciación celular. Al activarse los procesos de reparación muscular, una parte de las células producidas son células satélite inactivas, lo que permite la conservación de células para reparaciones futuras⁴⁷.

Desmina en tanto, es un indicador de diferenciación miogénica temprana. En cultivo EDL-A era esperable encontrar una cantidad menor o indetectable de desmina debido al procedimiento de aislamiento utilizado que buscaba el aislamiento principalmente de células satélite inactivas. Estas células inactivas no expresan desmina, pero si Pax-7. En el cultivo EDL-B, por el contrario, se promovió la diferenciación y por lo tanto se esperaba encontrar fibroblastos o fibras musculares jóvenes las cuales expresan desmina. De este modo, se explica la posibilidad de visualizar la amplificación de desmina sólo en EDL-B y no así en EDL-A. En forma complementaria, se podría realizar posteriormente estudios de inmunohistoquímica, para evaluar la presencia o ausencia de las contrapartes proteicas de estos marcadores, lo que permitiría confirmar los resultados obtenidos en q-PCR.

En la amplificación de Pax-7 se observaron en el gel de agarosa dos amplicones (Figura 5.6, carriles 3 y 4). Esto podría deberse a la existencia de dos o más isoformas del gen Pax-7. Estas isoformas se encuentran descritas en pollos por Kawakami en 1997⁴⁸, en humanos y en ratones por Vorobyov en 2004⁴⁹. Por lo tanto, no es descartable que para conejo ocurra algo similar. Además, al desarrollar el partidador para el transcrito, se consideró la secuencia de ARN predicha para Pax-7 de conejo, sin considerar la posibilidad de las isoformas. Las zonas de empalme alternativo pueden tener sitios similares donde el partidador se pueda unir, como también estas zonas pueden estar dentro de la zona a amplificar lo que resulta en amplicones de diferentes tamaños⁵⁰. Otra opción es que simplemente los partidores

diseñados no hayan sido específicos, lo que se resolverá en futuros estudios secuenciando los amplicones recuperados desde el gel de agarosa.

Los marcadores de diferenciación tardía miogenina y cadena pesada de miosina no alcanzaron una señal por sobre los controles negativos (datos no mostrados). Esto podría deberse a que las condiciones de cultivo, tanto en tiempos de mantención como en suplementación del medio de cultivo, pudieron ser insuficientes para lograr una diferenciación avanzada. Las fibras musculares aisladas carecen de las condiciones semejantes a las *in vivo para* que puedan avanzar en el proceso de diferenciación. Se ha descrito a la célula satélite como la principal precursora del proceso de regeneración muscular, sin embargo, no serían la única fuente de células madre para la regeneración muscular. Se ha informado que las células madre de una variedad de otros orígenes, como derivados de médula ósea por Ferrari y colaboradores en 1998⁵¹, mesoangioblastos por Sampaoli y colaboradores en 2003⁵², pericitos por Dellavalle y colaboradores en 2007⁵³ o células intersticiales por Mitchell y colaboradores en 2010⁵⁴, contribuirían a la formación de miofibras en el proceso de reparación de los músculos. Por ende, es posible que las condiciones *in vitro* de este estudio no permitieron la evolución de las fibras tempranas hacia etapas tardías de diferenciación o que la cantidad de células diferenciadas tardíamente fueran insuficientes para obtener la cantidad de material genético necesaria para la amplificación. Para la retrotranscripción es necesario una cantidad mínima de ARN total, que proviene de todas las células presentes en el cultivo, sean células satélite, fibroblastos, fibras diferenciadas tempranas o tardías. Por lo tanto, aunque se alcance la cantidad mínima de ARN, es posible que los marcadores buscados no estén presentes en la cantidad necesaria para su correcta amplificación. Es posible también que se pudiera alcanzar un resultado superior incorporando factores de crecimiento a los medios de cultivo, tales como factor de crecimiento tipo insulina⁵⁵.

El diseño de los partidores para la q-PCR es un factor crítico por considerar. Todos los partidores utilizados en este estudio fueron diseñados con el software AmplifX® que permite evaluar que los partidores cumplan con todas las características requeridas. Dentro de estas características se considera que los partidores deben contar con una longitud de 18 a 24 pares de bases, mantener un contenido de GC entre un 40 y 60%, las temperaturas de fusión de ambos deben tener una diferencia menor a 1°C, las secuencias iniciales y finales deben contener una o dos bases púricas y ambas secuencias no deben poseer afinidad suficiente como para generar dímero de partidores⁵⁶. Sin embargo, para aclarar si los resultados negativos para miogenina y cadena pesada de miosina se debieron a problemas técnicos, se pudo haber realizado un ensayo de control positivo con las fibras musculares sobrantes del proceso de digestión. Así se podría haber establecido un control de célula diferenciada que debería expresar miogenina y cadena pesada de miosina, lo que queda como sugerencia para futuros estudios.

La expresión relativa de Pax-7 no se encuentra reportada en la literatura ya que, para nuestro conocimiento, no se han desarrollado estudios de expresión relativa para transcritos de Pax-7 en músculo de conejo. Además, la modificación de la ecuación de Pfaffl permite obtener valores de expresión relativa de los cultivos EDL-A y EDL-B, respecto de la expresión del gen constitutivo utilizado dentro del mismo estudio. De este modo, esta modificación permite normalizar los resultados y establecer la mayor expresión relativa de Pax-7 para los cultivos EDL-A respecto de EDL-B, pudiéndose proponer que en EDL-A había una mayor cantidad de células satélite inactivas (con una mayor proporción de la expresión del gen) mientras que en EDL-B había principalmente células en proceso de diferenciación y células satélite activadas que no expresan Pax-7 en la misma magnitud que las células inactivas. Asimismo, al comparar en EDL-B la expresión relativa de Pax-7 con desmina se observa que desmina posee una expresión mayor en relación con el gen constitutivo, lo que nuevamente se correlaciona con lo esperado en un medio pro-diferenciador.

Los resultados de la expresión relativa de transcritos de desmina tampoco son comparables a la literatura por las razones mencionadas anteriormente. Si se evalúa únicamente los resultados obtenidos para desmina, en que el transcrito amplificó (EDL-B), nuevamente es consistente con lo esperado, al corresponder al medio miogénico. En cambio, en EDL-A no hubo un crecimiento y diferenciación significativos, lo que se corresponde con la expresión del marcador bajo el límite de detección.

7. CONCLUSIÓN

Células satélites en cultivo primario *in vitro* obtenidas desde músculo extensor *digitorum longus* de conejo expresan transcritos como marcadores de diferenciación muscular al ser expuestas a un medio miogénico.

Debido a esto se logró diferenciar hacia linaje miogénico células satélites provenientes de músculo *extensor digitorum longus* de conejo.

Se logró adaptar protocolos para aislar fibras musculares de conejo y cultivar *in vitro* mioblastos derivados de células satélite de músculo *extensor digitorum longus* de conejo.

Se evaluó satisfactoriamente la expresión de marcador tempranos de miogénesis en cultivos sometidos a medios miogénicos o de proliferación celular, no así de los marcadores intermedios y tardíos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Fraile, R. Paniagua, M. Nistal, P. Sesma, and M. Alvarez, (1993), *Citología e Histología vegetal y animal*, 2° Edición, McGraw-Hill, España.
- [2] A. Pilat, (2003), *Terapias miofasciales: Inducción miofascial*. McGraw-Hill, España.
- [3] A. Mauro, (1961), "Satellite cell of skeletal muscle fibers", *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 9, no. 2, p. 493.
- [4] J. B. Miller, L. Schaefer, and J. A. Dominov, (1998), 6 Seeking Muscle Stem Cells, in *Current topics in developmental biology*, vol. 43, Elsevier, pp. 191–219.
- [5] C. Lepper, T. A. Partridge, and C.-M. Fan, (2011), "An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration," *Development*, vol. 138, no. 17, pp. 3639–3646.
- [6] W. H. Lewis and M. R. Lewis, (1917) "Behavior of cross striated muscle in tissue cultures," *Am. J. Anat.*, vol. 22, no. 2, pp. 169–194.
- [7] F. P. Moss and C. P. Leblond, (1971) "Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats," *Anat. Rec.*, vol. 170, no. 4, pp. 421–435.
- [8] M. D. Grounds and Z. Yablonka-Reuveni, (1993), "Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration," in *Molecular and cell biology of muscular dystrophy*, Springer, pp. 210–256.
- [9] R. Bischoff, (1974), "Enzymatic liberation of myogenic cells from adult rat muscle," *Anat. Rec.*, vol. 180, no. 4, pp. 645–661.
- [10] R. Bischoff, (1986), "Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture," *Dev. Biol.*, vol. 115, no. 1, pp. 129–139.
- [11] J. R. Beauchamp *et al.*, (2000), "Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells," *J. Cell Biol.*, vol. 151, no. 6, pp. 1221–1234.
- [12] S. B. P. Charge and M. A. Rudnicki, (2004), "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration," *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 1, pp. 209–238.
- [13] A. C. Wozniak, J. Kong, E. Bock, O. Pilipowicz, and J. E. Anderson, (2005), "Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways," *Muscle Nerve Off. J. Am. Assoc. Electrodiagn. Med.*, vol. 31, no. 3, pp. 283–300.

- [14] M. D. Grounds, K. L. Garrett, M. C. Lai, W. E. Wright, and M. W. Beilharz, (1992), "Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes," *Cell Tissue Res.*, vol. 267, no. 1, pp. 99–104.
- [15] Z. Yablonka-Reuveni and A. J. Rivera, (1994), "Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers," *Dev. Biol.*, vol. 164, no. 2, pp. 588–603.
- [16] Z. Yablonka-Reuveni, R. Seger, and A. J. Rivera, (1999), "Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 47, no. 1, pp. 23–42.
- [17] P. S. Zammit, J. P. Golding, Y. Nagata, V. Hudon, T. A. Partridge, and J. R. Beauchamp, (2004), "Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?," *J Cell Biol*, vol. 166, no. 3, pp. 347–357.
- [18] C. A. Collins *et al.*, (2005), "Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche," *Cell*, vol. 122, no. 2, pp. 289–301.
- [19] E. Schultz, M. C. Gibson, and T. Champion, (1978), "Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study," *J. Exp. Zool.*, vol. 206, no. 3, pp. 451–456.
- [20] P. Seale, L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M. A. Rudnicki, (2000), "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells," *Cell*, vol. 102, no. 6, pp. 777–786.
- [21] A. Irintchev, M. Zeschnigk, A. Starzinski-Powitz, and A. Wernig, (1994), "Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles," *Dev. Dyn.*, vol. 199, no. 4, pp. 326–337.
- [22] O. Halevy *et al.*, (2004), "Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal," *Dev. Dyn.*, vol. 231, no. 3, pp. 489–502.
- [23] G. Shefer, D. P. Van de Mark, J. B. Richardson, and Z. Yablonka-Reuveni, (2006), "Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle," *Dev. Biol.*, vol. 294, no. 1, pp. 50–66.
- [24] S. Oustanina, G. Hause, and T. Braun, (2004), "Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification," *EMBO J.*, vol. 23, no. 16, pp. 3430–3439.
- [25] N. Chi and J. A. Epstein, (2002), "Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease," *TRENDS Genet.*, vol. 18, no. 1, pp. 41–47.

- [26] E. J. D. Robson, S.-J. He, and M. R. Eccles, (2006), "A PANorama of PAX genes in cancer and development," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 1, p. 52.
- [27] V. Shinin, B. Gayraud-Morel, D. Gomès, and S. Tajbakhsh, (2006), "Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 7, p. 677.
- [28] J. von Maltzahn, A. E. Jones, R. J. Parks, and M. A. Rudnicki, (2013), "Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 41, pp. 16474–16479.
- [29] D. D. W. Cornelison and B. J. Wold, (1997), "Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells," *Dev. Biol.*, vol. 191, no. 2, pp. 270–283.
- [30] H. C. Olguin and B. B. Olwin, (2004), "Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal," *Dev. Biol.*, vol. 275, no. 2, pp. 375–388.
- [31] M. George-Weinstein, R. F. Foster, J. V Gerhart, and S. J. Kaufman, (1993), "In vitro and in vivo expression $\alpha 7$ integrin and desmin define the primary and secondary myogenic lineages," *Dev. Biol.*, vol. 156, no. 1, pp. 209–229.
- [32] Z. Li *et al.*, (1996), "Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin," *Dev. Biol.*, vol. 175, no. 2, pp. 362–366.
- [33] M. L. Mayo, P. Bringas, V. Santos, L. Shum, and H. C. Slavkin, (2002), "Desmin expression during early mouse tongue morphogenesis.," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 36, no. 2, pp. 255–263.
- [34] H. Weintraub *et al.*, (1991), "The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage," *Science (80-.)*, vol. 251, no. 4995, pp. 761–766.
- [35] N. Moncaut, P. W. J. Rigby, and J. J. Carvajal, (2013), "Dial M (RF) for myogenesis," *FEBS J.*, vol. 280, no. 17, pp. 3980–3990.
- [36] K. M. Baldwin and F. Haddad, (2001), "Invited Review: Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle," *J. Appl. Physiol.*, vol. 90, no. 1, pp. 345–357.
- [37] L. Fuertes, C. Santonja, H. Kutzner, and L. Requena, (2013), "Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part I)," *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Ed.)*, vol. 104, no. 2, pp. 99–127.

- [38] Y. Ono and K. Sakamoto, (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*, vol. 12, no. 7, p. e0182040.
- [39] A. Pasut, A. E. Jones, and M. A. Rudnicki, (2013), "Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle," *J. Vis. Exp. JoVE*, no. 73.
- [40] B. C. Syverud, J. D. Lee, K. W. VanDusen, and L. M. Larkin, (2014), "Isolation and purification of satellite cells for skeletal muscle tissue engineering," *J. Regen. Med.*, vol. 3, no. 2.
- [41] R. I. Freshney, (2015), *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.
- [42] C. S. Hughes, L. M. Postovit, and G. A. Lajoie, (2010), "Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture," *Proteomics*, vol. 10, no. 9, pp. 1886–1890.
- [43] J. E. Anderson, A. C. Wozniak, and W. Mizunoya, (2012), "Single muscle-fiber isolation and culture for cellular, molecular, pharmacological, and evolutionary studies," in *Myogenesis*, Springer, pp. 85–102.
- [44] P. Aguilera, M. R. Tachiquín, M. G. R. Munive, B. P. Olvera, and M. E. C. Cárdenas, (2014), "PCR en tiempo real," *Herramientas Mol. Apl. en Ecol. Asp. teóricos y prácticos. Ciudad México Lab. Patol. Vasc. Cerebral, Inst. Nac. Neurol. y Neurocir.*
- [45] M. W. Pfaffl, (2001), "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 9, pp. e45–e45.
- [46] I. Syrový and E. Gutmann, (1977), "Differentiation of myosin in soleus and extensor digitorum longus muscle in different animal species during development," *Pflügers Arch.*, vol. 369, no. 1, pp. 85–89.
- [47] C. A. Collins, P. S. Zammit, A. P. Ruiz, J. E. Morgan, and T. A. Partridge, (2007), "A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging," *Stem Cells*, vol. 25, no. 4, pp. 885–894.
- [48] A. Kawakami, M. Kimura-Kawakami, T. Nomura, and H. Fujisawa, (1997), "Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development," *Mech. Dev.*, vol. 66, no. 1, pp. 119–130.

- [49] E. Vorobyov and J. Horst, (2004), "Expression of two protein isoforms of PAX7 is controlled by competing cleavage-polyadenylation and splicing," *Gene*, vol. 342, no. 1, pp. 107–112.
- [50] B. R. Graveley, (2001), "Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world," *TRENDS Genet.*, vol. 17, no. 2, pp. 100–107.
- [51] G. Ferrari *et al.*, (1998), "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors," *Science (80-.)*, vol. 279, no. 5356, pp. 1528–1530.
- [52] M. Sampaolesi *et al.*, (2003), "Cell therapy of α -sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts," *Science (80-.)*, vol. 301, no. 5632, pp. 487–492.
- [53] A. Dellavalle *et al.*, (2007), "Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 3, p. 255.
- [54] K. J. Mitchell *et al.*, (2010), "Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development," *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 3, p. 257.
- [55] B. C. Syverud, K. W. VanDusen, and L. M. Larkin, (2016), "Growth factors for skeletal muscle tissue engineering," *Cells Tissues Organs*, vol. 202, no. 3–4, pp. 169–179.
- [56] B. Thornton and C. Basu, (2011), "Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software," *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 39, no. 2, pp. 145–154.

9. ANEXOS

Anexo A1. Acta de aprobación Comité de Ética de la Facultad de Farmacia.



CBI – Facultad de Farmacia

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRA ANIMALES - 010/2018

El Comité de Bioética para la Investigación (CBI) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, constituido por Sergio Blaimont, Asesor Jurídico externo y los académicos de la Facultad de Farmacia, Prof. Rafael Jiménez (Presidente del CBI), Prof. Marcela Escobar (Secretaria del CBI), Prof. María Carolina Henríquez (Miembro del CBI) y Prof. Raúl Vinet (Miembro del CBI) declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto "EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS PARA MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS SATÉLITES EXPUESTAS A UN MEDIO DE DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICO", presentado por el Sr. Cristian Meneses Zuñiga, estudiante de la carrera de Química y Farmacia, de la Facultad de Farmacia.

Para su evaluación, el CBI revisó los antecedentes enviados por el investigador y que incluyen: (1) curriculum vitae de médico veterinario que acredita la experiencia en el manejo de animales y (2) apego a las pautas bioéticas establecidas en el documento denominado "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRA ANIMALES" (versión 09-2016).

Objetivo del Estudio. La investigación propone evaluar la expresión de transcritos para marcadores de diferenciación en células satélites expuestas a un medio de diferenciación miogénico.

Metodología. Se trata de un estudio experimental que utilizará 3 ratones machos de la cepa SJL/BL6 y 1 conejo macho (*Oryctolagus cuniculus*), como fuente de tejido para aislamiento de células satélite musculares. Los animales serán eutanasiados al momento de su llegada al laboratorio por un médico veterinario, quien previamente verificara clínicamente que no existan signos de morbilidad. Para la eutanasia se utilizará una dosis letal de Ketamina/Xylazina 100/10 mg/Kg y 1 mg/Kg de Acepromazina vía inyección intraperitoneal, esto último para evitar el complejo rigor que afectaría el posterior aislamiento de células satélites del músculo.

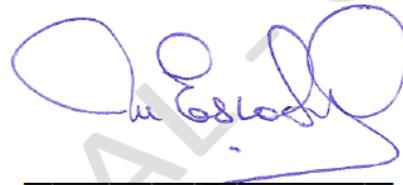
Acta CBI 010/2018

- I. El CBI considera que el objetivo general ha sido bien definido y que la metodología asociada a su logro se ha establecido adecuadamente.
- I. En la valoración bioética del proyecto, el CBI no objeta tratamiento que se dará a los animales utilizados para el aislamiento de células satélites del músculo.
- II. Por lo anterior, el CBI de la Facultad de Farmacia **APRUEBA** el protocolo experimental, tal y cual se señala en el proyecto.

Firman el Acta los miembros del Comité:



Rafael Jiménez



Marcela Escobar



Ma. Carolina Henríquez



Sergio Blaimont



Raúl Vinet

Valparaíso, 17 de julio de 2018

Anexo A2. Recubrimiento de placas con Matrigel®

Este procedimiento debe ser realizado el día previo al cual se realizará la obtención de la biopsia muscular para una correcta formación del recubrimiento. Dadas las características de Matrigel®, es necesario que todo el material que va a entrar en contacto con este reactivo se encuentre preacondicionado a baja temperatura (alrededor de -4°C), como lo son las pipetas estériles, puntas de micropipetas y tubos Falcon estériles, para lograr esto se almacenan hasta su uso a -20°C y luego todo el material se trabaja en hielo para evitar alzas de temperatura que puedan dañar el proceso de recubrimiento. Matrigel® se encontraba previamente alicuotado en volúmenes de 400µL, los cuales se encontraban almacenados a -80°C en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.

Para el procedimiento se tomó una de las alícuotas y se almacenó con antelación a 4°C para su descongelamiento, luego se pasó a un tubo cónico estéril de 50 mL siempre evitando cualquier cambio brusco de temperatura, a dicho tubo se adicionaron 3,6 mL de medio de cultivo DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc.®, Massachusetts, USA) frío, esta mezcla constituyó la solución para recubrir los platos de cultivo a utilizar, la cual se encuentra en una dilución 1:10. Posteriormente se dispuso 6 placas petri de 35 mm sobre hielo, tres para cultivo EDL-A y tres para cultivo EDL-B. Se adicionó la solución de revestimiento a cada frasco cubriendo completamente la superficie y evitando la formación de burbujas. La cantidad que se adicionó dependió del área efectiva de cultivo, para las placas petri de 34mm, se emplearon 600 µL de solución de recubrimiento a cada placa, los cuales fueron suficientes para recubrir completamente de manera uniforme la superficie de la placa. Tras aplicar la solución de recubrimiento, los platos de cultivo se dejaron incubando a temperatura ambiente fluctuando entre 15 y 25°C unos minutos, después del cual se succionó con una pipeta estéril la solución de revestimiento sobrante, teniendo especial cuidado de no remover la película polimérica ya formada. Una vez se retiró la solución de revestimiento se procedió a almacenar durante toda la noche en incubadora a 37°C para que secase el recubrimiento formado.

Anexo A3. Listado de Genes utilizados para síntesis de partidores

Oryctolagus Cuniculus Desmina, mRNA

ATGAGCCAGGCCTACTCGTCCAGCCAGCGCGTGTCTCCTACCGCCGCACCT
TCGGCGGCGCCCCGGGCTTCTCGCTCGGCTCCCCGCTCAGCTCGCCCGTGT
TCCCGCGCACGGGCTTTGGCACCAAGGGCTCCTCGAGCTCGGTGACGTCGC
GCGTGTACCAGGTGTCGCGCACGTCCGGCGGGGCTGGGGGCCTGGGGTGC
CTGCGGGCCAGCCGGCTGGGGACCACGCGGACACCCTCCTATGGCGCGGG
CGAGCTGCTGGACTTCTCGCTGGCCGACGCCGTGAACCAGGAGTTCCTGGC
CACGCGCACCAACGAGAAGGTGGAGCTGCAGGAGCTCAATGACCGCTTCGC
CAACTACATCGAGAAGGTGCGCTTCCTGGAGCAGCAGAACGCGGCGCTCGC
CGCCGAGGTGAACCGGCTCAAGGGCCGCGAGCCCACGCGCGTCCGCGGAGC
TGTACGAGGAGGAGCTGCGCGAGCTGCGGCGCCAGGTGGAGGTGCTCACCA
ACCAGCGAGCCCGCGTTCGACGTTCGAGCGCGACAACCTCATCGACGACCTGC
AGCGGCTCAAGGCCAAGCTGCAGGAGGAGATCCAGCTGAAAGAAGAGGCAG
AGAATAACCTGGCTGCCTTCCGAGCGGATGTGGACGCAGCCACACTAGCTCG
CATCGACCTGGAGCGCAGAATCGAATCTCTCAACGAGGAGATCGCATTCTTT
AAGAAAGTGCACGAAGAGGAGATCCGGGAGTTGCAAGCCCAACTTCAGGAAC
AGCAGGTCCAGGTGGAGATGGACATGTCCAAGCCGGACCTCACCGCTGCCC
TCAGGGACATCCGGGCTCAGTACGAGAGCATTGCGGGCAAGAACATTTCTGA
AGCCGAGGAGTGGTACAAGTCCAAGGTGTCTGACCTGACCCAGGCTGCCAA
CAAGAACAACGATGCCCTGCGCCAGGCCAAGCAGGAGATGATGGAATACCG
ACACCAGATCCAGTCCTACACCTGCGAGATTGATGCCCTCAAGGGCACTAAC
GATTCCCTGATGCGGCAGATGCGGGAGCTGGAAGACCGCTTTGCCAGCGAG
GCCAGCGGCTACCAGGACAACATTGCGCGCCTGGAGGAGGAGATCCGGCAC
CTCAAGGACGAGATGGCCCGCCACCTGCGCGAGTACCAGGACCTGCTCAAT
GTGAAGATGGCCCTGGACGTGGAGATTGCTACCTACCGGAAGCTGCTGGAG
GGCGAGGAGAGCCGGATCAACCTCCCCATCCAGACCTACTCTGCTCTCAACT
TCCGAGAAACCAGCCCGGAGCAGAGGGGCTCCGAGGTCCATAACCAAAAAGA
CTGTGATGATCAAGACCATCGAGACCCGGGATGGAGAGGTTGTCAGCGAGG
CCACACAGCAGCAACACGAGGTGCTGTAG

Oryctolagus Cuniculus Miogenina, mRNA

GGAATTCCATGGAGCTGTATGAGACATCTCCCTACTTCTACCAGGAGCCCCG
CTTCTACGACGGGGAGAACTACCTGCCCGTCCACCTCCAGGGCTTCGAGCC
GCCGGGCTACGAGCGGACTGAGCTCAGCCTGAGCCCAGGCCCCGGGGG
CCCTGGAAGACAAGGGGCTGGGGACCCCCGAGCACTGCCCGGGCCAATGC
CTGCCGTGGGCGTGCAAGGTGTGTAAGAGGAAGTCAGTGTCCATGGACCGG
AGGCGGGCAGCCACGCTCAGGGAGAAGCGCAGGCTCAAGAAAGTGAACGAG
GCCTTCGAGGCCCTGAAGAGGAGCACCCCTGCTCAACCCCAACCAGCGGCTA
CCCAAGGTGGAGATCCTGCGCAGCGCCATCCAGTACATCGAGCGCCTGCAG
GCGCTGCTCAGCTCGCTCAACCAGGAGGAGCGAGACCTGCGCTACCGGGG
GGCACCGGGCCCCAGCCAGGGCAGGTGCCAGCGAATGCAGCTCCCACAG
CGCTCCTGCAGCCCCGGAGTGGGGCAACGCGCTGGAGTTCGGTCCCAACCC
AGGAGACCATATGCTTGCAGCCGACCCTACAGACGCCACAACCTGCACTCC
CTCACCTCCATCGTGGACAGCATCGCCGTGGAGGACGTGTCTGTGGCCTTCC
CCGATGAAACCATGCCCAACTGAGATTGGAATTCC

Oryctolagus Cuniculus Cadena Pesada Miosina mRNA.

AGCCTTGGACGCCCGGCCTGGGAGGTGTGCCAGACCCGCGCTCCCCGTCC
AGTTTCTCCGCGCGCCCCACTTGGAGGGGACCAACCAGGCACCATGGCG
CAGAAGGGCCAACCTCAGCGACGATGAGAAGTTCCTCTTTGTGGACAAGAACT
TCATCAACAGCCCCGTGGCCCAGGCCGACTGGGTGGCCAAGAGGCTGGTGT
GGGTCCCTTCGGAGAAGCAGGGCTTCGAGGCGGCCAGCATCAAGGAGGAGA
AGGGGGATGAGGTGGTCGTGGAGCTGGTGGAGAATGGGAAGAAGGTCACGG
TGGGCAAGGATGACATCCAGAAGATGAACCCGCCCAAGTTCTCCAAGGTGGA
AGACATGGCGGAGCTGACGTGTCTCAACGAAGCTTCCGTGCTGCACAACCTG
AGGGAGAGGTACTTCTCTGGGCTCATCTACACGTACTIONCGGCCTCTTCTGCG
TGGTGGTCAACCCCTACAAGCAGCTGCCCATCTACTCGGAGAAGATCGTGGA
CATGTACAAGGGCAAGAAGAGGCACGAGATGCCACCACACATCTACGCCATC
GCCGACACGGCCTACAGGAGCATGCTGCAGGATCGGGAGGACCAGTCCATT
CTCTGCACAGGCGAGTCTGGAGCCGGGAAGACGGAGAACAACCAAGAAAGTC
ATCCAGTACCTGGCCGTGGTGGCCTCCTCGCACAAAGGGCAAGAAGGACACG
AGCATCACGGGGGAGCTGGAGAAGCAGCTTCTGCAAGCAAACCCCATCCT
GGAGGCCTTTGGCAACGCCAAGACGGTCAAGAATGACAACTCCTCGCGATT
GGCAAGTTCATCCGCATCAACTTTGACGTCACTGGTTACATCGTGGGCGCCA
ACATTGAGACCTATCTGCTGGAAAAGTCACGAGCCATCCGCCAAGCCCGAGA
GGAGAGGACCTTCCACATCTTTTACTACCTGATTGCTGGGGCCAAGGAGAAG
ATGAGAAATGACTTGCTCTTGGAGGGCTTCAACAACCTACACATTCTCTCAA
TGGCTTTGTGCCATCCCAGCCGCCAGGATGACGAGATGTTCCAGGAAACG
GTGGAGGCCATGTCCATCATGGGCTTCAGTGAAGAGGAGCAGCTGTCTGTGT
TGAAGGTGGTGTCTTCAGTCCCTGCAGCTTGGAAACATCGTCTTCAAGAAGGAA
AGAAACACAGACCAGGCGTCCATGCCGGACAACACAGCTGCCAGAAAGTTT
GCCACCTCATGGGAATTAACGTGACAGATTTACCCAGATCCATCCTGACCCC
GCGTATCAAAGTTGGACGGGACGTAGTGACAGAAAGCTCAGACAAAAGAACAG
GCAGACTTCGCTGTGAGGCTTTGGCAAAGGCCACGTATGAACGCCTTTTTCC
GCTGGATCCTCAGCCGTGTGAACAAAGCCCTGGACAAGACCCATCGGCAGG
GGGCTTCCTTCTGGGGATCCTGGACATCGCTGGATTTGAGATCTTTGAGGT
GAACTCCTTCGAGCAGCTGTGCATCAACTACACCAACGAGAAGCTGCAGCAG
CTGTTCAACCACACCATGTTTCATCCTGGAGCAGGAGGAGTACCAGCGCGAGG
GCATCGAGTGGAACCTTCATCGACTTCGGGCTCGACCTGCAGCCCTGCATTGA
GCTCATTGAGCGGCCGAACAACCCCTCCAGGTGTGCTGGCCCTGCTGGATGA
GGAGTGCTGGTTCCCAAAGCCACAGATAAGTCTTTTGTGGAGAAGCTGTGC
ACAGAGCAAGGCAACCACCCCAAGTTCCAGAAGCCCAAGCAGCTCAAGGACA
AAACGGAGTTCTCCATCATCCATTACGCTGGGAAGGTGGACTACAACGCGAG
TGCCTGGCTGACCAAGAACATGGACCCCTGAATGACAACGTGACCTCCCTC
CTCAACGCCTCCTCGGACAAGTTCGTGGCCGACCTATGGAAGGACGTGGACC

GCATCGTGGGGCTGGACCAGATGGCCAAGATGACAGAGAGCTCACTGCCCA
GCGCCTCCAAGACCAAGAAGGGCATGTTCCGCACGGTGGGGCAGCTGTACA
AGGAGCAGCTGGGGAAGCTGATGACCACGCTGCGCAACACCACGCCCAACT
TCGTGCGCTGCATCATCCCCAACACGAGAAGCGGTCCGGCAAGCTGGACG
CGTTCCTGGTGTGGAGCAGCTGCGGTGCAACGGGGTGCTGGAAGGCATCC
GAATCTGCCGCCAGGGCTTCCCCAACAGGATCGTCTTCCAGGAGTTCCGCCA
ACGCTACGAGATCCTGGCAGCCAACGCCATCCCCAAGGGCTTCATGGATGG
GAAGCAAGCCTGCATTCTCATGATCAAAGCTCTGGAAGTGGACCCCAACTTGT
ACAGGATCGGGCAGAGCAAATCTTCTTCCGCACGGGCGTGCTGGCCCACCT
GGAGGAGGAGCGGGACTTGAAGATCACCGACGTCATCATGGCCTTCCAGGC
CATGTGTGCTGGCTACCTCGCCCGCAAGGCCTTCGCCAAGCGGCAGCAGCA
GCTGACCGCCATGAAGGTGATCCAGAGGAACTGCGCCGCCCTACCTGAAGCT
GCGGAACTGGCAGTGGTGGCGCCTCTTACCAAGGTGAAGCCGCTGCTGCA
GGTGACACGGCAGGAGGAGGAGATGCAGGCCAAGGAGGATGAGCTGCAGAA
GATCAAGGAGCGACAGCAGAAGGCGGAGAGCGAGCTCCAGGAGCTGCAGCA
GAAGCACACGCAGCTGTCCGAGGAGAAGAACCTGCTGCAGGAGCAGCTGCA
GGCGGAGACGGAGCTGTACGCGGAGGCCGAGGAGATGCGCGTCCGGCTGG
CGGCCAAGAAGCAGGAGCTGGAGGAAATCCTGCATGAGATGGAGGCCCGCC
TGGAGGAGGAGGAAGACCGGGGCCAGCAGCTGCAGGCCGAGAGGAAGAAG
ATGGCCCAGCAGATGCTGGACCTGGAAGAGCAACTGGAGGAGGAGGAAGCT
GCCAGGCAGAAGCTACAGCTCGAAAAGGTCACCGCCGAGGCCAAGATCAAG
AAGTTGGAGGACGACATCCTGGTCATGGACGATCAGAACAACAAGCTCTCAA
AAGAGCGAAAACCTCCTGGAAGAGAGGATTAGTGATTTAACAACAATCTTGCC
GAGGAGGAAGAGAAGGCCAAGAACCTGACCAAGCTGAAGAACAAGCATGAAT
CCATGATCTCAGAAGTGGAAAGTGCGGCTGAAGAAGGAGGAGAAGAGCCGGC
AGGAGCTGGAGAAGCTGAAGCGGAAGATGGACGGCGAGGCCAGTGACCTCC
ACGAGCAGATCGCCGACCTCCAGGCGCAGATCGCAGAGCTCAAGATGCAGC
TGGCCAAGAAGGAAGAGGAGCTGCAGGCCGCCCTGGCCAGGCTGGAGGAT
GAAACGTCTCAGAAGAACAACGCCCTGAAGAAGATCCGGGAGCTGGAGGGG
CACATCTCCGACCTGCAGGAGGACCTGGACTCAGAGCGGGCCGCCAGGAA
CAAGGCCGAGAAGCAGAAGCGAGACCTGGGGGAGGAGCTGGAGGCGCTGA
AGACGGAGCTGGAGGACACGCTGGACACCACGGCCACCCAGCAGGAGCTCC
GGCCAAGCGGGAGCAGGAGGTGACGGTGCTGAAGAAGGCCCTGGACGAG
GAGACCCGGTCCCATGAGGCCAGGTCCAGGAGATGAGGCAGAAACACACA
CAGGTGGTGGAGGAGCTCACGGAGCAGCTGGAACAGTTCAAGAGGGCCAAG
GCGAACCTCGACAAGACCAAGCAGACGCTGGAGAAGGAGAACGCAGACCTG
GCCGGCGAGCTGCGGGTCTTGGGCCAGGCCAAGCAGGAGGTGGAGCACAA
GAAGAAGAAGCTGGAGGTGCAGCTGCAGGAGCTGCAGTCCAAGTGCAGCGA
TGGGGAGCGGGCCCGGGCGGAGCTCAACGACAAGGTCCACAAGCTGCAGAA

TGAAGTGGAGAGCGTCACGGGCATGCTCAGCGAGGCCGAGGGGAAGGCCAT
CAAGCTGGCCAAGGAGGTGGCGTCCCTCGGGTCCCAGCTCCAGGATACCCA
GGAGCTGCTCCAAGAAGAAACCCGGCAGAAGCTCAACGTGTCCACCAAGCTG
CGGCAGCTGGAGGACGAGAGGAACAGCCTGCAGGAGCAGCTGGACGAGGA
GATGGAGGCCAAGCAGAACCTGGAGCGCCACATCTCCACCCTGAACATCCAG
CTCTCCGACTCAAAGAAGAAGCTGCAGGACTTTGCCAGCACCGTGGAGTCCT
TGGAGGAAGGCAAGAAGAGGTTCCAGAAGGAAATTGAGAGCCTCACCCAGCA
GTACGAAGAGAAAGCAGCTGCTTACGATAAACTGGAAAAGACCAAGAACAGG
CTTCAGCAGGAGCTGGACGACCTGGTCGTAGACTTGGATAACCAGCGGCAAC
TGGTGTCCAACCTGGAAAAGAAGCAGAAGAAGTTCGATCAGTTGTTAGCCGA
GGAAAAGAACATCTCTTCCAAGTATGCGGATGAAAGGGACCGAGCCGAGGCT
GAAGCAAGGGAAAAGGAAACCAAGGCCTTGTCCCTGGCTCGGGCCCTCGAG
GAGGCCTTGGAGGCCAAAGAGGAGCTCGAGAGAACCAACAAAATGCTCAAG
GCCGAGATGGAAGACCTCGTCAGCTCCAAGGACGACGTGGGCAAGAACGTC
CATGAGCTGGAGAAGTCCAAGCGGGCCCTGGAGACACAGATGGAGGAGATG
AAGACGCAGCTGGAAGAGCTAGAGGACGAGCTGCAGGCCACCGAGGACGCC
AAGCTGCGGTTGGAGGTCAACATGCAGGCCCTCAAAGTCCAGTTCGAGCGG
GATCTCCAGGCCCGGGATGAGCAGAACGAGGAGAAGAGGAGGCAGCTGCAG
AGGCAGCTGCATGAGTACGAGACGGAACCTGGAAGACGAGCGCAAGCAGCGG
GCCCTGGCCGCGGCAGCCAAGAAGAAGCTGGAGGGGGACCTGAAAGACCTG
GAGCTTCAGGCGGACTCCGCCATCAAAGGGCGGGAGGAAGCCATCAAGCAG
CTTCTGAAACTGCAGGCTCAGATGAAGGACTTCCAGAGAGAACTGGAAGATG
CCCGTGCCTCCAGAGACGAGATCTTTGCCACAGCCAAGGAGAACGAGAAGAA
AGCCAAGAGTCTGGAGGCAGACCTCATGCAGCTACAAGAGGATCTGGCCGC
GGCAGAGAGGGCTCGCAAACAGGCAGACTTGGAGAAGGAGGAGCTGGCCGA
GGAGCTGGCCAGCAGCTTGTCCGGAAGGAACGCGCTGCAGGATGAGAAGCG
CCGCCTGGAGGCCCGGATCGCACAGCTGGAGGAGGAGCTGGAGGAGGAAC
AGGGCAACATGGAGGCAATGAGCGACCGCGTCCGCAAGGCTACGCAGCAGG
CCGAGCAGCTCAGCAACGAGCTGGCCACAGAGCGCAGCACAGCCCAGAAGA
ATGAGAGCGCACGGCAGCAGCTCGAGCGGCAGAACAAGGAGCTCAAGAGCA
AGCTGCAGGAGATGGAGGGGGCAGTCAAGTCCAAGTTCAAGTCCACTATCGC
GGCGCTGGAGGCCAAGATTGCGCAGCTGGAGGAGCAGGTTGAGCAGGAGG
CCAGAGAGAAGCAGGCGGCCGCAAGGCGCTGAAGCAGAGGGACAAGAAG
CTGAAGGAGATGCTGCTGCAGGTGGAAGACGAGCGCAAGATGGCTGAGCAG
TACAAGGAGCAGGCAGAGAAAGGAAACGCCAAGGTCAAGCAGCTCAAGAGG
CAGCTGGAGGAGGCCGAGGAGGAGTCGCAGCGCATCAACGCCAACCGCAG
GAAGCTGCAGCGGGAGCTGGACGAGGCCACGGAGAGCAACGAGGCCATGG
GCCGCGAGGTGAACGCGCTCAAGAGCAAGCTCAGGCGAGGAAACGAGACCT
CGTTCGTTCTACCAGAAGGTCTGGAGGGCGTAGAGTTATTGAAAACGCAG

ATGGCTCTGAGGAGGAAGTGGACGCTCGCGACGCAGACTTCAATGGAACCAA
ATCCAGTGAATGAACGACTTCGAGTTTTGCACCACAGCAGAAGGTCCCACCA
AAGAACAGATTCAACCAAACCCAACCCAGCAAACCCTACTTAGCATCGTCCAA
CCCTGTCTTCAAGTTTCAAACATCACGGACAACCCCAGAACATAAAAACCACT
GCCTGAGTCAGGGTACAGAATTCCAAGTTTTTATGATGTGGCAGAGGAAAAAG
CCAACAGGAACAAAAACACCCTCGCTCTACCGATCAGGCAGAGATGTTAAGTT
TTTTGGAAGATACAGCCACATGAACCGGTCACTGGTCAATTCGTTTACATGAC
ATGGGTGAAGTTCACCACGATGGGTGCCGCTGCCCCACTCCCCTCCCAGT
TCATTCCTAACCTCTGTGCCCTTCCAAGCCCCTGAGTAAGGCCCTGGTTTGA
GAATCCCTTCTCCCTCTCCTGGCTACCACACCTCAGACATGCACAGTTCACCC
CGCCCAAGTGCCTTCTGTAGTCACAAGAAGTAAAAAAGGAGACACTGTTCCAT
GGATGAGAACAGGGACGGTCCACTGTCTTATGTGCACCCAATTGTACTTCGG
ACACCTTCACTAATAAAAGGTCATACGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGT
GCCGAATTC

Oryctolagus Cuniculus Pax-7 Predicted mRNA

GAGCGCAGCAGGGGTAGAGGGAGCGGACGGGAAGCGAATTTTGCCGACTCC
GGACGCGTCCCCGGTGTGCGCAGGAATGGCTGCCCTGCCGGCGCGGTCC
CGAGGATGATGCGGCCGGCTCCGGGGCAGAGCTACCCGCGCACGGGATTTCC
CCCTGGAAGTGTCCACCCCGCTGGGCCAAGGCCGGGTCAATCAGCTCGGTG
GGGTCTTCATCAACGGGCGACCCCTGCCTAACCACATCCGCCACAAGATCGT
GGAGATGGCCCACCACGGCATCCGGCCCTGTGTCATCTCCCGCCAGCTGCG
CGTCTCCCACGGCTGTGTCTCCAAGATCTTGTGCCGCTACCAGGAGACCGGC
TCCATCCGGCCGGGGGCCATCGGCGGCAGCAAACCCAGACAGGTGGCGAC
CCCGGATGTGGAGAAAAAGATTGAGGAGTACAAACGGGAAAACCCGGGCAT
GTTTCAGCTGGGAGATCCGGGACCGGCTGCTGAAGGACGGGCACTGCGACCG
CAGCACCGTGCCCTCAGTGAGTTCGATTAGCCGTGTGCTCAGAATCAAGTTC
GGGAAGAAAGAGGAGGAAGATGAGGCCGACAAGAAGGAGGAGGACGGTGA
GAAGAAGGCTAAACACAGCATTGACGGCATCCTGGGCGACAAAGGGAACCG
GCTGGACGAGGGCTCAGACGTGGAGTCGGAACCCGACCTCCCACTGAAGCG
CAAGCAGCGCCGGAGCCGGACCACGTTACGGCCGAGCAGCTGGAGGAGC
TGGAGAAGGCCTTCGAGCGGACGCACTACCCCGACATCTACACCCGCGAGG
AGCTGGCGCAGAGGACCAAGCTGACTGAGGCGCGCGTCCAGGTCTGGTTCA
GTAACCGCCGCGCCCGCTGGCGTAAGCAGGCAGGAGCCAACCAGCTGGCC
GCCTTCAACCACCTTCTGCCAGGAGGCTTCCCCGCCAGCGGCATGCCACG
CTGCCGCCCTACCAGCTGCCGGACTCTGCCTACCCACCTCCACCATCTCCC
AGGACGGGGGCAGCACGGTGCACCGGCCCCAGCCTCTGCCGCCGTCCACC
ATGCACCAGGGGGGGCTGGCTGCAGCTGCTGCAGCCGCCGACAGCAGCTCT
GCCTACGGAGCCCGCCACAGCTTCTCCAGCTACTCCGACAGCTTCATGAACC
CGGCGGGCGCCCTCCAACCACATGAACCCCGTCAGCAACGGCCTGTCTCCCC
AGGTGATGAGCATCCTGAGCAACCCCGGCGCGGTGGCCCCGACGCCGAG
GCCGACTTCTCCCTGTCCCCGCTGCACGGCGGCCTGGACTCGGCCACCTCC
ATCTCGGCCAGCTGCAGCCAGCGGGCGGACTCCATCAAGCCGGGAGACAGC
CTACCCACCTCCCAGTCTACTGCCCCGCCACCTACAGCACCACCGGCTACA
GCGTGGACCCCGTGGCTGGCTACCAGTACGGCCAGTACGGCCAGACTGCTG
TTGACTACCTGGCCAAAACGTGAGTCTGTCCACACAGCGCCGCATGAAGCT
GGGGGAGCACTCCGCCGTGCTGGGACTGCTGCCTGTGGAGACCGGCCAAG
CCTACTAGGGCCCCGGGCAACCTGCCCCCCGCCAGCCCCGCCAGCCCCCT
CCCCGCTTCAGCCCGCTCCTGCCCTGGTGTCTCAGGAGGCCACAAGGGGA
GCCAGTCCCTTCTCATCGCCGGCCCCTGGAGGTGCACAGCCCGTGTGTGTT
CCCCTGCGCTTCCGGACCCAGAGTGACCCCTTGGTTTCTCCCTCTCAGCCC
CCGCCCTGCACTCTCCCCAGAGGGTGTGGCCAGCCCATGGTGTCTCGCCG
TGCAGCCTGTCTGGGCTCCGGGCCACCTCTGGCTCACCTGAACAGGCTC

CCAGAGGAGAAGGATGGTGCCTGAGACTCGGGCCGGGGTGCAGGGGGTGC
CCTGGCGGACGTGGAGAATAAGGCCCCAGGGCCGCTCTCAGCTGCAGGTGC
TGGGGGCCGGCCCTCCCAGGTGGGTGAGTGGCCAGTGTGCGGCAGCACAG
CCTTTGCCGCTCTGCGCACTGGGGCTCCAGCAGAGGGGGTACCCGGCCCT
GGGCTCTTCCCAGGGAGTAAGCGAGGCAACAGTCTGGCCTCCACGCAGGGA
TCAGGAGGGCTTCAGGACCTTCCCCACACACCCCTGCTGGGTAGGGGGAGA
CACAGCCCAGGCAGGAAGAGGCTCTGTCAGGGAGCGGGGCCACATGGGGT
GGGGGCAGGGCTGGTTAGCCCCAAAGCAGACACCTGGAAGCCGAGGACTCT
GCCTGAAGCCCCACCTCCAATTGTCTACTCCACGTGGGGCCTGGACCTGCA
GAACCTGCCGGCTTCCTTGGGGAAGGGGGCCCGGGTGAAGAGGAGGCTCAG
GATGGACCCTGCATACCCAGGACCCCTCTGCTTGGGGGTGCGAGCCTTGGTT
GGCTAAGGTGGCAGCTCGCAGCCTTCAGATCCACAGCCCATGGAGCTGAGAT
TCTGCCCAAAGCCTCCGGCAGAGCCCCAGCCCCGCCACACATGCCTGAT
CTCAGAAGGGGCTCCCTGGGGGCTGCAAAGACCTTTGGAGCTGGGCTCCTG
CACCCAGCAGGGGTCCCCCCCCACTTACCCACAGATAAGACCTCCCAGTC
CCCTCGCATCAGGGCATGTGGCTGTCTTCGCAGAGTGGCACGGTTCAGTGTT
GACGCACGCCAGCCCGTGACGCAGCACAGCTGAGCTGAGGTCCGGTCCGT
GTGGCCGCTTTGCAAGGCACCACCCCTGCAGAGGGAGATAACCAAAGTTCC
CAGAGACGAGGGAGAAGCACCCCTCCTTCACTCAAGCTCCATTCTCTTGA
AGAGCTGGGCCCTTCGGGGGCCCTCCAAGCCCCTGTTCACTCCTCCCACGA
GGCTTCTCGCCACCTTTGTCTAGTTGCCAGCGTGTGTGCGTCTTCCCTGTCA
GCATCGTTGTCTGTTCTGCCCTTGGCTCACCTTTGTCAAGTGCTGCTGGAGG
GCAGGGCACCCGCCTTGTGCACCCGGCACCTGTGATGTGCACACGGCACTG
AATGCATAAACATTGGACCCGATTGTCCCCACCTGGGCGCGAGAAGCCAGCC
CTATGCTCAGTCCATGTCTCTTGTCCCCACCCAGCACAGCGCCCCCAGAGG
GGAGGGCTGTTGCCTCAGTGTCTCCCGAGGTCTCCAGGAAGGCTGGACGGG
CAGGACCCGAAGTCGCTTGTCTGCGTGGACATCACCGCTGTGACAAATGCTC
ACCTGCTTCTCGTCCTCGGCTGTCTGGGCGTGGCCACAGCAGCTCAGATCT
CTGAGAAGAGCCTGGTCAAGTGAGTGGGGGCCGGACAGACTGTGGTTCGCAG
TGGACACCCAGACGCCTGTGGCCCGTCAGGGTCAGCCGAGGCTTCAGCTGG
GGCTCCAGCTCCAGGAACCCCGGTTCTCCAAGCTCCGGACGAGAGAAAAGG
CGTGGTGAGCTCCTCCCGACGACCAACCACTTCATCCGCATTCTGGAATGG
TGCATCTGTCCCTGGAGGCCTTCTCAGGACGTGTCTGAGGAGCAGGGATCTC
AGGTGACATCAGGACCATGCAGCCCGACCCCTGACTCCCCCAGAAGGTGG
CATTCCAACGCTAGGACCAACGCCGAGTGTCTATCCCCTAGGGAGAAATGGA
CCCCACACCTGCCTGGGCGTATCCAGACGGCTTACCCGGCACCTCTGAGC
CCGTCCCAGGCCACGGTCTCAGTAGGACTGAGGAGCCCCGCCCTCCTCAGC
AGGATGCCCTTGACCCGGACAGGTTGTCCCTAAAACCTTCCGTATTGATGTGT
GTGACCGGCTCTGTCCATGAAGCTCCACCTTGAGCCGGCAGTTTCACCAGCG

ACGACGCTGGACGAGTGGCTCCAGGCCTCCATCTCAGTGGGGGCTGGGGGC
CACAGTCGGAAACAGAAGGCCTGGCCACCCCAGAAGCCAGCCTCAGCCACC
CCTGTACATAGAGTCCATAGCAGATAAGAGATGTTCCCTTCAACTGATCGCCC
GTAGCTGTCGGTCCTGCTCGCGGCGGGGGCGAGGGGGGCGGGGCCTCTGC
CGAGTTCATTGTACATTAGTTGGAAATGTGGTGACGTGCTGTTTGTATAGG
AAGTGGACTTTTTTATACATATATAAATATATATACACACACACGCTACAACAG
GAAAGCCTGCGGTGTGTGTCGTGTTAGTGCCAGGGACCACCTGTAGGGACCT
CTCTGCGTATCGTGCGTTTCAGAGTATACATTCCTGGCTCGGCCGGGTCCCT
CCGGTCTTGTCGCTTTGTGTCTCCATTCGGCGTGTCGCTTCCTCCTGCCGTG
ACGAAGAGCCTCGGGGTGAGGCGTGGGAGCACTTGCTCTTCTACACCTGGC
GGACCGTGGCTGTGCCTTGGCCAGAGGAACGAGCAAGAGAAGAAGAGGGGC
GGGGAGGAGGCGAGAGCGAGCGAGGCCCGAGTGGAGCTCAGGTCGGGCTC
CTGACTGTGGCCGCCCGCCCAATCCAGGCAGCTGGGGAGACCTGGACTG
TGGATCCTGGGGCTCCATGAAACTCCACGGTTGTCACTGGGGCCTCTCAGGT
CAATGCTGCCACCAAACCCCCCAATGTGTCTTCTGAACTGAGTGCTTTTGG
GGGCACGCAGGTCTCGCCTCCCTCCCCTTGCAAAATGGGAAGCAGCGAATG
GGGTCCACCAGCCGCCATCTCGAGACGCTTCCAGACCCCCACGTATCTGATG
CTTCTTCTGTTGATTCCGGACGCAGCCCCGCCCTGCCTGGGGAATGGCCACAG
AGTTCTCTCTAGATCATTCCCTTCTTGTAACTACCACGTTGCTGCTTCCGCGTT
TTCCAGCCATTTTCTCCCACGGAAGCGAGTGTGTGTGCGTGTGAGTGGGG
TGCGTGCGTGGGTGCGTGGGTGTGTGTTTAAATATAATCGCACCATAA
TTTATTCAGCTATATGGAGTAGTACACTAGGAAGAGAACTGGTATTTGCTTTA
ACTACCTGCTGCTTGTACGTGCTTCCTCTGTA ACTCAGGCGTAACTGTTACAC

A

