



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

**“DESARROLLO DE SCAFFOLDS MICROESTRUCTURADOS PARA PRODUCCIÓN DE
CARNE CULTIVADA Y SU EFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADA A
MIOGÉNESIS Y FUSIÓN CELULAR”**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Autora: Dragica Bezjak

Profesor Guía: Cristian Acevedo

Profesor Co-Guía: Tomás Corrales

Cristian Acevedo

Tomás Corrales

Septiembre (2024)



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): ☐ Memoria o trabajo de título ☒ Tesis de Postgrado

Título del trabajo: "DESARROLLO DE SCAFFOLDS MICROESTRUCTURADOS PARA PRODUCCIÓN DE CARNE CULTIVADA Y SU EFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADA A MIOGÉNESIS Y FUSIÓN CELULAR"

Nombre del candidato(a): Dragica Bezjak Carrasco

Carrera / Grado: Doctorado de Biotecnología

Campus: Casa central Departamento: Biotecnología

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Dr. Cristian Acevedo, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

☒ El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

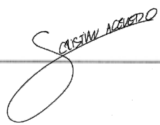
☐ El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 2 años ☐ 3 años ☐ 5 años ☐ 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: 13.07.2026 Firma: 

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: 13.07.2026 Firma: 

Comité Evaluador

Presidente:

Dr. Luis Mercado

Evaluador Interno:

Dr. Cristian Ramírez

Evaluador Externo:

Dr. Manuel Ruz

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis profesores guía y co- guía Dr. Cristian Acevedo y Dr. Tomás Corrales. Al Dr. Jorge Valdés por su colaboración y apoyo durante este proyecto. A los colegas y amigos del Centro de Biotecnología Daniel Alkalay Lowitt y de SPM Lab de la facultad de Física de la USM.

Un especial agradecimiento a Nicole Orellana, quien me enseñó todo lo que aprendí durante esta tesis en cuanto a manejo de laboratorio, ya que, gracias a su conocimiento, apoyo y amistad el desarrollo de este proyecto fue posible.

Al Dr. Michael Kappl por recibirme en su laboratorio en el Instituto Max Planck para la Investigación de Polímeros, durante mis pasantías doctorales en Mainz, Alemania, y a todos los trabajadores y amigos que hice en el camino.

El financiamiento de la Beca de Doctorado Nacional ANID 21211207, incluyendo apoyo en gastos operacionales y financiamiento de pasantía de investigación; el programa PIIC 035/2023 de la Dirección de Postgrado de la Universidad Técnica Federico Santa María, al proyecto Fondecyt Regular 1190100 y proyecto Conicyt- Max Planck Society MPG190023.

Finalmente, a mi familia, amigos y pareja, por todo el apoyo durante estos años.

Resumen

La carne cultivada es una tecnología innovadora que busca producir tejido muscular comestible a partir de células animales, las cuales se cultivan hasta desarrollar miofibras, evitando así la necesidad de sacrificar animales. Una forma efectiva de cultivar células es usando scaffolds, que son matrices de biopolímeros que permiten el anclaje y soporte de las células. En esta tesis doctoral, se han desarrollado dos scaffolds con las técnicas de fabricación de solvent casting y electrospinning, utilizando biomateriales comestibles y con una superficie de microcanales paralelos, con el propósito de alinear las células musculares y promover los procesos de miogénesis y fusión celular en la fabricación de carne cultivada.

El scaffold fabricado mediante la técnica de solvent casting ha demostrado ser eficaz en alinear las células musculares de manera paralela a los microcanales, facilitando la formación de estructuras musculares alargadas, multinucleadas y similares a las miofibras. Sin embargo, el scaffold fabricado con electrospinning no obtuvo los resultados de alineamiento esperados. Este alineamiento celular es crucial para replicar las características del tejido muscular in vivo, por lo que se decidió continuar el resto de los análisis utilizando el scaffold fabricado por solvent casting. El análisis de expresión génica mediante RT-qPCR ha revelado correlaciones significativas entre genes involucrados en la miogénesis y la fusión celular, como myomaker, myod, myomixer, y miosina de cadena pesada. Estos resultados han permitido la propuesta de un modelo de progresión miogénica al usar scaffolds microestructurados.

La comparación entre scaffolds liso y microestructurado mediante técnicas de secuenciación de alto rendimiento ha mostrado diferencias significativas en los perfiles transcriptómicos. El análisis de enriquecimiento funcional ha identificado grupos génicos importantes relacionados con el desarrollo del músculo esquelético, incluyendo categorías como el deslizamiento de filamentos, la contracción muscular y la organización de sarcómeros al utilizar scaffolds microestructurados.

En resumen, esta tesis proporciona una comprensión detallada del impacto de los scaffolds microestructurados en la producción de carne cultivada. Al alinear las células musculares y promover procesos clave como la miogénesis y la fusión celular, el scaffold desarrollado representa un avance significativo en la elaboración de tejido muscular para su uso en carne cultivada.

Abstract

Cultured meat is an innovative technology that seeks to produce edible muscle tissue from animal cells, which are cultured to develop myofibers, thus avoiding the need to sacrifice animals. An effective way to culture cells is by using scaffolds, which are biopolymer matrices that allow the anchoring and support of cells. In this dissertation, two scaffolds have been developed with solvent casting and electrospinning manufacturing techniques, using edible biomaterials and a parallel microchannel surface, with the purpose of aligning muscle cells and promoting the processes of myogenesis and cell fusion for the development of cultured meat.

The scaffold manufactured using the solvent casting technique has proven to be effective in aligning muscle cells parallel to the microchannels, facilitating the formation of elongated, multinucleated, myofiber-like muscle structures. However, the scaffold made using electrospinning did not have the expected alignment results. This cellular alignment is crucial to replicate the characteristics of muscle tissue *in vivo*, therefore, it was decided to continue the remaining analysis using the solvent-cast scaffold. Gene expression analysis by RT-qPCR has revealed significant correlations between genes involved in myogenesis and cell fusion, such as myomaker, myod, myomixer, and myosin heavy chain. These results have allowed the proposal of a model of myogenic progression when using microstructured scaffolds.

Comparison between flat and microstructured scaffolds using high-throughput sequencing techniques has shown significant differences in transcriptomic profiles. Functional enrichment analysis has identified important gene clusters related to skeletal muscle development, including categories such as filament displacement, muscle contraction, and sarcomere organization using microstructured scaffolds.

In conclusion, this thesis provides a detailed understanding of the impact of microstructured scaffolds on cultured meat production. By aligning muscle cells and promoting key processes such as myogenesis and cell fusion, the developed scaffold represents a significant advance in the elaboration of muscle tissue for use in cultured meat.

Índice General

Comité Evaluador	i
Agradecimientos.....	ii
Resumen	iii
Abstract.....	iv
Índice General	v
Índice de Tablas.....	viii
Índice de Figuras	ix
Capítulo 1: Introducción	1
Hipótesis	6
Objetivos	6
Capítulo 2: Revisión Bibliográfica	7
2.1. Carne cultivada	7
2.2. Scaffolds, microestructura y biomateriales	8
2.3. Formación de músculo	11
2.3.1. Miogénesis.....	12
2.3.2. Fusión Celular	14
2.4. Análisis de expresión génica	16
2.4.1. Transcriptómica y los procesos musculares	17
Capítulo 3: Materiales y Métodos	20

3.1. Fabricación de scaffolds con técnica de solvent casting	20
3.2. Fabricación de scaffolds con técnica de electrospinning	20
3.3. Caracterización estructura de scaffolds	21
3.4. Acondicionamiento de scaffolds	22
3.5. Cultivo celular.....	22
3.6. Evaluación morfología celular.....	23
3.7. Ensayo de citotoxicidad in vitro	23
3.8. Crecimiento celular, consumo de glucosa y producción de lactato	24
3.9. Extracción de ARN	24
3.10. RT-qPCR.....	25
3.11. RNAseq.....	26
3.11.1 Preparación de librerías y secuenciación	26
3.11.2 Lectura de mapeo y análisis de datos	27
3.12. Inmunofluorescencia	28
Capítulo 4: Resultados	30
4.1 Desarrollo de scaffolds microestructurados a través de las técnicas de solvent casting y electrospinning, con biomateriales comestibles no derivados de mamíferos.....	30
4.1.1 Solvent Casting	30
4.1.2 Electrospinning	31
4.2 Determinación de scaffold óptimo para cultivo y diferenciación de células musculares C2C12.	33
4.2.1 Evaluación de citotoxicidad del material	33

4.2.2	Evaluación de la morfología celular sobre scaffold.....	34
4.2.2. 1	Scaffolds de Solvent Casting	34
4.2.2.2	Scaffolds de Electrospinning.....	37
4.2.2	Crecimiento celular y metabolismo	40
4.3	Estudio de la expresión de marcadores miogénicos (MyoD, miogenina y miosina de cadena pesada) y de proteínas partícipes de fusión (myomaker, myomixer y myoferlina) en etapas tempranas, medias y tardías de diferenciación, usando RT-qPCR.....	42
4.4	Identificación a través de análisis transcriptómico (RNA seq) la expresión diferencial de genes de las células C2C12, ante la presencia de microcanales, para proponer un modelo de expresión génica que contemple los procesos de miogénesis y fusión celular.....	47
4.4.1	Exploración del transcriptoma de células musculares al crecer en scaffolds ..	47
4.4.2	Respuesta transcripcional de las fibras musculares utilizando ontología genética y modelado de redes genéticas	56
4.4.2.1.	Deslizamiento del filamento	57
4.4.2.2.	Contracción muscular	57
4.4.2.3.	Organización sarcómero.....	58
Capítulo 5: Discusión		60
Capítulo 6: Conclusiones		65
Capítulo 7: Recomendaciones		67
Referencias		70
Productos		83

Índice de Tablas

Tabla 1: Genes y secuencias utilizadas para el desarrollo de partidores para RT-qPCR.....	26
Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la identificación de proteínas partícipes de los procesos de miogénesis y fusión celular.....	29
Tabla 3: Parámetros de crecimiento de cultivo celular en la fase de proliferación.....	41
Tabla 4: Cantidad de lecturas obtenidas en la secuenciación en los tres sistemas evaluados.	48
Tabla 5: Selección de los 20 genes más sobre y sub regulados en las tres comparaciones estudiadas.....	53
Tabla 6: Matriz de correlación de Pearson de las variables evaluadas.....	63

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema simplificado de fabricación de carne cultivada, donde el proceso comienza con una extracción de células en animales, a través de biopsia, las cuales luego serán cultivadas, donde experimentarán procesos de proliferación y diferenciación, comenzando con células satélites, luego mioblastos, miocitos y finalmente miofibras, las cuales luego formarán la carne y finalmente un producto alimenticio. Creado con Biorender.com.....	1
Figura 2: Representación esquemática de los métodos de fabricación de scaffolds utilizados. A: Solvent casting. B: Electrospinning.....	9
Figura 3: A: Progresión miogénica desde la activación de células satélite, pasando por las etapas de proliferación, diferenciación y fusión hasta llegar a la maduración celular con la obtención de miofibras. B: Perfil de expresión de moduladores claves del proceso miogénico (Schmidt et al., 2019)	13
Figura 4: Etapas del proceso de fusión de membrana. Primero ocurre un reconocimiento celular y un acercamiento de membrana, para luego continuar con la hemifusión de las membranas externas, lo que da paso a la formación de un poro de fusión y finalmente la expansión de este y mezcla del contenido citosólico (Petrany & Millay, 2019)	15
Figura 5: Imágenes de SEM de scaffolds fabricados con la técnica de solvent casting utilizando moldes microestructurados y lisos. Se observan vista transversal y de superficie.....	30
Figura 6: Imágenes de SEM de los scaffolds fabricados con la técnica de electrospinning utilizando colectores estáticos microestructurado y liso. Se muestran dos distintas magnificaciones para observar la superficie obtenida (200X) y el detalle de las nanofibras (1500X)	31
Figura 7: Gráficos de orientación de nanofibras de los scaffolds fabricados con la técnica de electrospinning con colector microestructurado (A) y liso (B).....	32
Figura 8: Ensayo de viabilidad celular utilizando la técnica de WST-1. Se evaluaron ambos scaffolds fabricados con las técnicas de solvent casting (SC) y electrospinning (ES), ambos con y sin microestructuras. Los tiempos de cultivo del ensayo fueron de 24 y 48 horas.....	34
Figura 9: Imágenes de fluorescencia de células C2C12 creciendo sobre control, scaffold liso y microestructurado, luego de 0, 3 y 7 días de diferenciación. En azul se muestran los núcleos teñidos con Hoechst y en rojo se observa el citoesqueleto de actina teñido con rodamin-faloidina. Las flechas blancas indican la direccionalidad de las fibras y los asteriscos muestran miofibras multinucleadas.....	35

Figura 10: Análisis de direccionalidad de miofibras al crecer sobre control (A) y scaffolds fabricados con la técnica de solvent casting liso (B) y microestructurado (C). En la columna derecha se observan los respectivos histogramas de direccionalidad donde A': Control, B': Liso y C': microestructura37

Figura 11: Células C2C12 creciendo sobre control plástico (A) y scaffold fabricados con la técnica de electrospinning utilizando colector liso (B) y microestructurado (C). En B se observan células alargadas y multinucleadas, destacadas con (*). Azul: núcleos teñidos con Hoechst. Rojo: Citoesqueleto de actina teñido con rodamina faloidina.....38

Figura 12: Análisis de direccionalidad de miofibras al crecer sobre control (A) y scaffolds fabricados con la técnica de electrospinning liso (B) y microestructurado (C). En la columna derecha se observan los respectivos histogramas de direccionalidad donde A': Control, B': Liso y C': microestructura39

Figura 13: Comportamiento celular en los distintos sistemas: control (●), liso (■) y microestructura (▲), donde se considera el crecimiento celular (A), consumo de glucosa (B) y producción de lactato (C). Se realizaron mediciones luego de 4, 24, 48 y 72 horas de crecimiento.....40

Figura 14: Expresión génica relativa de marcadores de fusión en los sistemas control (C), liso (L) y microestructura (M). Los valores de expresión relativa de los genes myomaker, myomixer y mioferlina se midieron a los 0, 3 y 7 días de diferenciación en tres condiciones. Los valores de expresión relativa se obtuvieron comparando directamente los niveles de expresión génica entre estas condiciones (L vs. C, M vs. C y M vs. L).43

Figura 15: Expresión génica relativa de marcadores de miogénesis en los sistemas control (C), liso (L) y microestructura (M). Los valores de expresión relativa de los genes myod, miogenina y miosina de cadena pesada se midieron a los 0, 3 y 7 días de diferenciación en tres condiciones. Los valores de expresión relativa se obtuvieron comparando directamente los niveles de expresión génica entre estas condiciones (L vs. C, M vs. C y M vs. L)44

Figura 16: Imágenes de inmunofluorescencia de cultivos celulares que muestran la expresión de proteínas durante la progresión miogénica. Azul, tinción de Hoechst; rojo, tinción de rodamina-faloidina; verde, marcador de interés (myod, mioferlina, myomaker, miogenina, myomixer y miosina de cadena pesada) con el fluoróforo Alexa Flour 488. Barra de escala de 50 µm.....45

Figura 17: Identificación de miosina de cadena pesada en células musculares creciendo en las situaciones de control (A), scaffold liso (B) y scaffold microestructurado (C). En verde se observan miofibras positivas para miosina de cadena pesada (Alexa Fluor 488) y en azul se observan los núcleos (Hoechst).....46

Figura 18: A: Análisis de agrupamiento jerárquico para los perfiles del transcriptoma de muestras de control, planas y microestructuradas. El mapa de calor presenta la abundancia

relativa media de los genes con diferentes colores (verde: baja abundancia; rojo: alta abundancia). B: Gráfico de puntuación de PCA de las muestras de control, planas y microestructuradas.....48

Figura 19: Gráficos de volcán que resaltan la mayoría de los genes expresados de manera diferencial ($\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$; valor p corregido por $\text{FDR} < 0,05$) para las tres comparaciones liso versus control, microestructurado versus control y microestructurado versus liso, respectivamente.....49

Figura 20: A: Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados por cada tipo de muestra. Los círculos de colores representan la cantidad de GDE para las comparaciones de liso versus control, microestructurado versus control y microestructurado versus liso respectivamente. Un total de 6321, 8154 y 1490 GDE se expresaron de manera diferencial ($\text{FC} > 1,5$; valor p corregido por $\text{FDR} < 0,05$) para liso versus control, microestructurado versus control y microestructurado versus liso respectivamente. B: Tabla con los 124 genes encontrados exclusivamente en la comparación de M vs. L, y sus respectivas categorías.....50

Figura 21: Análisis de enriquecimiento de términos GO de genes expresados diferencialmente encontrados en la comparación Microestructurado versus Liso, en la categoría de Proceso biológico.....56

Figura 22: Análisis de enriquecimiento de términos GO de genes expresados diferencialmente encontrados en la comparación microestructura versus liso, en la categoría de proceso biológico. A: Deslizamiento de filamentos musculares; B: Contracción de músculo esquelético y C: Organización de sarcómero.....58

Figura 23: Red de interacción de proteínas asociada los 366 genes expresados diferencialmente con $|\text{FC}| > 1,5$ y $\text{FDR} < 0,05$ en la comparación entre scaffolds microestructurados y lisos.....59

Figura 24: Análisis de componente principal donde se observan las variables evaluadas.....61

Figura 25: Análisis de agrupamiento jerárquico con los resultados de correlación.....62

Figura 26: Modelo esquemático del efecto de la microestructura de los scaffolds en la interacción de los genes de miogénesis y fusión celular. En (A) se muestra el efecto de los microcanales en la difusión de oxígeno, lo cual produce un aumento en la glicólisis que a su vez aumenta la producción de lactato, lo cual ha demostrado ser un factor que influencia la expresión de Myod. Además, se observa una baja en la expresión de mioferlina en la primera etapa de la miogénesis. En la etapa media de miogénesis (B) se observa la expresión de mioferlina y la relación entre la expresión de Myod y Miogenina, que se relaciona directamente con la expresión de myomaker, partícipe del proceso de fusión celular. Finalmente, en la etapa final de miogénesis se observa la miofibra ya formada por la fusión de los mioblastos, con la característica morfología alargada y multinucleada. También se observa que en esta etapa ocurrió expresión de miogenina y miomixer, cuya expresión se encuentra relacionada con la expresión de miosina de cadena pesada, indicador de formación de miofibra madura.....63

Figura 27: Imágenes de SEM de los scaffolds fabricados con la técnica de electrospinning utilizando colector rotatorio a 1000 y 3000 RPM. Se muestran dos distintas magnificaciones para observar la superficie obtenida (1000X) y el detalle de las nanofibras (5000X)68

Figura 28: Análisis de orientación de nanofibras en scaffolds fabricados con colector rotatorio a 3000 RPM y a 1000 RPM.....68

Figura 29: Cultivo de células musculares sobre scaffolds electrohildos fabricados con colector rotatorio. A: Células sobre scaffold alineado. A': Imagen de campo claro de scaffold alineado con células. B: Células sobre scaffold con nanofibras organizadas aleatoriamente. B': Imagen de campo claro de sobre scaffold con nanofibras organizadas aleatoriamente y con células...69

Capítulo 1

Introducción

Este trabajo se centra en la aplicación de la carne cultivada, un proceso que implica el cultivo de células animales para producir alimentos sin necesidad de sacrificar animales, limitándose a la extracción de células mediante biopsias (Bhat et al., 2017) (Fig. 1). La carne cultivada se presenta como una solución viable a los problemas de sostenibilidad y ética asociados con la crianza tradicional de animales para consumo. Estos problemas incluyen la extensa utilización de tierras, el elevado consumo de recursos hídricos para el mantenimiento de los animales, la emisión de gases contaminantes y, frecuentemente, condiciones de crianza que pueden resultar en maltrato animal (Nobre, 2022).

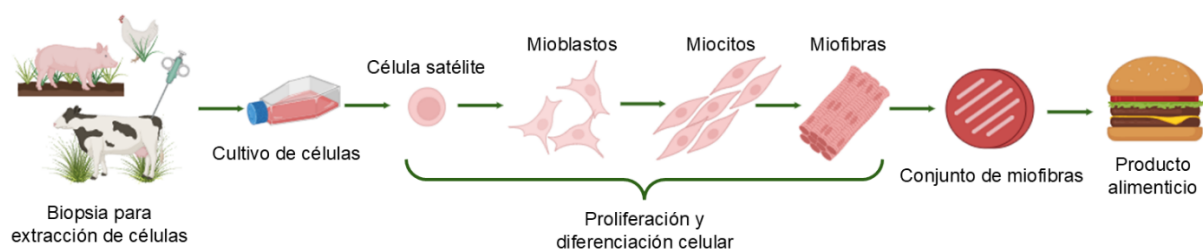


Figura 1: Esquema simplificado de fabricación de carne cultivada, donde el proceso comienza con una extracción de células en animales, a través de biopsia, las cuales luego serán cultivadas, donde experimentarán procesos de proliferación y diferenciación, comenzando con células satélites, luego mioblastos, miocitos y finalmente miofibras, las cuales luego formarán la carne y finalmente un producto alimenticio. Creado con Biorender.com.

En la industria de la carne cultivada existen ya más de 100 compañías operando en países como Estados Unidos, Israel y Países Bajos (Kirsch et al., 2023; Lee et al., 2024) . Sin embargo, aún persisten numerosos desafíos que deben abordarse para que la carne cultivada sea una opción accesible y viable. Entre estos desafíos se encuentran el desarrollo de nuevos medios de cultivo celulares libres de derivados animales, el diseño de biorreactores adecuados, el co-cultivo de diferentes tipos de células, como adipocitos y miocitos, la optimización del contenido nutricional del producto final y la mejora en la fabricación de scaffolds (Post et al., 2020; Broucke et al., 2023).

Esta tesis doctoral no pretende resolver todos los desafíos asociados con la producción de carne cultivada, sino que se enfoca en un aspecto fundamental: el desarrollo de scaffolds, que son cruciales para el cultivo de células musculares. En este trabajo, los scaffolds se han diseñado utilizando biomateriales comestibles no derivados de mamíferos y presentan microcanales alineados paralelamente. Esta microestructura permite que las células se alineen mientras crecen, promoviendo así la diferenciación celular y la formación de miofibras maduras que imitan el tejido muscular *in vivo*. Este enfoque específico ofrece un avance significativo en la creación de un entorno que favorece el desarrollo de tejido muscular.

Aunque existen estudios sobre scaffolds diseñados para la alineación celular (Fasciano et al., 2024), el impacto global en el transcriptoma y, específicamente, en los procesos de miogénesis y fusión celular sigue siendo poco comprendido. Por ello, esta tesis doctoral se centra en entender cómo el comportamiento de las células a nivel de expresión génica se ve afectado por el scaffold. Utilizamos técnicas de Next Generation Sequencing (NGS) para analizar los cambios en el transcriptoma completo y la técnica de RT-qPCR para evaluar cambios específicos en la expresión génica asociados con miogénesis y fusión celular. Este enfoque tiene como objetivo subrayar la importancia del desarrollo y la aplicación de nuestro scaffold en la industria de la carne cultivada.

Los scaffolds son matrices poliméricas que dan soporte a las células y les ayudan a seguir una estructura, generando de esta forma fibras musculares que asemejen al músculo *in vivo* (Kang et al., 2020). En este trabajo se han desarrollado dos tipos de scaffold con distintas técnicas de elaboración: solvent casting y electrospinning, ambas técnicas se caracterizan por ser sencillas, permitir el uso de biomateriales y escalamiento del proceso. También se utilizó una nueva mezcla de biomateriales que ha demostrado ser adecuada para el cultivo de células musculares. Entre los biomateriales usados se encuentra la gelatina de salmón, agarosa, alginato, glicerol, quitosano y poli- vinil alcohol (PVA). Además de fabricar estos scaffolds, se evaluó su efecto al cultivar células musculares en estos. Los principales elementos que se consideraron en la evaluación fueron morfología celular, viabilidad y expresión génica.

La evaluación de morfología celular se realiza a través de la siembra de células musculares en los scaffolds, y luego de distintos tiempos de crecimiento celular, se realiza una observación microscópica de este sistema, utilizando técnicas de fluorescencia. Esta observación nos da una primera impresión sobre cómo están creciendo las células en los scaffolds, siendo factores importantes que considerar en esta evaluación la morfología de núcleo y citoplasma, la distribución de los núcleos en las nuevas fibras musculares y la distribución de estas, poniendo

especial énfasis en la observación de la alineación de las fibras musculares, ya que es lo que se espera lograr con la fabricación de estos scaffolds microestructurados.

La viabilidad celular se refiere a la cantidad de células vivas que se pueden encontrar en nuestro sistema. Existen diversos factores que pueden afectar la viabilidad celular, como las condiciones ambientales del cultivo, la densidad celular, y las características del biomaterial que se utiliza para la fabricación del scaffold (Kamiloglu et al., 2020). En este trabajo se evaluó la viabilidad celular en relación con la citotoxicidad del material. Para la evaluación de citotoxicidad se usó el ensayo colorimétrico WST-1, el cual utiliza sales de tetrazolio que reaccionan con enzimas deshidrogenasas mitocondriales reduciéndolas a formazán, produciendo un compuesto coloreado (Berridge et al., 2005). Mientras más células vivas hay, mayor será la actividad de estas enzimas y la producción de compuesto coloreado. Este compuesto coloreado luego se mide en un lector de placas.

La expresión génica de las células creciendo en los scaffolds se evaluó desde dos distintos enfoques: focalizado y general. En el enfoque focalizado se eligieron 3 genes partícipes del proceso de miogénesis (myod, miogenina y miosina de cadena pesada) (Chal & Pourquié, 2017) y 3 de fusión celular (mioferlina, myomaker y myomixer) (Lehka & Rędowicz, 2020). La evaluación de la expresión génica se llevó a cabo utilizando la técnica de RT-qPCR. Este método consiste, en primer lugar, en la extracción del ARN de las células. Posteriormente, se identifican las secuencias específicas de los genes de interés mediante el uso de partidores diseñados con secuencias complementarias a los genes que se desean analizar. Estos partidores se unen a las secuencias objetivo en la muestra si los genes están presentes, permitiendo su amplificación. A medida que la cantidad de ADN amplificado aumenta, se puede detectar y cuantificar la expresión de los genes específicos en la muestra (Adams, 2020).

En el segundo enfoque, la evaluación general de la expresión génica, se realizó la extracción del ARN y se evaluó el transcriptoma completo de las células, identificando todos los genes que se estaban expresando, utilizando técnicas de secuenciación masiva de transcriptoma completo, como es la secuenciación Illumina (Satam et al., 2023). Esta técnica nos permite identificar todos los genes expresados y compararlos con un control, por lo que podemos identificar los genes diferencialmente expresados en las células creciendo con los scaffolds, en comparación con un control, que en este caso fue células creciendo en placas de cultivo, lo cual es el estándar de crecimiento. Con esta información se pueden realizar distintos análisis, por ejemplo, agrupando genes según su expresión o función, o predicción de la interacción de proteínas que se expresarían según los genes expresados. Este análisis nos

permitió identificar procesos celulares que estaban siendo beneficiados al usar los scaffolds fabricados, como, por ejemplo, contracción muscular, formación de sarcómeros, desarrollo muscular, entre otros.

La hipótesis trabajada en esta tesis doctoral indica que los scaffolds fabricados con microcanales permiten la alineación celular, facilitando de esta forma los procesos de miogénesis y fusión celular. Para probar esta hipótesis se planteó el objetivo de fabricar un scaffold que promueva la alineación celular y evaluar el efecto de este a nivel celular y de expresión génica, con relación a los procesos de miogénesis y fusión celular.

Para alcanzar el objetivo de esta tesis, se desarrollaron scaffolds microestructurados mediante las técnicas de solvent casting y electrospinning, utilizando biomateriales comestibles no derivados de mamíferos. En la fabricación de los scaffolds se consideraron factores como el uso de biomateriales comestibles, la obtención de la estructura deseada de microcanales y la facilidad de manipulación. Como resultado, ambos tipos de andamios cumplían con la estructura de microcanales requerida. Sin embargo, los andamios producidos mediante solvent casting resultaron ser más fáciles de manejar en comparación con los elaborados por electrospinning. Esto se debe a que los andamios fabricados con electrospinning presentaban un grosor considerablemente menor (aproximadamente 20 μm), lo que dificultaba su manipulación.

Luego, con el fin de determinar el scaffold óptimo para cultivo y diferenciación de células musculares C2C12, se realizó una evaluación morfológica y de viabilidad de las células al crecer en el sistema. En cuanto a la evaluación morfológica, se observó que las células en ambos tipos de scaffolds cumplían con los criterios deseados para núcleo y citoplasma. Sin embargo, la alineación celular paralela a los microcanales solo se logró en los scaffolds fabricados mediante solvent casting. En contraste, los scaffolds fabricados con electrospinning mostraron una alineación celular perpendicular a los microcanales. Referente a la viabilidad celular, ambos sistemas demostraron una viabilidad superior al 70%, lo que indica que los scaffolds no son citotóxicos y son adecuados para el crecimiento celular. Basado en estos resultados, el scaffold fabricado con solvent casting se seleccionó como el más adecuado para el desarrollo de células musculares y su alineamiento, por lo que el resto de esta tesis se desarrolló exclusivamente en este sistema.

Por último, se evaluó el efecto de los microcanales sobre la expresión génica de los procesos de miogénesis y fusión, y la expresión global del transcriptoma. Este objetivo se realizó

evaluando la expresión de tres genes involucrados en los procesos de miogénesis y tres genes asociados con la fusión celular, utilizando la técnica de RT-qPCR. Para validar estos resultados, se empleó la técnica de inmunofluorescencia para observar la expresión de las proteínas correspondientes a los genes analizados. Finalmente, se realizó una secuenciación del transcriptoma completo para identificar la expresión diferencial de genes, revelando los distintos procesos celulares que se ven favorecidos por el uso del scaffold desarrollado en esta tesis.

Finalmente, esta tesis doctoral ha logrado un aporte en el campo de la carne cultivada mediante la fabricación de un scaffold utilizando la técnica de solvent casting y el entendimiento de sus efectos en los procesos celulares. Este scaffold, construido con biomateriales comestibles, presenta una estructura de microcanales paralelos que ha demostrado ser eficaz para alinear las células musculares, facilitando así los procesos críticos de miogénesis y fusión celular.

El scaffold desarrollado no solo alinea las células de manera eficiente, sino que también promueve de manera efectiva los procesos de diferenciación y fusión de células musculares, que son esenciales para la formación de tejido muscular funcional. A través de un análisis exhaustivo, se han identificado los procesos celulares específicos que se benefician del uso de este scaffold, subrayando su impacto positivo en la producción de carne cultivada.

Este scaffold se destaca no solo por su capacidad para facilitar el crecimiento y desarrollo celular, sino también por su manufactura sencilla y su fácil manipulación. Al estar fabricado con materiales comestibles, biocompatibles y biodegradables, cumple con los requisitos de la industria de la carne cultivada, ofreciendo una solución práctica y segura. Además, el scaffold ha demostrado no presentar citotoxicidad, lo que asegura un entorno saludable para el crecimiento celular. En resumen, este scaffold representa una herramienta valiosa para la fabricación de carne cultivada, combinando materiales accesibles, técnicas de fabricación eficientes y resultados que favorecen los procesos de miogénesis y fusión celular.

Hipótesis

Los mioblastos cultivados sobre scaffolds comestibles son capaces de interaccionar ante una superficie con microcanales paralelos, promoviendo cambios morfológicos, formación de miofibras y modificación de la expresión génica tanto a nivel global como en marcadores miogénicos y proteínas de fusión.

Objetivos

Objetivo General

Determinar cómo la interacción entre microestructura y células musculares influye en la morfología celular, expresión génica global y de procesos específicos.

Objetivos Específicos:

1. Desarrollar scaffolds microestructurados a través de las técnicas de electrospinning y solvent casting, con biomateriales comestibles no derivados de mamíferos.
2. Determinar el scaffold óptimo para cultivo y diferenciación de células musculares C2C12.
3. Evaluar el efecto de los microcanales sobre la expresión génica global de las células y de los procesos de miogénesis y fusión.

Capítulo 2

Revisión Bibliográfica

2.1. Carne cultivada

La producción de carne cultivada es la fabricación de carne a partir de células animales, que imiten la carne tradicional de consumo, pero sin criar ni matar animales (Bhat et al., 2017). Es un hecho que el consumo de carne ha ido en aumento, triplicándose en los últimos cuarenta años y solo en la última década ha aumentado en un 20%, y se espera que esta tendencia continúe. Lo anterior tiene un profundo impacto ambiental, ya que para satisfacer la demanda de carne es necesario cada vez criar más animales, lo que se traduce en aproximadamente un 30% de la superficie del planeta que actualmente está destinada a la crianza de animales para consumo, y casi un 70% de la superficie de agricultura que está destinada a la alimentación de estos animales, principalmente con los cultivos de soya. Tanto la crianza de animales para cultivo, como la deforestación sin la cual lo anterior no sería posible, conllevan serios problemas ambientales, como la pérdida de biodiversidad de especies, generación de gases de invernadero (producto de la digestión de los animales) y estrés hídrico (Stoll-Kleemann & O'Riordan, 2015). Es por esto, por lo que la fabricación de carne cultivada es una alternativa a los problemas asociados a la producción de carne, y por lo cual se ha estado desarrollando esta idea en los últimos años. El desarrollo de carne cultivada puede ser realizado gracias a los conocimientos de la ingeniería de tejidos, cuyas bases fundamentales son tres: 1) células, que den origen a un tejido, en este caso mioblastos que se fusionarán para formar miofibras y luego músculo; 2) scaffolds, que actúen como matriz extracelular para imitar las condiciones de un tejido in vivo; y finalmente, 3) moléculas bioactivas que guíen los procesos celulares (Bhat & Bhat, 2011).

En el año 2013 se preparó en Londres la primera hamburguesa fabricada in vitro, con células obtenidas de vaca, las cuales proliferaron durante 7-8 semanas, para luego diferenciarse y formar miofibras (células musculares alargadas multinucleadas) que se cultivaron luego de 3 semanas. Para esta primera prueba de carne cultivada se fabricó una hamburguesa de 85 gramos de carne, para la cual se utilizaron aproximadamente 10000 miofibras y su costo de producción fue de más de 330000 dólares (Zaraska, 2013; Post, 2014).

Mucho se ha avanzado desde la primera hamburguesa presentada al público en el año 2013, y hasta la fecha son más de 100 compañías las que se dedican a la producción de carne cultivada a nivel global (Kirsch et al., 2023). Algunas de estas compañías que destacan son: Mosa Meat, fundada por Mark Post, el científico que preparó la primera hamburguesa fabricada con la tecnología de carne cultivada; Upside Foods, que en 2017 presentó la primera carne cultivada de pollo, siendo la primera compañía en obtener aprobación de la FDA de Estados Unidos y que en el año 2023 comenzó la venta de productos de carne cultivada de pollo; y Aleph Farms, compañía israelí que en el año 2018 fabricó el primer filete utilizando tecnología de bio- impresión 3D y sin utilizar manipulación genética (Lee et al., 2024).

Para que la producción de carne cultivado pueda ser una realidad accesible, es necesario reducir los costos, optimizar los procesos y escalar los cultivos para producir grandes cantidades en biorreactores, lo que aun representa uno de los mayores desafíos para la producción de esta industria. Sin embargo, el futuro de la carne cultivada es prometedor, y se posiciona como una alternativa amigable con el medio ambiente, libre de crueldad y saludable para la alimentación (Bhat et al., 2019).

En este proyecto se trabajará en el desarrollo de carne cultivada, utilizando scaffolds fabricados con biomateriales comestibles no derivados de mamíferos, para ser consecuentes con la idea de no matar animales. Además, se utilizarán scaffolds con distintas microestructuras donde crecerán las células, con el fin de poder optimizar el proceso de fusión celular para la formación de miofibras, y de esta forma optimizar a su vez el proceso de fabricación de carne cultivada.

2.2. Scaffolds, microestructura y biomateriales

Los scaffolds son matrices tridimensionales, generalmente porosas, biodegradables y biocompatibles, que sirven de soporte mecánico para las células y que aportan estímulos físicos y bioquímicos que permiten la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular (Loh & Choong, 2013). Debido a la compleja estructura del músculo esquelético, es necesario el uso de scaffolds para poder orientar las células hacia un crecimiento lo más parecido in vivo. Para cultivar células musculares se pueden utilizar scaffolds fabricados con técnicas convencionales (freeze drying, gas foaming y solvent casting) (Loh & Choong, 2013) y técnicas avanzadas, como electrospinning y bioimpresión 3D (Kang et al., 2020). En este trabajo se utilizará la técnica convencional de solvent casting y la técnica avanzada de electrospinning.

Para solvent casting se utiliza una solución de polímero con algún solvente volátil y un agente polimérico, los cuales se verterán en un molde donde el solvente se evaporará, dejando así un scaffold de estructura polimérica (Fig. 2A). En cambio, la técnica de electrospinning consiste en el uso de una jeringa cargada con la solución de polímero, por la cual pasará un campo eléctrico que en conjunto con una bomba de jeringa harán que la solución de polímero salga eyectada hacia un colector, el cual también tendrá corriente eléctrica, donde se irán depositando fibras de polímero formando un scaffold entramado (Fig. 2B) (P. Zhao et al., 2018).

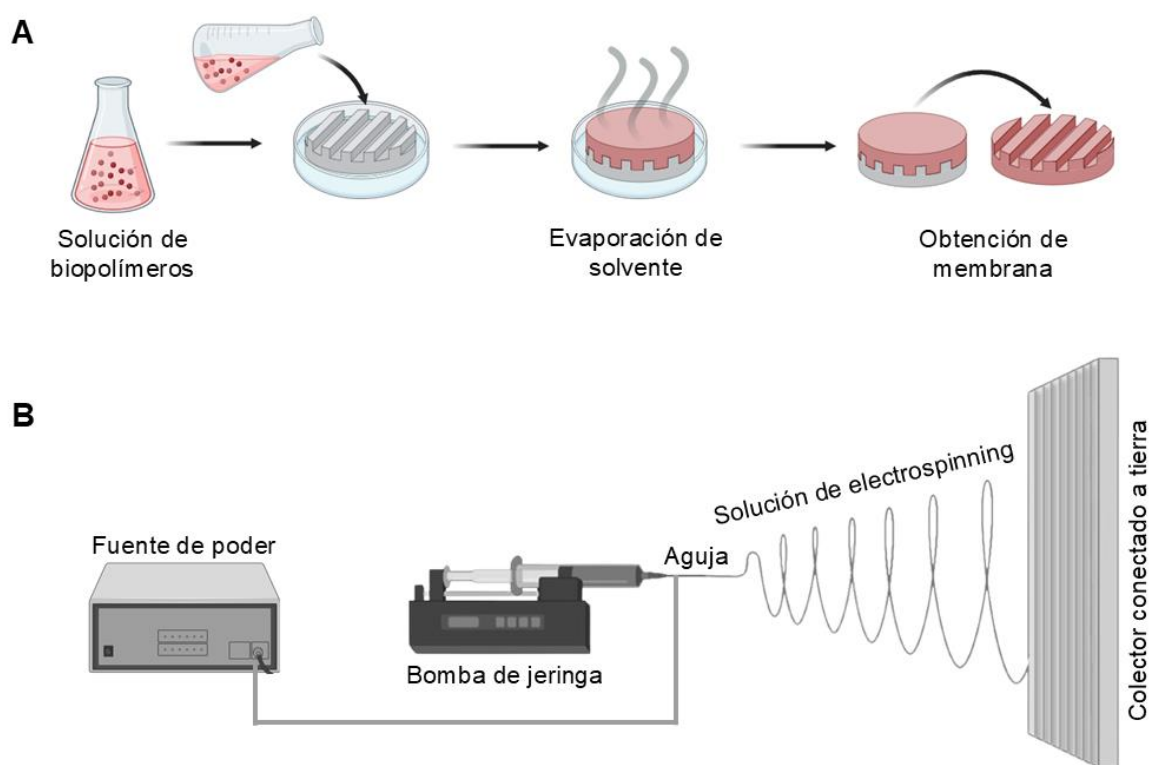


Figura 2: Representación esquemática de los métodos de fabricación de scaffolds utilizados. A: Solvent casting. B: Electrospinning. Creado con BioRender.com

Los scaffolds pueden ser desarrollados con distintos biomateriales que aporten cualidades que mejoren el cultivo de las células. Ya que la idea de generar carne in vitro es para evitar matar animales para el consumo, en este trabajo se utilizarán biomateriales comestibles para la fabricación de scaffolds y que no sean derivados de mamíferos, como la gelatina de pez, alginato, agarosa y glicerol (Orellana et al., 2020).

Una de las características de los scaffolds que los hacen adecuados para el cultivo de células y la creación de tejidos, es que representan un cultivo en tres dimensiones, diferente a cultivar

células en monocapa, que, si bien tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse, no alcanzan las condiciones más similares al tejido in vivo, ya que no presentan una matriz extracelular. El cultivo en tres dimensiones permite además utilizar distintas microestructuras en los scaffolds, para que de esta forma el sistema sea lo más similar posible a la estructura que aporta la matriz extracelular (Khademhosseini et al., 2006).

Varios estudios se han realizado demostrando buenos resultados al usar microcanales en superficie de scaffolds para el cultivo de células musculares. Uno de estos estudios, realizado en superficie de vidrio y con microcanales, resultó en la formación de miotubos orientados en paralelo de manera parecida a la organización que se esperaría en músculo esquelético (Yamamoto et al., 2008). Otro estudio en el cual se utilizó scaffolds de gelatina e hidrogel con microcanales mostró una aceleración en el proceso de maduración de miotubos, aumentando la expresión de genes relacionados con la formación y organización de sarcómeros (unidad funcional del músculo), además, se observó que los miotubos formados en los microcanales tenían mayor longitud y menor posibilidad de ramificarse al momento de la fusión, lo cual podría beneficiar la maduración temprana de los miotubos, ya que la ramificación de miotubos es un fenómeno que no se observa in vivo y por lo tanto no es deseable para el cultivo (Denes et al., 2019).

En cuanto a la fabricación de los microcanales y sus características, se ha reportado que mioblastos sembrados en microcanales de aproximadamente 70 μm de ancho, en scaffolds fabricados por solvent casting, resultan en células con morfología similar a la de miofibras, luego de una semana de diferenciación (Acevedo et al., 2018). En cambio, microcanales de 70-20 nm realizados en scaffolds fabricados con electrospinning, han demostrado crecimientos de mioblastos en paralelo, con miotubos alineados y alta expresión de miosina de cadena pesada, lo que indica maduración terminal de miotubos (Jana & Zhang, 2013). En trabajos previos de Orellana et al., (2020), se fabricó un scaffold con biomateriales no derivados de mamíferos, donde se utilizó un molde de acrílico con surcos para fabricar los microcanales en el scaffold, con un ancho de entre 70-90 μm . Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que los microcanales promueven el alineamiento de las células, la formación de estructuras similares a miotubos y la expresión de marcadores de diferenciación como desmina, miogenina y miosina de cadena pesada, demostrando que los microcanales favorecen el proceso de miogénesis.

Una de las características fundamentales de los scaffolds utilizados para la carne cultivada es que éstos deben ser comestibles, de lo contrario, debería eliminarse el scaffold y solo aislar

las miofibras formadas para consumo, lo cual sería un proceso innecesario que tomaría más tiempo y podría dañar las células. Los biomateriales comestibles utilizados en este proyecto son gelatina de salmón, alginato, agarosa y glicerol, para la fabricación de solvent casting, y poly vinil alcohol (PVA), gelatina de salmón y quitosano para electrospinning.

La gelatina de salmón actúa como una macromolécula funcional que contiene secuencias de RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), favoreciendo la adhesión y proliferación celular (Enrione et al., 2018). Este componente presenta ventajas significativas sobre la gelatina de mamífero, como menor riesgo de transmisión de enfermedades y mayor aceptación cultural global (Al-Nimry et al., 2021). Por otro lado, el alginato, un polisacárido aniónico compuesto de β -D- ácido manurónico y α -L- ácido gulurónico, forma geles al ser entrecruzado con iones divalentes o macromoléculas cargadas positivamente (Bishnoi et al., 2022), mientras que la agarosa, otro polisacárido lineal compuesto de compuesto por unidades repetidas de β -D-galactosa unida a 1,3 y 3,6-anhidro- α -L-galactosa unida a 1,4 alternativamente, ofrece un gran poder gelificante, reversibilidad térmica y capacidad para formar películas (Ghasemzadeh et al., 2021). La inclusión de glicerol en la formulación, siendo un plastificante, contribuye a ajustar las propiedades mecánicas y de textura del scaffold, facilitando así el desarrollo de una matriz manejable para la producción de carne cultivada.

PVA es un polímero sintético caracterizado por ser biocompatible y biodegradable, teniendo además las características adecuadas de elasticidad, viscosidad y tensión superficial, que lo hacen apropiado para su uso en electrospinning (Taborda et al., 2023). Finalmente, quitosano es un polisacárido derivado de quitina que ha sido ampliamente en la ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad (Ribeiro et al., 2017).

2.3. Formación de músculo

Para la producción de carne in vitro, el cultivo de células musculares tiene como propósito la formación de miofibras, que resultan de la fusión de mioblastos y dan origen a células alargadas y multinucleadas. Un conjunto de miofibras recibe el nombre de fascículos y finalmente, un conjunto de fascículos da origen al músculo propiamente tal (Kierszenbaum A, 2008). Para que los mioblastos puedan formar miofibras maduras y funcionales, deben iniciar el proceso de miogénesis, durante el cual estas células comienzan a diferenciarse y cambian su forma (de circulares o estrelladas y uninucleadas, a una forma más alargada), para luego fusionarse entre sí y finalmente formar las miofibras multinucleadas (Ganassi et al., 2018). La

miogénesis está regulada principalmente por cuatro factores reguladores miogénicos: MYF5, MyoD, miogenina y MRF4 (Chal & Pourquié, 2017).

Una de las etapas cruciales de la miogénesis es la fusión celular, que resulta en la formación de las miofibras multinucleadas. Para que comience el proceso de fusión, primero las células deben adquirir una forma alargada, luego deben ser capaces de reconocer y adherirse a las células competentes, es decir, aquellas que ya han comenzado el proceso de miogénesis y que, por lo tanto, son capaces de fusionarse. Tras estos eventos, comienza la fusión de membranas, que finalmente termina con la formación y expansión de poro de fusión (Lehka & Rędowicz, 2020).

Algunas de las proteínas que participan de la fusión de membrana y formación de poro de fusión son myomaker y myomixer, respectivamente, las cuales son fusógenos exclusivamente encontradas en células musculares. Se ha descrito que la expresión de estas proteínas está regulada por los factores reguladores miogénicos MyoD y Miogenina (Sampath et al., 2018), lo que indica una conexión entre los procesos de miogénesis y fusión celular. Por lo tanto, en este trabajo se propone estudiar estos dos procesos en conjunto, particularmente cuando las células han sido expuestas a scaffolds con superficie de microcanales, ya que, como ya se describió anteriormente, estos scaffolds promueven la miogénesis, los cambios morfológicos y la formación de miofibras.

2.3.1. Miogénesis

Existen distintos enfoques para estudiar la miogénesis, tales como en la etapa de desarrollo embrionaria, en la fase post natal, durante la regeneración muscular, entre otros. El proceso de miogénesis es complejo y está altamente regulado e interconectado con diversos componentes, como vías de señalización, factores de transcripción y condiciones ambientales (Chal & Pourquié, 2017). Brevemente, la miogénesis comienza con la activación de células satélites en mioblastos, con un aumento de la expresión de Pax7 y MyoD, marcador temprano de diferenciación muscular, para luego diferenciarse en miocitos, con un aumento de miogenina, para luego fusionarse y de esta forma obtener miotubos y finalmente, miofibras maduras que expresan el marcador tardío de diferenciación, miosina de cadena pesada (Fig. 3) (Schmidt et al., 2019).

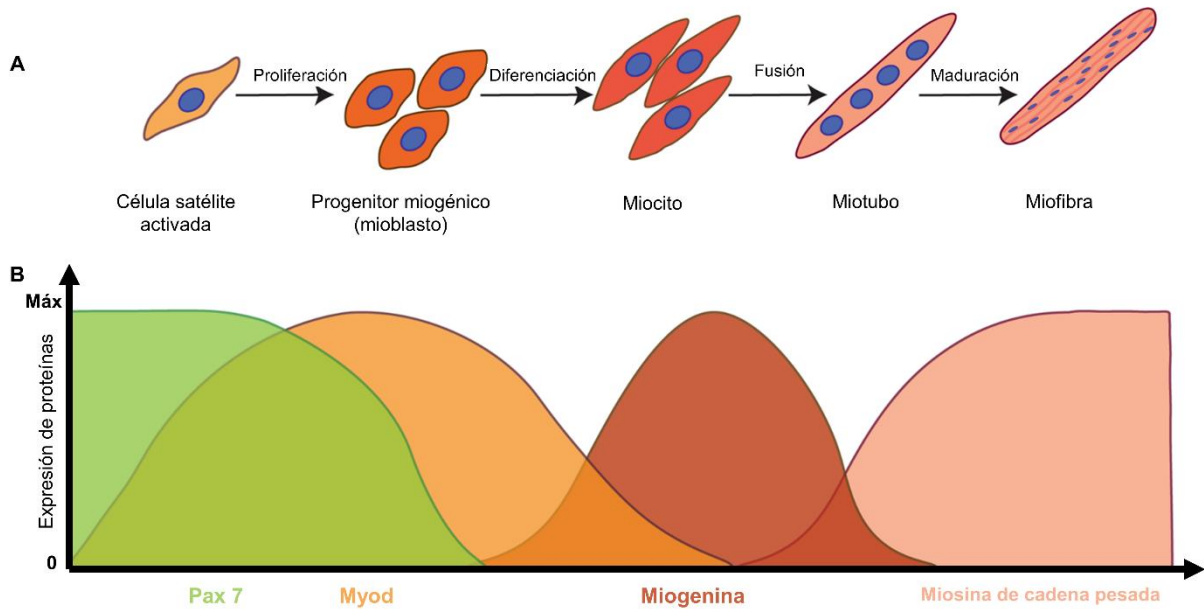


Figura 3: A: Progresión miogénica desde la activación de células satélite, pasando por las etapas de proliferación, diferenciación y fusión hasta llegar a la maduración celular con la obtención de miofibras. B: Perfil de expresión de moduladores claves del proceso miogénico (Modificada de Schmidt et al., 2019).

En este caso nos enfocaremos en el estudio de la miogénesis en cultivo celular in vitro. La línea celular más utilizada para estudiar miogénesis in vitro es C2C12, una línea de mioblastos de ratón común (*mus musculus*), derivados del clon C2 (Burattini et al., 2004). Las células C2C12 en etapa proliferativa tienen una forma circular o estrellada y son mononucleadas. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse al eliminar o reducir el suero del cultivo o al alcanzar la confluencia (Veliça & Bunce, 2011). Existen muchas vías de señalización y factores de transcripción involucrados en el proceso de diferenciación, pero los más estudiados son los factores reguladores miogénicos (FRM): Myf5, MyoD, Miogenina y MRF4.

Los FRM se encuentran exclusivamente en células de linaje miogénico y tienen la capacidad de inducir la miogénesis y diferenciación celular. Los cuatro FRM son factores de transcripción que comparten un dominio básico hélice-bucle-hélice, lo que les permite unirse a las secuencias promotoras E-box en el ADN, activando así la transcripción de ciertos genes (Zammit, 2017). Inicialmente, se consideraron genéticamente redundantes debido a la superposición de sus patrones de expresión durante la miogénesis, sin embargo, han demostrado tener funciones distintas. Myf5 y MyoD se encuentran en altas cantidades durante

las etapas de proliferación y diferenciación temprana, mientras que miogenina y MRF4 se encuentran en etapas de diferenciación intermedia y tardía (Asfour et al., 2018). Myf5 promueve la proliferación de los mioblastos, y su concentración disminuye cuando se retira el suero de cultivo (Hernández-Hernández et al., 2017). MyoD participa en el fin del ciclo celular proliferativo y, por ende, el inicio de la diferenciación (Berkes & Tapscott, 2005). Miogenina promueve la formación de miotubos y la síntesis de proteínas contráctiles musculares (Ganassi et al., 2018). Finalmente, MRF4 participa en la maduración y diferenciación terminal de los miotubos (Zammit, 2017). Otra proteína que se utiliza regularmente como marcador miogénico de diferenciación es miosina de cadena pesada, la cual es parte fundamental de la maquinaria de contracción muscular y se utiliza como marcador de diferenciación terminal y maduración de miotubos (Pette & Staron, 2000).

En esta tesis doctoral, se realizó un análisis de la expresión génica y la identificación de proteínas para los marcadores miogénicos MyoD, miogenina y miosina de cadena pesada, los cuales corresponden a las fases temprana, intermedia y tardía de la diferenciación muscular, respectivamente. Al evaluar en detalle la expresión de estos marcadores, se obtendrá una comprensión precisa del impacto que la microestructura de los scaffolds tiene en la diferenciación de las células musculares. Este enfoque permitirá no solo una mayor claridad sobre cómo las condiciones del cultivo influyen en el desarrollo muscular, sino que también proporcionará información valiosa para la optimización del diseño de scaffolds, mejorando así la eficacia en la ingeniería de tejidos musculares y la fabricación de carne cultivada.

2.3.2. Fusión Celular

El proceso de fusión de membranas celulares permite la organización celular y su mantenimiento, participando en el tráfico vesicular, intercambio de componentes intra y extracelulares, fusión de gametos, mantención de retículo endoplasmático y mitocondrias, entre otros (Brukman et al., 2019). Existen distintos tipos de fusión de membranas, como por ejemplo virus- célula, vesículas- célula y célula- célula, siendo este último el tipo de fusión de membranas menos estudiado. Solo algunos tipos de células tienen la capacidad de fusionarse, como por ejemplo macrófagos, gametos, osteoclastos y células musculares (Lehka & Rędowicz, 2020).

Para que la fusión sea posible es necesaria la migración, reconocimiento y adhesión de mioblastos, para luego comenzar el proceso de hemifusión, correspondiente a la mezcla de lípidos de membrana, luego la formación de poro de fusión, donde se mezcla el contenido

celular, y finalmente, la etapa tardía de fusión, que consiste en la formación de sincitios (Figura 4) (Sampath et al., 2018, Lehka & Rędownicz, 2020).

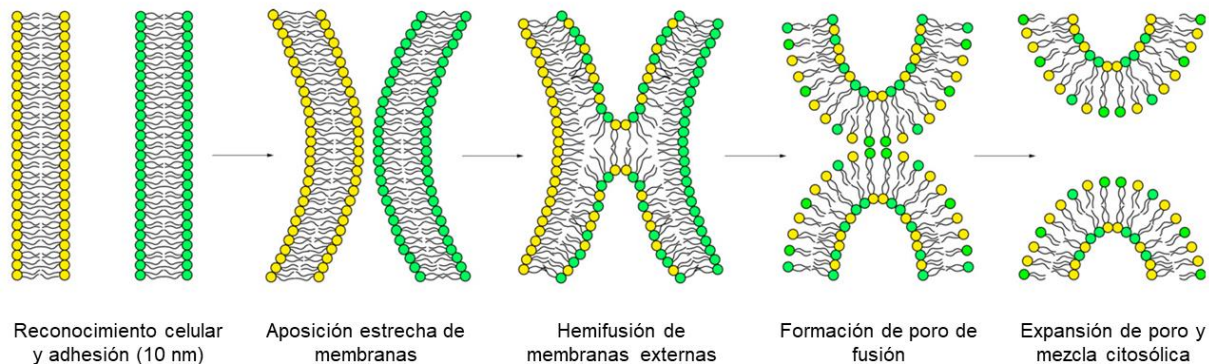


Figura 4: Etapas del proceso de fusión de membrana. Primero ocurre un reconocimiento celular y un acercamiento de membrana, para luego continuar con la hemifusión de las membranas externas, lo que da paso a la formación de un poro de fusión y finalmente la expansión de este y mezcla del contenido citosólico (Modificado de Petrany & Millay, 2019).

Existen distintas proteínas que se han identificado como partícipes de la fusión de mioblastos, sin embargo, la función de estas aún no está del todo descrita, y la información de la que se dispone hasta ahora es, en algunos casos, contradictoria. A continuación, se describirán tres proteínas que han sido identificadas como partícipes de la fusión de mioblastos y serán motivo de estudio de este trabajo: myomaker, myomixer y myoferlina.

Myomaker es una proteína de membrana específica del linaje muscular que se expresa en la superficie de los mioblastos. Fue por primera vez identificada en el año 2013 por Millay y colaboradores, quienes descubrieron que esta proteína tenía patrones de expresión similares a los de miogenina, es decir, alcanzaba su pick durante la etapa de formación de miofibras y una vez completado el proceso, sus niveles de expresión decaían (Millay et al., 2013). Se demostró luego que myomaker actúa específicamente en la etapa de hemifusión de mioblastos (Leikina et al., 2018). Además, sus estudios demostraron que la ausencia de myomaker en ratones resultaba en la muerte de estos, y una sobreexpresión de myomaker promovía el proceso de formación de miotubos (Millay et al., 2013).

Otra proteína que participa en la fusión de mioblastos es myomixer, a veces también referida como myomerger o minion. Myomixer es un micropéptido de 84 aminoácidos que es

encontrado, al igual que myomaker, exclusivamente en células musculares y, además, tiene la capacidad de inducir actividad fusogénica en conjunto con myomaker, en células sin actividad fusogénica, como fibroblastos (Bi et al., 2017; Quinn et al., 2017; Zhang et al., 2017). Se ha demostrado que myomixer participa en la etapa de formación de poros de fusión en mioblastos (Leikina et al., 2018). Otro hallazgo interesante da cuenta que en ausencia de myomixer en cultivo de células C2C12 no ocurre la fusión de los mioblastos, sin embargo, no se alteran los marcadores de diferenciación MyoD, miogenina ni miosina de cadena pesada, lo cual indica que el bloqueo del proceso de fusión puede ser independiente de la diferenciación (Bi et al., 2017).

Finalmente, myoferlina es una proteína de la familia de las ferlinas que, a diferencia de myomaker y myomixer, no es específica de músculo esquelético, sino que también se puede encontrar en otros tejidos como músculo cardíaco, células inmunes, endoteliales y de pulmón. Esta proteína de 230kD cuenta con un dominio C2 que le permite interactuar con Ca^{+2} (Posey et al., 2011). Myoferlina se encuentra altamente expresada en mioblastos en etapa temprana de diferenciación y pre- fusión. Una vez que comienza la fusión, myoferlina se encuentra en abundantes cantidades en las zonas de contacto de las membranas de los mioblastos que se van a fusionar. Al terminar la fusión, la expresión de mioferlina desciende (Zhu et al., 2019). Además, se ha descrito que mioferlina aumenta su expresión cuando se requiere la regeneración muscular, pero su función exacta en el proceso de fusión aún no se conoce (Davis et al., 2000).

En este trabajo, se llevó a cabo una evaluación de la expresión de genes que codifican las proteínas clave en el proceso de fusión celular, utilizando técnicas avanzadas como RT-qPCR e inmunofluorescencia. Esta evaluación se realizó en paralelo con el análisis de los marcadores miogénicos, permitiendo una correlación detallada entre la expresión génica de ambos procesos (Bezjak, Orellana, Valdés, et al., 2024). Este enfoque no solo proporciona una visión más clara de cómo los procesos de fusión y diferenciación muscular están interrelacionados, sino que también destaca la importancia de esta conexión en la regulación de la miogénesis. Al estudiar estas interacciones, se obtiene una comprensión más profunda de los mecanismos que subyacen en el desarrollo muscular, lo que es crucial para avanzar en el diseño y optimización de scaffolds para la fabricación de carne cultivada.

2.4. Análisis de expresión génica

El dogma central de la biología molecular plantea que los genes se expresan a través de una molécula intermediaria llamada ARN, que a su vez es la encargada de producir proteínas que realizarán las funciones celulares. El entendimiento de este proceso ha sido clave para elucidar los mecanismos de funciones celulares, así como también procesos patológicos (Segundo-Val & Sanz-Lozano, 2016). Para lograr este entendimiento, las herramientas transcriptómicas tienen las funciones de identificar y catalogar los distintos tipos de transcritos, determinar la estructura transcripcional de los genes y cuantificar los cambios en los niveles de expresión de transcritos durante distintas etapas o condiciones (Z. Wang et al., 2009). Para los estudios de la expresión génica existen distintos métodos, siendo los más utilizados qPCR, microarrays y secuenciación de ARN (RNA-seq).

La técnica de qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) amplifica secuencias específicas de ADN obteniendo múltiples copias, las que luego pueden ser detectadas y cuantificadas simultáneamente a través de fluorescencia. Esta técnica permite identificar genes de interés con alta precisión, sin embargo, no permite la obtención de información sobre la expresión de una gran cantidad de genes (Heid et al., 1996).

Con los microarray se realiza la identificación de genes por complementariedad de bases, donde se tienen miles de secuencias de ADN inmovilizadas en una superficie y por hibridación se realiza la identificación de la expresión génica, detectada por fluorescencia (Schena et al., 1995). Esta técnica permite una mayor detección de genes, sin embargo, esto se limita a la cantidad de genes conocidos en el array.

La técnica de RNA-seq entrega una visión global del transcriptoma, donde se identifican todos los genes que se están expresando. Esta es una técnica de alto rendimiento que permite explorar el transcriptoma de las células en distintos sistemas y no depende de las secuencias genómicas ya conocidas (Z. Wang et al., 2009).

Para identificar la expresión génica de las células musculares creciendo en los scaffolds, se utilizó la técnica de qPCR para la identificación de genes conocidos de los procesos de interés para esta tesis, como lo son miogénesis y fusión celular, identificando myod, miogenina y miosina de cadena pesada, como genes partícipes del proceso de miogénesis; y mioferlina, myomaker y myomixer, como genes partícipes del proceso de fusión. Además, también se realizó una identificación exploratoria del transcriptoma de las células creciendo en el sistema de scaffolds, con la técnica de RNA-seq.

2.4.1. Transcriptómica y los procesos musculares

En el caso de desarrollo del músculo, la regulación transcriptómica juega un rol importantísimo, guiando todas las etapas de la miogénesis. Al ser la miogénesis un proceso tan complejo, las células que la experimentan pasan por intensos cambios en su transcriptoma, el primero de aquellos es el silenciamiento de los genes relacionados con la proliferación y ciclo celular, los cuales son silenciados de manera permanente, ya que cuando se ha dado inicio al proceso de diferenciación, las células musculares no vuelven a proliferar (Blais, 2015).

Uno de los primeros trabajos que estudiaron el proceso de miogénesis a través de análisis transcriptómicos fue llevado a cabo por Moran et al., en el año 2002, en el cual utilizaron microarrays para caracterizar los cambios globales en el patrón de expresión de genes durante el proceso de proliferación y diferenciación en células C2C12, resultando en la expresión diferencial de 629 secuencias entre estas dos etapas, donde se pueden destacar genes involucrados en la adhesión celular, contracción muscular, metabolismo celular y adhesión a matriz extracelular. Luego, con el avance de la tecnología, el desarrollo de RNA-seq se ha vuelto una herramienta indispensable en el análisis de los transcriptomas, debido a su alta sensibilidad, calidad de los datos generados, mayor visión del transcriptoma y menor sesgo en los resultados, comparado con los obtenidos con microarrays (Stark et al., 2019). Además, con RNA-seq se pueden identificar nuevos ARN no codificantes, transcritos que no estén anotados y splicing alternativos, lo que permite generar nuevos conocimientos en cuanto a temas de regulación molecular en miogénesis y en diversos procesos biológicos (Blais, 2015).

En cuanto al proceso de fusión de mioblastos y el análisis transcriptómico, hasta ahora no se han hecho estudios en células C2C12 que sean específicos para estudio de fusión, pero sí se ha investigado la fusión de mioblastos en distintos animales, como ovejas (Wei et al., 2014), moscas (Spletter et al., 2018) y gallinas (T. Li et al., 2018). Estudios de transcriptoma en células C2C12 se han enfocado en otras áreas como la maduración de miotubos (Denes et al., 2019) o el descubrimiento de nuevos miRNA y su función en la diferenciación (Bjorkman et al., 2019) (Hou et al., 2018).

En esta tesis doctoral, se llevó a cabo la evaluación exhaustiva del transcriptoma completo utilizando la técnica de secuenciación masiva de Illumina. Los resultados obtenidos revelaron distintos patrones de expresión génica al comparar 3 condiciones de cultivo: control, scaffold liso y scaffold microestructurado. En particular, se identificaron genes diferencialmente expresados en la comparación de scaffold microestructurado vs. liso, muchos de los cuales

están involucrados en los procesos de proliferación y diferenciación muscular. Estos genes desempeñan roles claves en la organización de sarcómeros, contracción muscular y ensamblaje de miofibrillas. Además, se observó una regulación negativa de varios genes relacionados con la proliferación celular en la presencia del scaffold microestructurado. Este hallazgo es consistente con el hecho de que la diferenciación muscular inicial requiere la inhibición de la proliferación celular para promover la maduración adecuada (Bezjak et al., 2024). Estos descubrimientos no solo profundizan la comprensión de cómo la microestructura del scaffold interactúa con las células musculares, sino que también destacan su impacto en los patrones de expresión génica, lo que podría ser fundamental para optimizar las estrategias de ingeniería de tejidos musculares.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1. Fabricación de scaffolds con técnica de solvent casting

Los scaffolds se elaboraron utilizando biomateriales no derivados de mamífero, específicamente gelatina de salmón, alginato, agarosa y glicerol, con agua como solvente. Las concentraciones usadas fueron las siguientes: gelatina de salmón 1.2% (obtenida según lo descrito por Díaz et al., 2011), alginato 1.2% (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, India), agarosa 0.2% (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, India), y glicerol 1.0% (Merck, Darmstadt, Alemania). La gelatina se obtiene a partir de la hidrolización del colágeno, un componente clave de la matriz extracelular, y se utiliza comúnmente en la fabricación de scaffolds debido a su capacidad para proporcionar un entorno favorable para la adhesión celular. Además, la gelatina presenta el motivo RGD, una secuencia de arginina, glicina y ácido aspártico que se une a integrinas en la superficie de las células, facilitando la adhesión de las células al scaffold (Yamada et al., 2014). El alginato es un polímero natural extraído de algas, conocido por su biocompatibilidad y biodegradabilidad, y se usa frecuentemente en ingeniería de tejidos (K. Y. Lee & Mooney, 2012). La agarosa se usa como agente gelificante, mientras que el glicerol actúa como plastificante para proteger la microestructura del scaffold de posibles daños físicos (Enrione et al., 2017). La mezcla de soluciones se preparó a 50°C con agitación durante 4 horas.

La solución se vertió en los moldes microestructurados colocados dentro de una placa Petri y en una placa Petri sin molde, con el objetivo de fabricar los scaffolds microestructurados y lisos respectivamente. Se consideró un volumen suficiente para obtener una altura de 4 mm en ambos casos. Se utilizaron moldes de acrílico de microcanales paralelos de aproximadamente 380 μm de ancho, 300 μm de alto y grosor de crestas de 70 μm . La solución en los moldes se mantuvo durante 3 días a 10°C hasta que el solvente se evaporó completamente. Finalmente, se desprendió el scaffold del molde (ver Fig. 2A).

3.2. Fabricación de scaffolds con técnica de electrospinning

La solución para electrospinning se realizó con polivinil alcohol (PVA) 10% p/p (Sigma Aldrich, Estados Unidos), gelatina de salmón 0.9% p/v y quitosano 0.6% p/v (Quitoquímica, Chile)

(Taborda et al., 2023). PVA es un polímero que se ha utilizado en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, baja citotoxicidad y solubilidad en agua (Paradossi et al., 2003). Para poder realizar scaffolds con electrospinning son críticos los parámetros de elasticidad, viscosidad, tensión superficial y conductividad eléctrica de la solución de polímero, por lo cual no todos los materiales pueden ser utilizados en electrospinning, sin embargo, PVA presenta las características adecuadas para poder ser utilizado (Sousa et al., 2015; Taborda et al., 2023). Quitosano es un polisacárido obtenido de la quitina, que se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y pared celular de hongos. El quitosano está compuesto por un grupo amino y dos grupos hidroxilos, lo que le confiere una naturaleza catiónica, por lo cual el quitosano tiene gran afinidad con moléculas aniónicas. Además, el quitosano se ha utilizado ampliamente en scaffolds para ingeniería de tejidos, gracias a que es un material biodegradable y biocompatible (Ribeiro et al., 2017).

PVA se preparó con agua Milli-Q como solvente, en agitación por aproximadamente 5 horas a una temperatura de 80°C. Quitosano se preparó en agua Milli-Q con ácido acético en concentración de 0.5 M a una temperatura de 60°C. Gelatina de salmón se preparó con agua Milli-Q como solvente y en agitación a 50°C, la cual posteriormente se centrifugó a 1780 RPM por 2 min, descartando el pellet. Finalmente, se mezclaron los componentes por 4 horas a 50°C.

El proceso de electrohilado se llevó a cabo en el equipo de electrospinning fabricado por la Universidad Técnica Federico Santa María, que consta de una bomba de jeringa New Era Pump Systems, Inc., NY, Estados Unidos), donde se pone la solución en una jeringa de 5 mL, conectada por una sonda hacia una aguja de diámetro 22G (Ramé-hart instrument co, Washington, Estados Unidos) conectada a un electrodo positivo. Al frente de la punta de la aguja se puso un colector microestructurado y uno liso, ambos fabricados con duraluminio (ver Fig. 1B). El colector microestructurado utilizado es de microcanales de aproximadamente 400 μm de ancho, 200 μm de alto y grosor de cresta de 100 μm . El colector se conectó a un electrodo a tierra. Se utilizó una fuente de poder de marca (Tong Li Tech, Shenzhen, China). Los parámetros de electrohilado utilizados fueron los siguientes: flujo de dispensado de solución: 0,2 mL/hora; voltaje: 7kV; distancia aguja-colector: 10 cm; tiempo de exposición: 4 horas (Taborda et al., 2023).

3.3. Caracterización estructura de scaffolds

La estructura de los scaffolds obtenidos se observó utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se examinaron con un microscopio SEM marca Carl Zeiss (EVO MA 10, Alemania). Las imágenes obtenidas con SEM se analizaron utilizando el software de procesamiento de imágenes ImageJ, donde se midieron las dimensiones de los microcanales de los scaffolds fabricados. Además, para los scaffolds fabricados con ES se realizaron análisis de grosor y orientación de nanofibras con el plugin DirectionalityJ..

3.4. Acondicionamiento de scaffolds

Previo al cultivo de las células musculares en los scaffolds, estos se sometieron a un proceso de acondicionamiento. Los scaffolds fabricados con la técnica solvent-casting fueron entrecruzados con una solución de cloruro de calcio (CaCl_2 70 mM) por una hora. Luego los scaffolds se lavaron 3 veces con agua estéril y se dejaron por 3 horas en etanol 70° para esterilizar. Finalmente, los scaffolds fueron lavados 3 veces en agua estéril y se dejaron en medio de cultivo (DMEM) en la incubadora (Heracell™ VIOS 160i, Thermo Scientific, Estados Unidos) durante toda la noche.

En cuanto a los scaffolds fabricados por ES, estos fueron lavados una vez en etanol absoluto, seguido por una esterilización de 30 minutos en etanol de 70° bajo luz UV. Luego se retiró el etanol de 70° y se dejaron a temperatura ambiente por 10 min hasta la aparente evaporación del etanol, para luego realizar 3 lavados en agua estéril, seguido por uno de PBS para luego dejarlos en medio de cultivo en incubadora durante toda la noche.

3.5. Cultivo celular

La línea celular utilizada en estos experimentos es C2C12, proveniente de European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Las células se cultivaron en condiciones de 37°C de temperatura y una concentración de CO_2 de 5%. Para el mantenimiento de las células en etapa de proliferación se utilizó DMEM high glucose (Gibco, Life Technologies, USA) con suero bovino fetal al 10% (Gibco, Life Technologies, New Zealand), L-glutamina a concentración 2 mM (Gibco, Life Technologies, New Zealand) y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina) (Gibco, Life Technologies,

New Zealand). Para el medio de diferenciación se cambió el suero bovino fetal por suero de caballo al 2% (Gibco, Life Technologies, New Zealand).

3.6. Evaluación morfología celular

Para la evaluación de la morfología celular, se sembraron sobre los scaffolds las células C2C12 a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células por cm^2 . Las células se dejaron proliferar por 3 días, donde luego el medio de proliferación se cambió por medio de diferenciación. Se realizó tinción fluorescente de las células utilizando Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y rodamina faloidina (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Primeramente, se fijaron las células con paraformaldehído 4%, seguido de 3 lavados con buffer universal (TRIS), luego permeabilización con Tritón X-100, 3 lavados con buffer, para luego continuar con la incubación simultánea a temperatura ambiente de los fluoróforos Hoechst y rodamina faloidina en concentraciones de 1:10000 y 1:200 respectivamente. Finalmente, se lavaron las muestras 3 veces con buffer universal. Se observaron las células sobre los scaffolds en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse TS2FL, Tokyo, Japón).

3.7. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

El ensayo de citotoxicidad realizado es WST-1, el cual mide la actividad metabólica de las células al reducir sales de tetrazolio solubles en agua, en formazán en presencia de células metabólicamente activas. Este es un ensayo colorimétrico, en el cual se mide el producto de la reducción de las sales utilizando un espectrofotómetro. El ensayo se realizó de forma indirecta según norma ISO 10993-5 para ensayos de citotoxicidad *in vitro*.

Para evaluar la citotoxicidad de los scaffolds, estos se cortaron en trozos de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ y se pusieron en placas de cultivo de 24 pocillos en medio de cultivo completo (DMEM suplementado con 10% SBF, 1% de antibióticos y 1% de L-Glutamina) durante 24 horas. Luego, el medio de cultivo que estuvo en contacto con los scaffolds se utilizó para el crecimiento de células C2C12 sembradas a densidad de 5×10^3 y se midió el efecto citotóxico a las 24 y 28 horas de cultivo, agregando el reactivo de WST-1 y midiendo el producto de la reducción de las sales de tetrazolio en un espectrofotómetro.

Se utilizaron las muestras correspondientes a los scaffolds de la técnica de solvent casting, lisos y con surcos, y de electrospinning con las mismas condiciones. Además, se utilizó como

control negativo medio de cultivo fresco, sin contacto con los scaffolds, y un blanco, que consiste en medio de cultivo sin el reactivo WST-1.

El cálculo de la citotoxicidad se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% Viabilidad = \frac{(DO_m - DO_b)}{(DO_c - DO_b)}$$

Donde:

DO_m = Densidad óptica muestra

DO_b = Densidad óptica blanco

DO_c = Densidad óptica control

Según la norma ISO 10993-5, las muestras se consideran citotóxicas si el porcentaje de viabilidad de las células decrece a un 70% en relación del control negativo.

3.8. Crecimiento celular, consumo de glucosa y producción de lactato

Para estudiar el crecimiento de las células musculares en los scaffolds se sembraron las células musculares en placas de cultivo de 96 pocillos (Falcon, Alemania). Luego, se sembraron 1×10^4 células por pocillo con 300 μ L de medio de proliferación. Además, se realizó un control sin scaffolds sembrando las células directamente sobre el pocillo de plástico.

Se tomaron muestras de los cultivos celulares a las 4, 24, 48 y 72 h. En cada momento de muestreo, se midieron las células viables, la concentración de glucosa y de lactato. Para cada tiempo experimental, se tomaron muestras de tres pocillos independientes para obtener un triplicado representativo. Las células viables se evaluaron con el ensayo colorimétrico comercial WST-1 (Roche, Alemania). La concentración de glucosa y lactato en los medios se midió utilizando los kits enzimáticos comerciales Glucose Liquicolor (Human, Alemania) y Lactate Dry Fast (Sentinel Diagnostics, Italia), respectivamente. Las tasas de crecimiento específicas se calcularon utilizando el modelo cinético tradicional de primer orden $dX/dt = \mu X$, donde X es la concentración celular, t es el tiempo y μ es la tasa de crecimiento específica. Los datos de concentración celular frente al tiempo en el crecimiento exponencial se ajustaron mediante regresión lineal en un gráfico semilogarítmico, donde la pendiente es μ . La producción de lactato a partir de las tasas de glucosa se calculó utilizando el concepto

tradicional dL/(- dG). Los datos pareados de lactato (L) y glucosa (G) se ajustaron mediante regresión lineal, donde la pendiente es dL/dG.

3.9. Extracción de ARN

Las células se lisaron en placas de cultivo agregando 1 mL de reactivo TRIzol (Invitrogen, Estados Unidos) por muestra, se separaron con hisopos y se homogeneizaron aún más mediante un pipeteo suave. Luego el ARN se purificó utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemania) y finalmente se reconstituyó en agua libre de nucleasas. La cantidad y calidad del ARN se evaluaron utilizando Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Estados Unidos) y el kit de ensayo Quant-iT Picogreen dsDNA (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) respectivamente.

3.10. RT-qPCR

La expresión de genes relacionados con la fusión celular (myomaker, myomixer y mioferlina) y la miogénesis (myod, miogenina y miosina de cadena pesada) se cuantificó mediante RT-qPCR. Además, se probaron tres candidatos para genes constitutivos: Hmbs, Eef2 y Gapdh. Los partidores se diseñaron utilizando el software Amplifx 1.5.4 (INP, Marsella, Francia) y PrimerBlast (NCBI, Bethesda, MD, Estados Unidos) (ver Tabla 1).

El ARN total se aisló utilizando kits comerciales (TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.; RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó el equipo Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.) para cuantificar las relaciones de concentración y calidad del ARN. Se realizó electroforesis utilizando gel de agarosa estándar al 1% para comprobar la integridad del ARN. Para el tratamiento previo de las muestras se utilizó el kit comercial TURBO DNA-free (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania), para eliminar los restos de ADN de la extracción de ARN. La síntesis de ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo con el kit comercial Improm-II (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) utilizando los siguientes componentes contenidos en el kit: dNTPs (0,5 mM), oligo dT (0,5 µg/reacción), y transcriptasa inversa (160 U/µL).

Tabla 1: Genes y secuencias utilizadas para la fabricación de partidores para RT-qPCR.

Gen	Nombre	Acceso en Gene Bank	Secuencia de partidores	Largo de amplicón
Mymk	Myomaker	NM_001159602.1 Gene ID: 66139	Fw: 5'- CTT CTC CCC AGT CAG TGC CTTC-3' Rv: 5'- GAC AAA CCA GGC CCA TCA CAG -3'	199
Mymx	Myomixer	NM_001177468.1 Gene ID: 653016	Fw: 5'-GCC GGT TAG AAC TGG TGA GC-3' Rv: 5'-ATC GGG AGC AAT GGA ACG GG-3'	83
Myof	Myoferlin	NM_001302140.1 Gene ID: 226101	Fw: 5'-CCA GAT CCG TGT CAG AGT GAT-3' Rv: 5'-TCC CTC TCT TGA TTC TCG TGC-3'	113
Myod1	Myogenic differentiation 1	NM_010866.2 Gene ID: 17927	Fw: 5'-ATG ATG ACC CGT GTT TCG ACT-3' Rv: 5'-CAC CGC AGT AGG GAA GTG T-3'	119
Myog	Myogenin	NM_031189.2 Gene ID: 17928	Fw: 5'-AGA AGC GCA GGC TCA AGAAAGT-3' Rv: 5'-AGT TGC ATT CAC TGG GCA CCAT-3'	222
Myh2	Myosin heavy chain, polypeptide 2, skeletal muscle, adult	NM_001039545.2 Gene ID: 17882	Fw: 5'-CCT CTT ATT TCC CAG CTG CAC CTT-3' Rv: 5'-GTC ACT TTC CCT GCA TCT TTGCTC -3	242
Hmbs	Hydroxymethylbilane synthase	NM_001110251.1 Gene ID: 15288	Fw: 5'-TGG CGA TGC TGA AAG CCT TGTA-3' Rv: 5'-GTT TTC CCG TTT GCA GAT GGCT-3'	239
Eef2	Eukaryotic translation elongation factor 2	NM_007907.2 Gene ID: 13629	Fw: 5'-ATC GTG GAG AAC GTC AAC GTCA-3' Rv: 5'-TGC CAT TGG CCG GAT CAA AGTA-3'	274
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_008084.3 Gene ID: 14433	Fw: 5'-TGG CCT TCC GTG TTC CTA C-3' Rv: 5'-GAG TTG CTG TTG AAG TCG CA-3'	178

Se realizaron reacciones de control sin transcriptasa inversa (- RT) para detectar contaminaciones de ADN genómico. El perfil de temperatura del protocolo de síntesis de ADNc fue el siguiente: 5 min a 70 °C, 5 min a 4 °C, 5 min a 25 °C (recocido), 60 min a 42 °C (síntesis) y 15 min a 70 °C (inactivación). La reacción RT-qPCR se realizó en el sistema AriaMx Real-Time PCR (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos) utilizando Master Mix Brilliant II (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos), cebadores (0,25 µM o 0,5 µM), agua bidestilada y 2 µL de ADNc de muestra diluida (1:4). El perfil de temperatura fue el siguiente: 10 min a 95 °C, 40 ciclos (15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C, 15 s a 72 °C) y seguido de un análisis de la curva de fusión. La estabilidad de los tres genes constitutivos candidatos (Eef2, Hmbs y Gapdh) se evaluó utilizando el software en línea RefFinder (Xie et al., 2012), que utiliza el método comparativo ΔC_t (Silver et al., 2006), geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004) y BestKeeper (Pfaffl et al., 2004). Se utilizaron nueve condiciones para el análisis, (control plástico, scaffold liso y scaffold microestructurado) y los tres tiempos (0, 3 y 7 días de diferenciación). Eef2 se identificó como el elemento constitutivo más estable en todas las condiciones experimentales y se utilizó en los cálculos de las expresiones genéticas relativas.

Finalmente, la expresión genética relativa se calculó utilizando el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

3.11. RNAseq

3.11.1 Preparación de librerías y secuenciación

Se utilizaron dos microgramos de ARN total con número de integridad de ARN (RIN) > 8 para la preparación de la biblioteca utilizando un kit de ARNm trenzado TruSeq con 11 ciclos de amplificación por PCR según la recomendación del fabricante (Illumina, Estado Unidos). Las bibliotecas de ADN etiquetadas con adaptador se secuenciaron para lecturas de extremos emparejados de 150 pb utilizando el kit Illumina HiSeq SBS v4 en el modo de alto rendimiento de acuerdo con la recomendación del fabricante para el instrumento Illumina HiSeq 2500 en las instalaciones de secuenciación de Genoma Mayor, Santiago de Chile. Los datos de secuenciación están disponibles en el repositorio público NCBI SRA con el número de acceso de BioProject PRJNA882114.

3.11.2 Lectura de mapeo y análisis de datos

Se obtuvieron lecturas limpias a partir de lecturas sin procesar después de descartar secuencias adaptadoras del kit Illumina TruSeq, eliminar las de baja calidad y filtrar el ARNr utilizando Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014) con parámetros ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10 PRINCIPAL:3 TRASERO:3 VENTANA CORREDERA:4:15 MINLENO:36. Las lecturas limpias se asignaron al genoma del ratón GRCm39 obtenido de Ensembl utilizando SOAP2 (parámetro: m por defecto es 5) (R. Li et al., 2009). Los genes expresados diferencialmente (DEG) se identificaron mediante comparaciones por pares utilizando EdgeR (análisis empírico de expresión genética digital en R) (Robinson et al., 2009) utilizando parámetros predeterminados. La expresión génica se realizó mediante el método TPM (transcripciones por millón de lecturas mapeadas) (Mortazavi et al., 2008). Los DEG se midieron de acuerdo con "La importancia de los perfiles de expresión genética digital" (Audic & Claverie, 1997). La tasa de descubrimiento falso (FDR) $\leq 0,05$ y $|\log 2 \text{ veces el cambio}|$ Se utilizó $\geq 1,5$ como umbral para identificar DEG. Se realizó un análisis de Gene Ontology (GO) (Ashburner et al., 2000; Aleksander et al., 2023) para obtener información sobre procesos

biológicos, funciones moleculares y componentes celulares, comparando los DEG con la base de datos GO del Gene Ontology Consortium utilizando AmiGO (Carbon et al., 2009).

Todos los DEG se asignaron a términos GO, siguiendo los números de genes calculados en cada término; Finalmente, los términos GO significativamente enriquecidos se encontraron en DEG (Liu et al., 2011). Para identificar similitudes y diferencias en el transcriptoma de las diferentes muestras, se realizaron análisis de componentes principales (PCA) y análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) utilizando el paquete R. Además, las asociaciones de genes y las redes de interacción de proteínas se realizaron utilizando String (<https://string-db.org/>) con red tipo Full String Network y una puntuación de interacción mínima requerida de 0,700 y Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) para visualización de la red con la opción Diseño Orgánico.

3.12. Inmunofluorescencia

Se realizó inmunofluorescencia para identificar la expresión de marcadores de miogénesis (myod, miogenina, miosina cadena pesada) y proteínas partícipes de fusión en células musculares (myomaker, myomixer y mioferlina). Las células se sembraron a una densidad de 1×10^4 células por centímetro cuadrado y proliferaron en condiciones estándar, para luego cambiar a medio de diferenciación, en el cual se reemplaza suero bovino fetal por suero de caballo. Las células se diferenciaron hasta distintos tiempos según el marcador que se quería identificar (0, 3, 5 y 7 días). Luego de que las células alcanzaran los días de diferenciación deseados, éstas fueron fijadas por 10 minutos en paraformaldehído al 4%, seguido por 3 lavados en buffer TRIS pH 7,6, permeabilización por 15 min en Tritón X-100 al 0,1%, lavado 3 veces en buffer TRIS, bloqueo en albúmina de suero bovino por 30 minutos al 5% para todos los anticuerpos, excepto para myomaker, para el cual se utilizó bloqueo en suero bovino fetal al 10% por 10 minutos. Los anticuerpos utilizados se encuentran en la Tabla 2 con las respectivas concentraciones de trabajo. Los anticuerpos primarios se incubaron a una temperatura de 37°C durante una hora, luego se realizaron 3 lavados en buffer TRIS, para posteriormente incubar el anticuerpo secundario por 45 minutos. Finalmente, las muestras se lavaron en buffer TRIS 3 veces. Las muestras se observaron inmediatamente en un microscopio invertido de EPI fluorescencia (Nikon, Eclipse TS2FL, Tokyo, Japón).

Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la identificación de proteínas participantes de los procesos de miogénesis y fusión celular.

Anticuerpo	Concentración de trabajo	Número de catálogo, Marca
Myod (monoclonal de ratón)	1: 200	sc-377460; Santa Cruz Biotechnology
Miogenina (monoclonal de ratón)	1: 500	sc-12732; Santa Cruz Biotechnology
Miosina de cadena pesada (monoclonal de ratón)	1: 500	sc-376157; Santa Cruz Biotechnology
Mioferlina (monoclonal de ratón)	1: 200	sc-376879, Santa Cruz Biotechnology
Myomaker (policlonal de conejo)	1: 200	ab-188300, Abcam
Myomixer (policlonal de oveja)	1: 100	PA5-47639, Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor 488 (cabra anti- ratón)	1: 200	A-11029, Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor 488 (cabra anti- conejo)	1: 500	A-11034; Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor 488 (burro anti- oveja)	1: 400	A-11015, Thermo Fisher Scientific

Capítulo 4:

Resultados

4.1 Desarrollo de scaffolds microestructurados a través de las técnicas de solvent casting y electrospinning, con biomateriales comestibles no derivados de mamíferos.

4.1.1 Solvent Casting

Los scaffolds fueron fabricados utilizando moldes con microcanales de un ancho de aproximadamente 380 μm , profundidad de 300 μm y ancho de cresta de 70 μm . El resultado obtenido al desprender el scaffold del molde fueron microcanales paralelos donde mayormente se conservó la forma esperada. Se observaron los scaffolds fabricados utilizando un microscopio electrónico de barrido con el cuál se obtuvieron imágenes de la superficie y de corte transversal (Fig. 5). Los scaffolds obtenidos son de fácil manipulación, es decir, se desprendieron fácilmente del molde, obteniendo un grosor adecuado y de consistencia resistente.

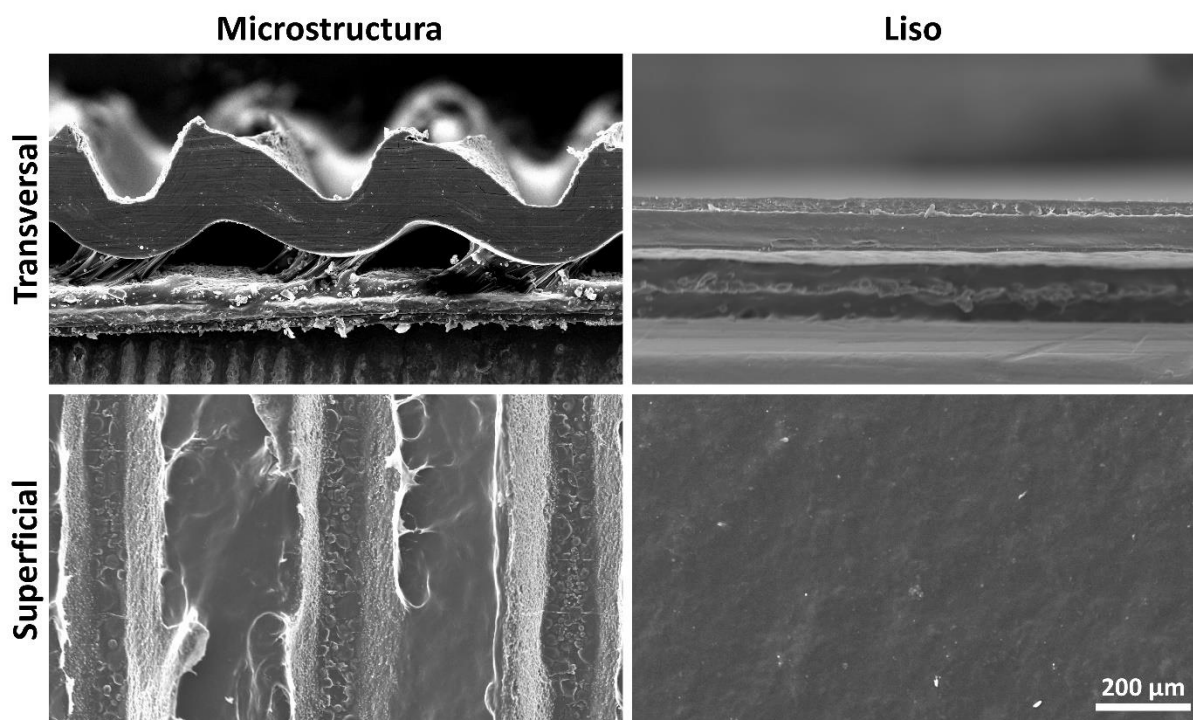


Figura 5: Imágenes de SEM de scaffolds fabricados con la técnica de solvent casting utilizando moldes microestructurados y lisos. Se observan vista transversal y de superficie.

4.1.2 Electrospinning

Los scaffolds se realizaron utilizando una mezcla de PVA (10%), gelatina de salmón (0.9%) y quitosano (0.6%). Se utilizaron dos tipos de moldes para realizar estos scaffolds: liso y con microestructura. Las dimensiones del colector microestructurado son las siguientes: ancho de surco 400 μm , altura de surco 200 μm y ancho de cresta 100 μm . La mezcla se electrohiló con los siguientes parámetros: flujo de dispensado de solución: 0,2 mL/hora; voltaje: 7kV; distancia aguja-colector: 10 cm; tiempo de exposición: 4 horas. El resultado fueron membranas delgadas, en algunos casos difícil de despegar íntegramente del colector y frágiles de manipular. En la Figura 6 se observan los resultados con SEM, donde se muestran los canales realizados por la microestructura de los moldes y las nanofibras obtenidas.

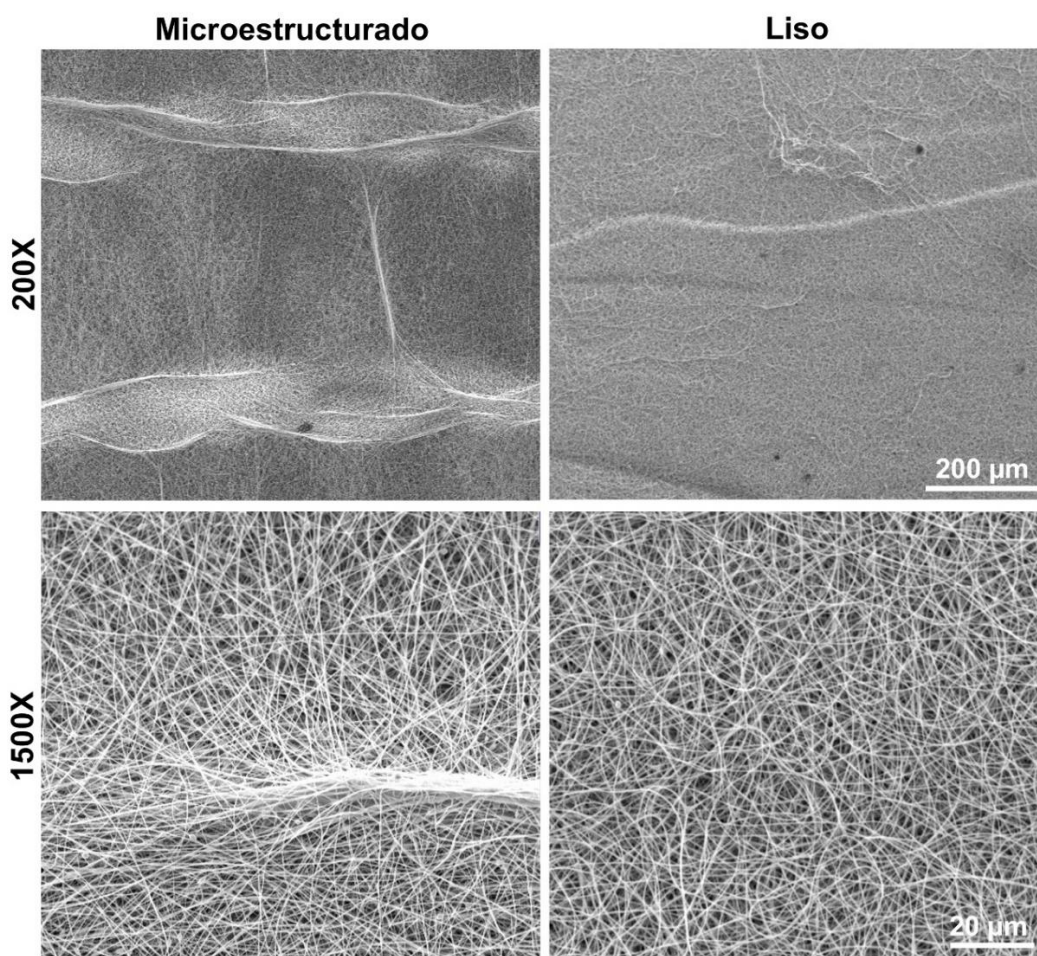


Figura 6: Imágenes de SEM de los scaffolds fabricados con la técnica de electrospinning utilizando colectores estáticos microestructurado y liso. Se muestran dos distintas magnificaciones para observar la superficie obtenida (200X) y el detalle de las nanofibras (1500X).

Se observa que en el scaffold liso las nanofibras tienen formas circulares sin organización, mientras que en el scaffold microestructurado se observa alineación en las zonas cercanas paralelas a los microcanales. Se realizó un análisis de alineación de nanofibras para cuantificar la observación anterior, utilizando el software de procesamiento de imágenes Image J, con el plugin Orientation J. Los resultados se observan en la Figura 7, donde se indica que en la microestructura hay una orientación, mientras que en el scaffold liso esto no ocurrió.

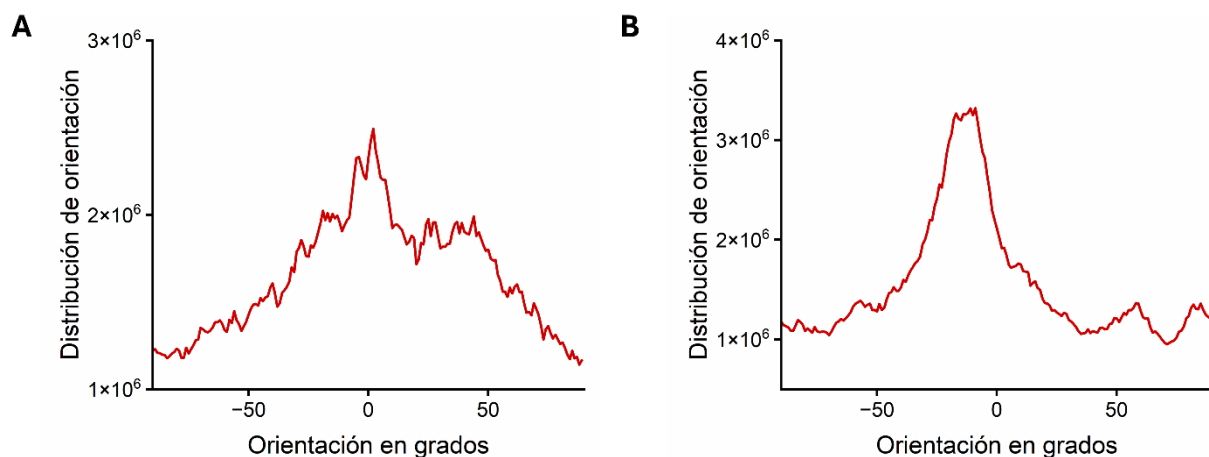


Figura 7: Gráficos de orientación de nanofibras de los scaffolds fabricados con la técnica de electrospinning con colector liso (A) y microestructurado (B).

4.2 Determinación de scaffold óptimo para cultivo y diferenciación de células musculares C2C12.

4.2.1 Evaluación de citotoxicidad del material

La evaluación de la citotoxicidad del material fue llevada a cabo utilizando el ensayo de WST-1, en el cual se realizó la cuantificación de la viabilidad celular midiendo la reacción de las sales de tetrazolio del reactivo WST-1, las cuales se reducen a formazán en presencia de células metabólicamente activas (Berridge et al., 2005).

El ensayo se realizó utilizando el sobrenadante de medio de cultivo celular suplementado, el cual estuvo en contacto durante 24 horas con los scaffolds. Este sobrenadante luego se usó para cultivar las células y se evaluó la viabilidad de éstas en presencia del medio que estuvo en cultivo con el scaffold, al crecer durante 24 y 48 horas. Una viabilidad menor de 70% a las 48 horas de incubación indica citotoxicidad del material.

En la Figura 8 se presentan los resultados obtenidos, que muestran que ambos tipos de scaffolds no presentan citotoxicidad, ya que la viabilidad celular se mantuvo por encima del 70% en todos los casos. Se observa una disminución gradual en la viabilidad celular con el tiempo, lo cual es predecible dado que no se realizó un cambio de medio durante el ensayo. De manera destacada, todas las muestras de electrospinning y la muestra de 24 horas del scaffold microestructurado fabricado por solvent casting mostraron una viabilidad superior al 100%, indicando que la viabilidad celular fue incluso mayor que la de las células cultivadas en plástico. Este hallazgo sugiere que el entorno proporcionado por los scaffolds pudo haber favorecido el crecimiento celular en mayor medida de lo esperado en comparación con las condiciones estándar de cultivo en plástico.

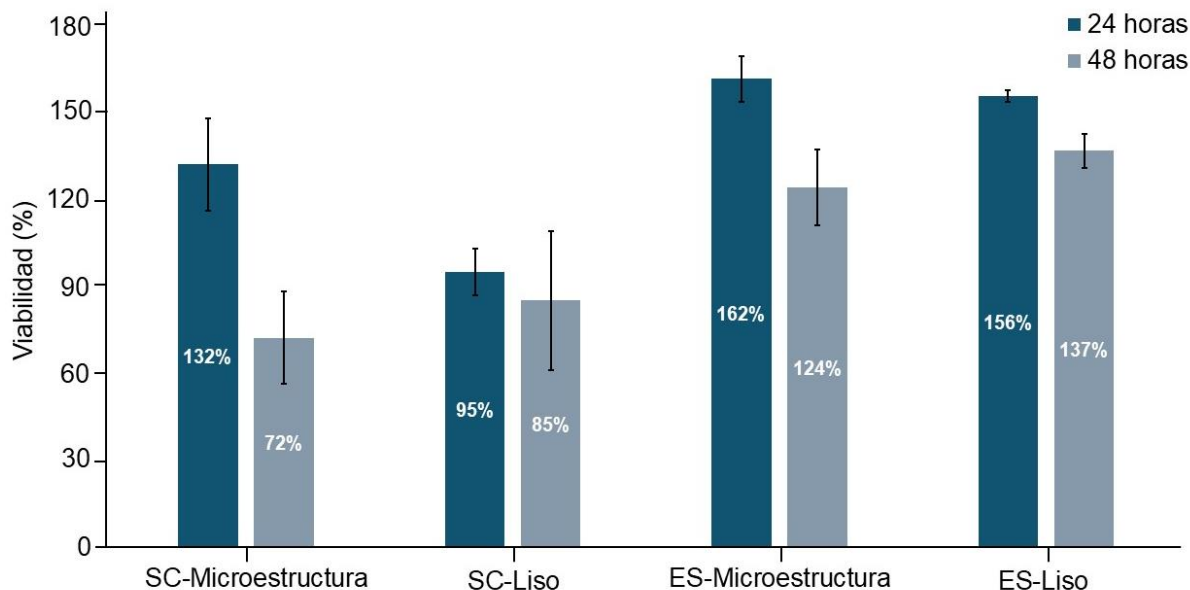


Figura 8: Ensayo de viabilidad celular utilizando la técnica de WST-1. Se evaluaron ambos scaffolds fabricados con las técnicas de solvent casting (SC) y electrospinning (ES), ambos con y sin microestructuras. Los tiempos de cultivo del ensayo fueron de 24 y 48 horas.

4.2.2 Evaluación de la morfología celular sobre scaffold

4.2.2.1 Scaffolds de Solvent Casting

Para evaluar el efecto de los scaffolds y su microestructura, se sembraron células musculares de la línea C2C12. Primeramente, se realizó una fase inicial de proliferación durante 72 horas, y luego se cambió el medio que contenía suero bovino fetal a uno que contiene suero de caballo para inducir la diferenciación miogénica durante un período de 7 días. La Figura 9 muestra la morfología de las células musculares cultivadas en el scaffold después de la fase de proliferación a los 0, 3 y 7 días de diferenciación.

Las células cultivadas en placas de plástico comerciales (control) presentan una alta densidad celular con una morfología desorganizada y ramificada, característica de esta línea de mioblastos (Burattini et al., 2004). Tras 7 días de cultivo, se pueden observar células multinucleadas dispuestas de manera aleatoria, sin una alineación específica (indicadas con flechas blancas y asterisco en la Fig. 9). Aunque se evidencian signos de diferenciación

miogénica, no se forman fibras musculares alineadas, lo que sugiere la presencia de miotubos desorganizados (Zhao et al., 2009).

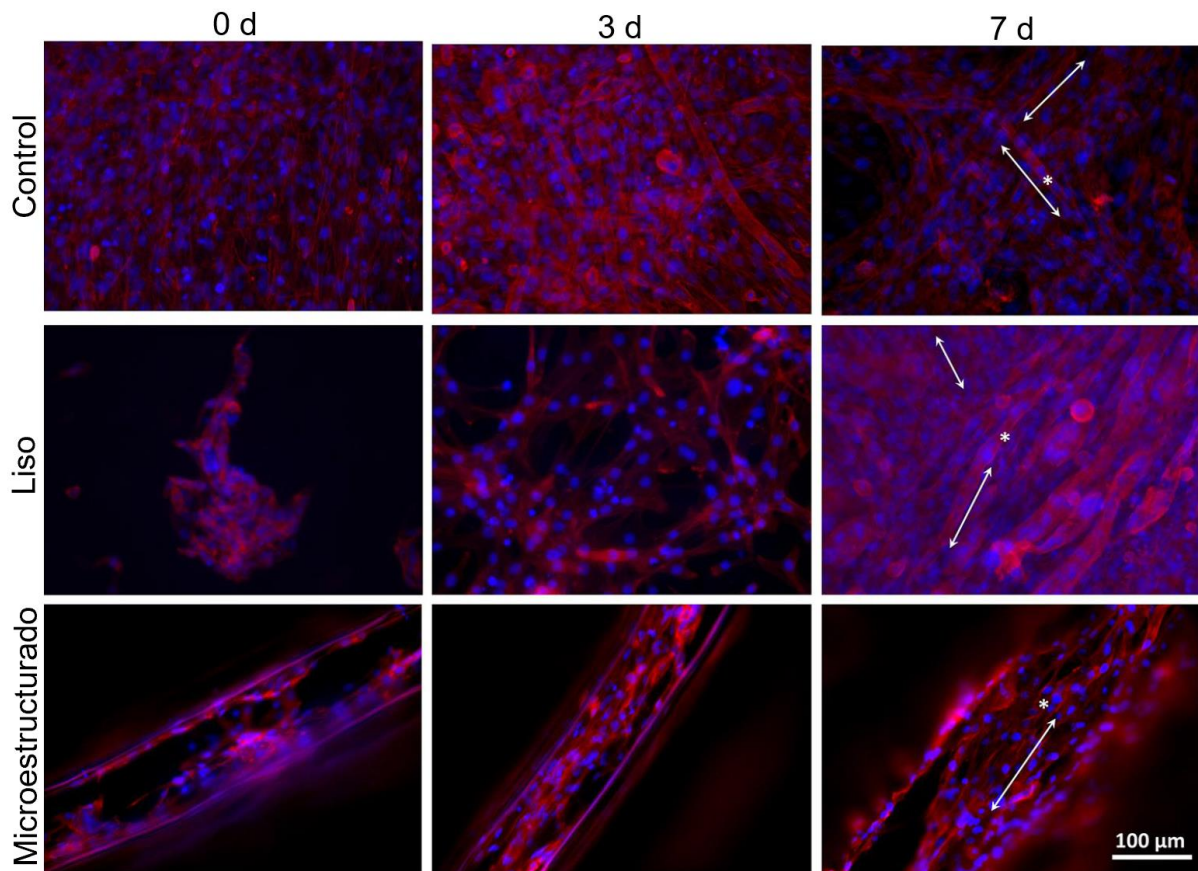


Figura 9: Imágenes de fluorescencia de células C2C12 creciendo sobre control, scaffold liso y microestructurado, luego de 0, 3 y 7 días de diferenciación. En azul se muestran los núcleos teñidos con Hoechst y en rojo se observa el citoesqueleto de actina teñido con rodamina-faloidina. Las flechas blancas indican la direccionalidad de las fibras y los asteriscos muestran miofibras multinucleadas.

Al sembrar los mioblastos en scaffolds lisos, se observa una morfología celular similar a la del control. Esto sugiere que la composición del scaffold es biocompatible y que permite un comportamiento celular comparable al observado en las superficies de control de cultivo celular.

Cuando las células se sembraron en el scaffold microestructurado, adoptaron la forma de haces de fibras musculares, formando estructuras paralelas, alargadas y multinucleadas. La alineación paralela de las miofibras es crucial para la funcionalidad de las células musculares, ya que es esencial para generar fuerzas direccionales y asegurar el uso eficiente del músculo

(Bach et al., 2004). La formación de estas estructuras alineadas sugiere que la microestructura del scaffolds es adecuada para fomentar el desarrollo de una morfología similar a un haz de músculos y la producción de carne cultivada (Orellana et al., 2020).

Para cuantificar la alineación celular y evaluar el efecto de la microestructura sobre esta, se utilizó el software de análisis de imágenes ImageJ con el plugin Directionality J. La Figura 10 muestra, en la columna izquierda, las imágenes de células después de 7 días de diferenciación en los sistemas de control (Fig. 10A), liso (Fig. 10B) y microestructurado (Fig. 10C). En la columna derecha, se presentan los histogramas correspondientes al análisis de direccionalidad.

Los resultados revelan que, en la microestructura, la alineación celular es evidente tanto en las imágenes como en el histograma, que muestra un claro pico que indica una orientación predominante en la misma dirección. En contraste, el control presenta varios picos en el histograma, reflejando una alineación celular menos organizada. El scaffold liso muestra un pico en el histograma, aunque menos pronunciado que en la microestructura, sugiriendo una organización celular menos marcada. Las imágenes corroboran esto al mostrar una orientación radial desde un grupo celular inicialmente desorganizado.

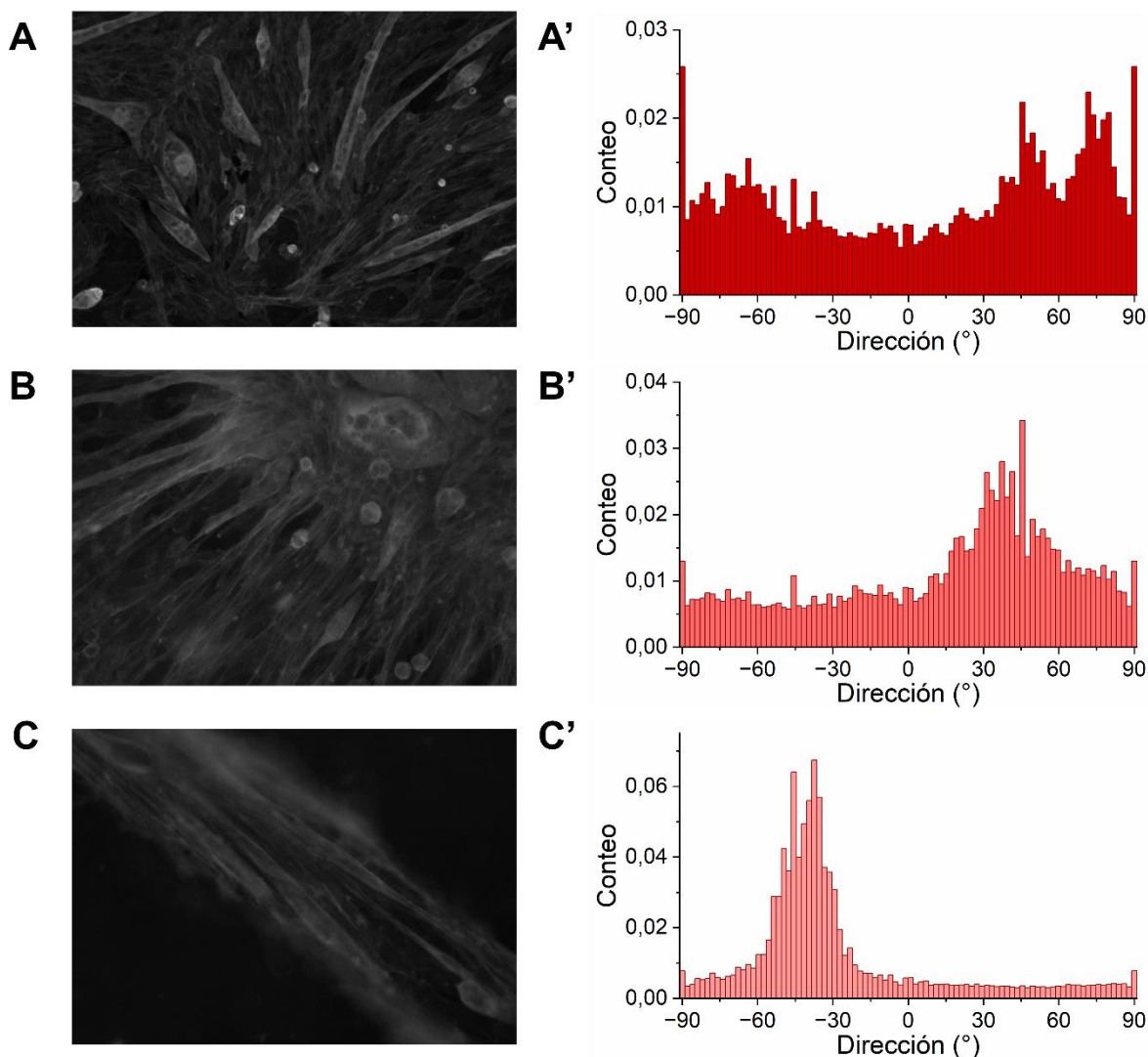


Figura 10: Análisis de direccionalidad de miofibras al crecer sobre control (A) y scaffolds fabricados con la técnica de solvent casting liso (B) y microestructurado (C). En la columna derecha se observan los respectivos histogramas de direccionalidad donde A': Control, B': Liso y C': microestructura.

4.2.2.2 Scaffolds de Electrospinning

Se sembraron células de la línea C2C12 en las mismas condiciones utilizadas para la fabricación de scaffolds mediante la técnica de solvent casting y se evaluó la morfología y alineación celular después de 3 días de proliferación. Sin embargo, los scaffolds obtenidos con la técnica de electrospinning resultaron ser muy frágiles y de difícil manipulación, lo que impidió realizar evaluaciones a tiempos de cultivo más prolongados.

Los scaffolds fabricados mediante la técnica de electrospinning mostraron una excelente adhesión y esparcimiento celular. Las células crecieron sobre estos scaffolds con una morfología óptima, exhibiendo una elongación característica (ver Fig. 11), lo cual es indicativo de una interacción adecuada con el material. Este comportamiento positivo resalta la eficacia de la técnica de electrospinning en proporcionar un entorno adecuado para el desarrollo celular, concordante con los resultados de viabilidad celular obtenidos.

En la Figura 11A, se puede observar que las células en el control están desorganizadas y no presentan miofibras multinucleadas. En contraste, en el scaffold liso electrohilado (Fig. 11B), se aprecian varias células alargadas y multinucleadas, destacadas con (*), incluso después de solo 3 días de proliferación, lo cual es notable ya que, en este punto, no se esperaría la formación de miofibras, como se observa en el control. Este hallazgo resalta la efectividad del scaffold de nanofibras, ya que favorece la formación de células multinucleadas sin requerir medio de diferenciación adicional. Por último, en el scaffold microestructurado (Fig. 11C), se observa que las células tienen una morfología alargada y muestran una alineación perpendicular a los microcanales (en azul en la figura).

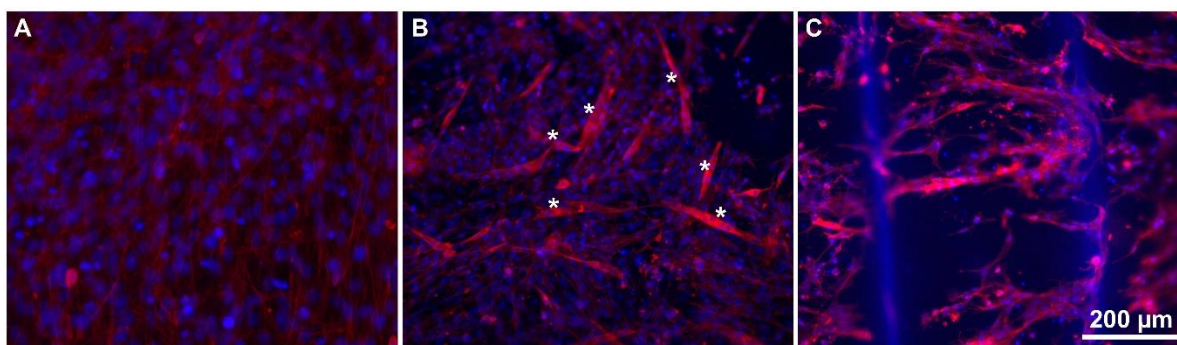


Figura 11: Células C2C12 creciendo sobre control plástico (A) y scaffold fabricados con la técnica de electrospinning utilizando colector liso (B) y microestructurado (C). En B se observan células alargadas y multinucleadas, destacadas con (*). Azul: núcleos teñidos con Hoechst. Rojo: Citoesqueleto de actina teñido con rodamina faloidina.

Se realizó el correspondiente análisis de orientación celular para obtener datos cuantitativos y los resultados se muestran en la Figura 12, donde en la columna izquierda se observan las células utilizadas para el análisis en control (Fig. 12A), liso (Fig. 12B) y microestructura (Fig. 12C). En la columna de la derecha se observan los histogramas de direccionalidad. Se observa claramente que tanto en el control como el scaffold fabricado con el colector liso se obtuvo

más de un pico, indicando baja alineación celular, sin embargo, solo en el scaffold microestructurado hay un pico claro de alineación celular. Cabe destacar que, si bien se obtuvo alineación de las células, esta se dio en una dirección perpendicular a la cresta de los microcanales, resultado que no es el esperado, ya que la alineación debe ser paralela. Esto se corresponde con los resultados de la imagen de SEM de las nanofibras del scaffold microestructurado (Figura 5), donde se observa que la alineación de las nanofibras también ocurrió de forma perpendicular a los microcanales, lo que tuvo el mismo efecto sobre la alineación celular.

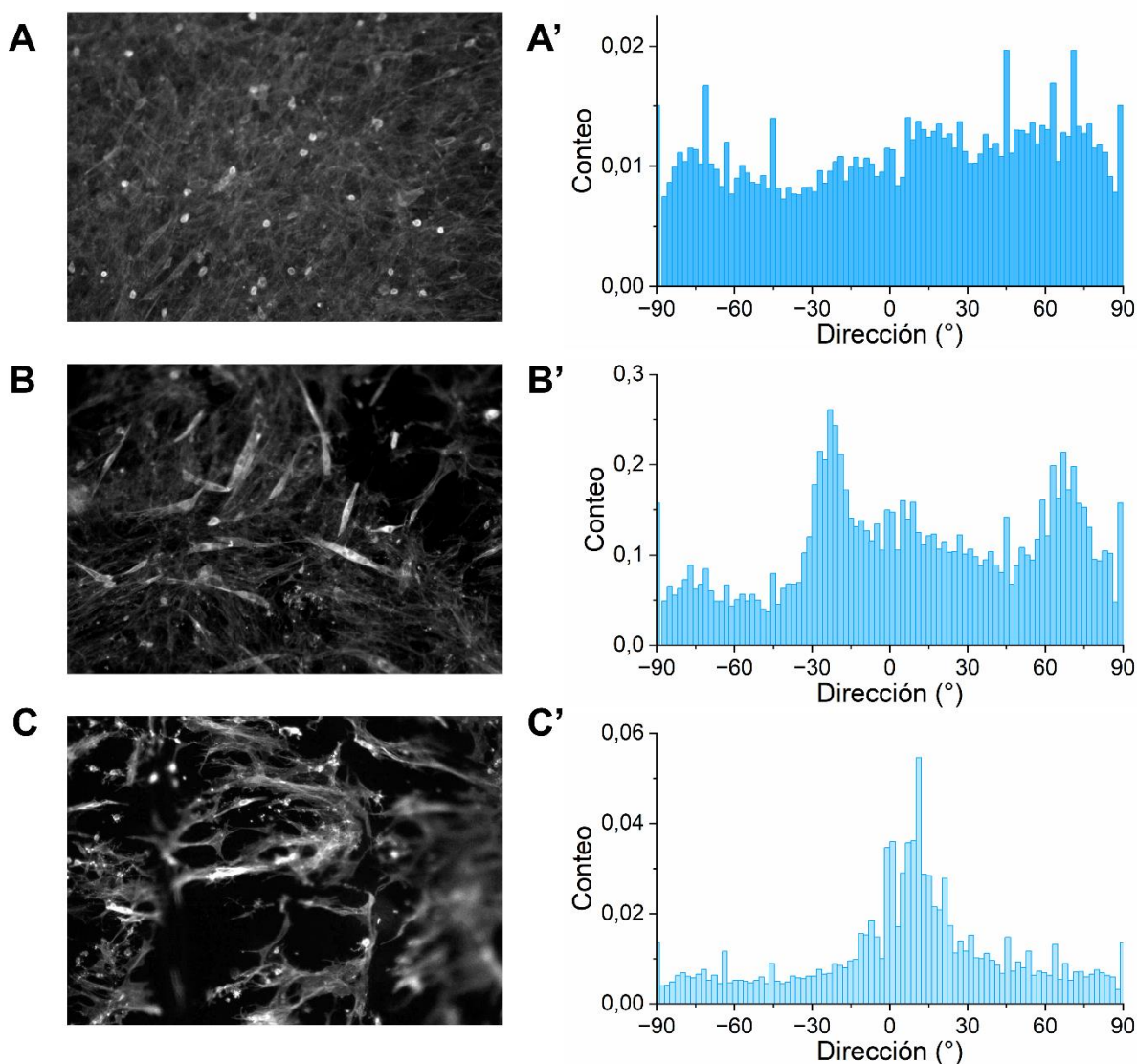


Figura 12: Análisis de direccionalidad de miofibras al crecer sobre control (A) y scaffolds fabricados con la técnica de electrospinning liso (B) y microestructurado (C). En la columna derecha se observan los respectivos histogramas de direccionalidad donde A': Control, B': Liso y C': microestructura.

4.2.3 Crecimiento celular y metabolismo

Luego de la evaluación morfológica, se decidió continuar las siguientes evaluaciones solo con los scaffolds fabricados con la técnica de solvent casting, ya que se obtuvo buena morfología y alineación celular, además de ser de fácil manipulación, lo que permite realizar experimentos a largos tiempos.

Para evaluar el crecimiento celular se utilizó la técnica de viabilidad celular WST-1, la cual además permite obtener una estimación cuantitativa de la cantidad de células presentes en el cultivo y así poder evaluar cómo este número va variando en el tiempo. En cuanto al metabolismo, se realizaron mediciones de consumo de glucosa y producción de lactato en las células.

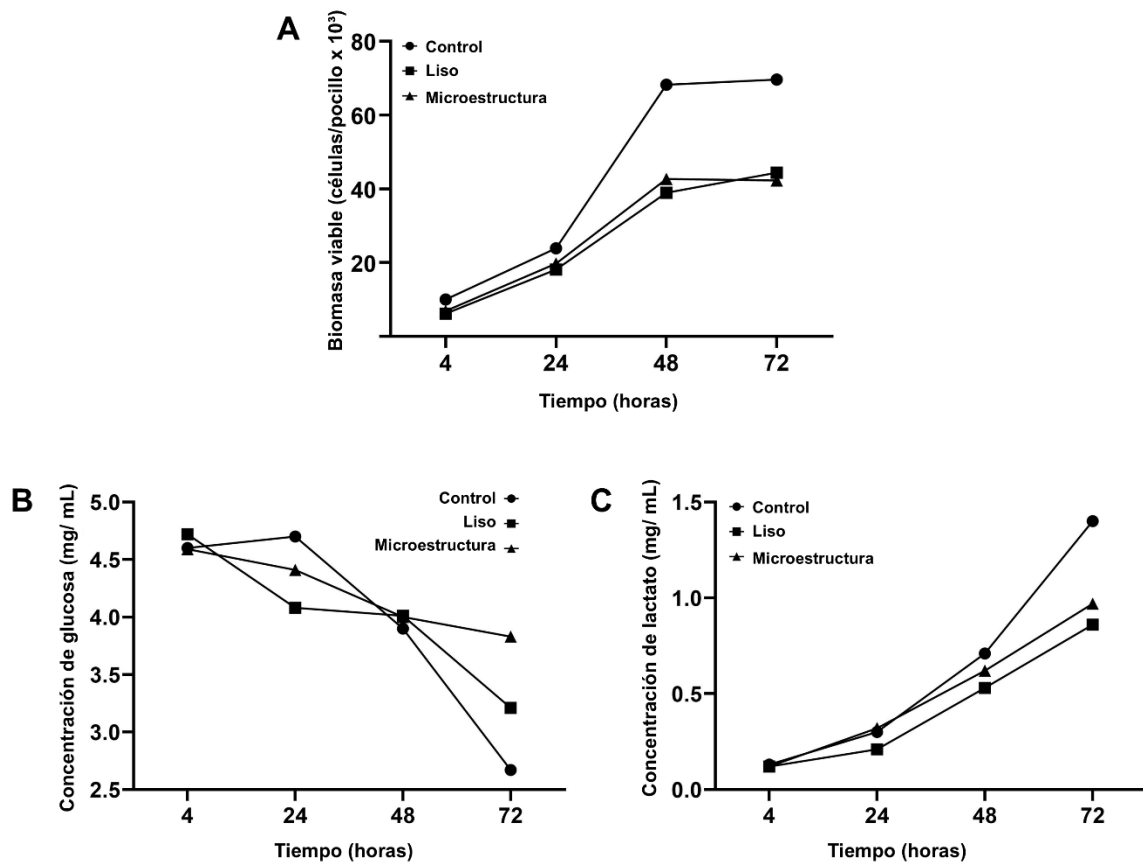


Figura 13: Comportamiento celular en los distintos sistemas: control (●), liso (■) y microestructura (▲), donde se considera el crecimiento celular (A), consumo de glucosa (B) y producción de lactato (C). Se realizaron mediciones luego de 4, 24, 48 y 72 horas de crecimiento.

Los resultados de la Figura 13 muestran la clara diferencia que representa utilizar un scaffold, ya sea liso o microestructurado, cuando se compara con crecer células en plástico, ya que, a

tiempo final, se observaron valores más similares para liso y microestructura, mientras que el valor de control se aleja. El gráfico de crecimiento celular (Fig. 13A) indica que hasta las 24 horas el crecimiento es similar en los tres sistemas, sin embargo, esto cambia evidentemente a partir de las 48 horas, donde el crecimiento de las células en los scaffolds es menor que en el control. En cuanto al consumo de glucosa (Fig. 13B) y producción de lactato (Fig. 13C), se observa que en el control es donde ocurrió más consumo de glucosa y, por lo tanto, mayor producción de lactato.

La Tabla 3 reporta los valores de la tasa de crecimiento específica evaluados en cada cultivo celular y la producción de lactato a partir de la glucosa (índice glucolítico). Es bien conocido que la actividad glucolítica y la producción de lactato por los tejidos musculares son indicadores del metabolismo celular (Acevedo et al., 2013). El nivel glucolítico de las células cultivadas en scaffolds microestructurados fue mayor que en scaffolds lisos. Esto indica que el metabolismo celular aumenta cuando las células crecen en los microcanales. Evidentemente, el scaffold microestructurado fue diseñado para inducir la formación de estructuras similares a haces de músculos, que requerirían más energía metabólica para el proceso de miogénesis.

Tabla 3: Parámetros de crecimiento de cultivo celular en la fase de proliferación.

	Tasa específica de crecimiento (h^{-1})	Producción de lactato desde glucosa (g/g)
Control	$4.37 \times 10^{-2} (\pm 2.2 \times 10^{-3})$	0.59 (± 0.01)
Liso	$4.18 \times 10^{-2} (\pm 3.46 \times 10^{-3})$	0.50 (± 0.06)
Microestructura	$4.10 \times 10^{-2} (\pm 5.68 \times 10^{-4})$	1.00 (± 0.07)

4.3 Estudio de la expresión de marcadores miogénicos (myod, miogenina y miosina de cadena pesada) y de proteínas partícipes de fusión (myomaker, myomixer y mioferlina) en etapas tempranas, medias y tardías de diferenciación, usando RT-qPCR.

Para evaluar la expresión de genes involucrados en los procesos de miogénesis y fusión celular, se realizó un ensayo de RT-qPCR. La expresión génica relativa en los días 0, 3 y 7 de la fase de diferenciación se presenta en las Figuras 14 (fusión) y 15 (miogénesis). La comparación entre el scaffold liso y el control (L vs. C) revela cómo la composición química del scaffold afecta el proceso de diferenciación en comparación con el cultivo tradicional en plástico. Por otro lado, la comparación entre el scaffold microestructurado y el scaffold liso (M vs. L) proporciona información sobre los efectos específicos inducidos por los microcanales en las células. Este enfoque permite analizar de manera detallada los impactos individuales de la composición del scaffold y su microestructura sobre la miogénesis y fusión celular.

La Figura 14 muestra la expresión génica de marcadores de fusión celular, específicamente myomaker, myomixer y mioferlina. Myomaker, involucrado en el proceso de hemifusión donde dos membranas celulares se fusionan para formar una sola (Leikina et al., 2018), mostró un aumento en su expresión, alcanzando un pico en el día 3 y luego disminuyendo en todas las condiciones evaluadas. La mayor expresión de myomaker se observó en el scaffold microestructurado comparado con el liso en el día 3.

Myomixer, una proteína esencial para la formación del poro de fusión (Leikina et al., 2018), presentó una disminución en su expresión en el día 3 en todas las condiciones, seguido por un aumento para el día 7, con la máxima expresión observada en el scaffold microestructurado en comparación con el liso en todos los tiempos.

Mioferlina, que generalmente se expresa al inicio de la fusión (Zhu et al., 2019), mostró un incremento en su expresión a lo largo del tiempo, alcanzando sus niveles más altos en el día 7 de diferenciación en todas las condiciones. Notablemente, el scaffold liso comparado con el control mostró un aumento progresivo en la expresión de mioferlina a lo largo del tiempo. Sin embargo, en las comparaciones entre microestructura y scaffold liso, así como entre microestructura y control, la expresión de mioferlina fue menor, lo que sugiere un posible efecto regulador de la microestructura sobre la expresión de esta proteína.

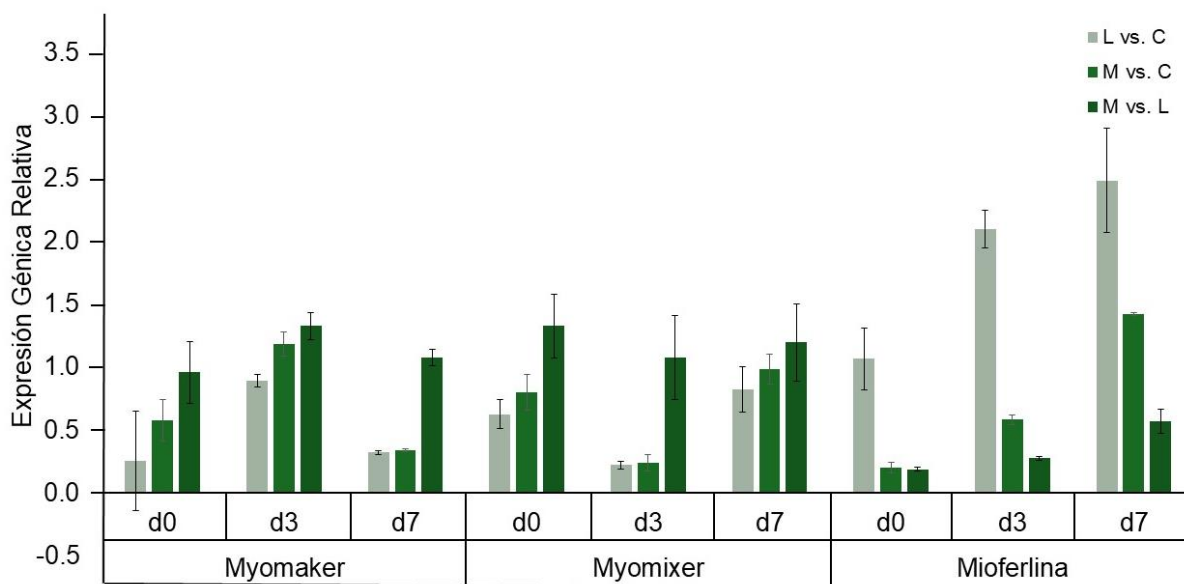


Figura 14: Expresión génica relativa de marcadores de fusión en los sistemas control (C), liso (L) y microestructura (M). Los valores de expresión relativa de los genes myomaker, myomixer y mioferlina se midieron a los 0, 3 y 7 días de diferenciación en tres condiciones. Los valores de expresión relativa se obtuvieron comparando directamente los niveles de expresión génica entre estas condiciones (L vs. C, M vs. C y M vs. L).

La Figura 15 ilustra la expresión génica de marcadores miogénicos clave: Myod, miogenina y miosina de cadena pesada. MyoD, un marcador de miogénesis temprana (Berkes & Tapscott, 2005), mostró una expresión cinco veces mayor en los scaffolds microestructurados en comparación con los scaffolds lisos a los 0 días, y luego disminuyó en ambas condiciones.

La miogenina es un marcador intermedio de la diferenciación miogénica (Chen et al., 2015; Ganassi et al., 2018), presentó una expresión tres veces superior en el scaffold microestructurado en comparación con el scaffold liso en el día 0, pero su expresión disminuyó rápidamente, siendo menor en el día 7 que en el scaffold liso.

La miosina de cadena pesada, una proteína crucial para la contracción muscular y un marcador de diferenciación tardía (Chen et al., 2015; Steen et al., 2016), mostró la mayor expresión en el día 3 en el scaffold microestructurado en comparación con el scaffold liso. Como era de esperarse, no se observó expresión a los 0 días y sorprendentemente, se observó que la mayor expresión de miosina fue en el día 3 al comparar la microestructura con scaffold liso. En contraste, la expresión fue casi nula en las comparaciones L vs. C y M vs. C a los días 0 y 3 de diferenciación.

En general, los datos indican que, en todos los tiempos evaluados, la expresión de estos genes fue consistentemente mayor en los scaffolds microestructurados en comparación con los scaffolds lisos, sugiriendo que la interacción de las células con los scaffolds microestructurados favorece de manera significativa el proceso de miogénesis

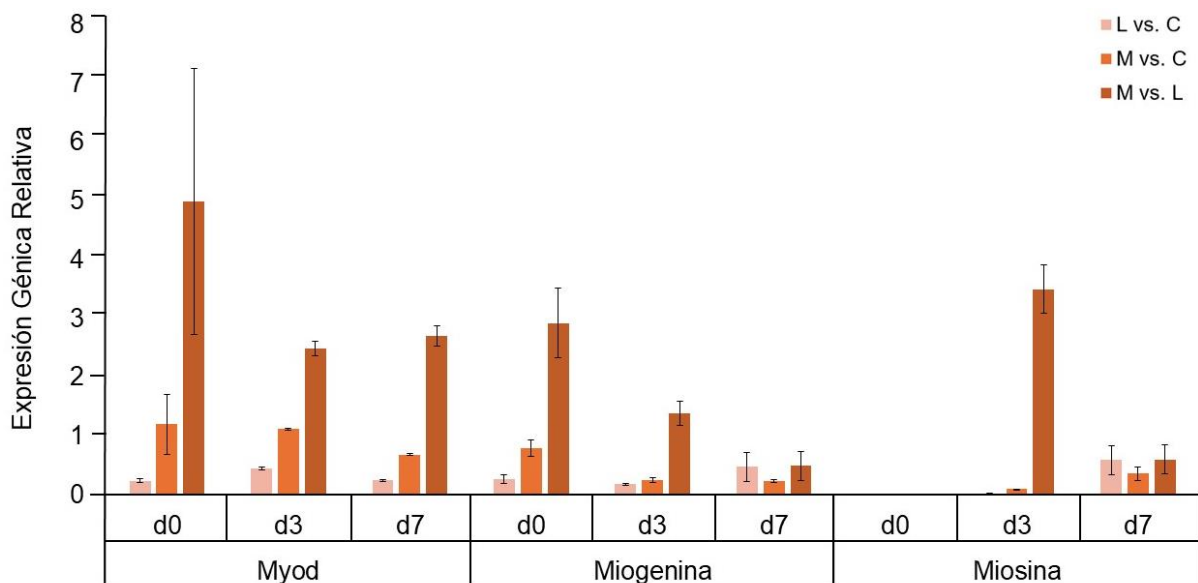


Figura 15: Expresión génica relativa de marcadores de miogénesis en los sistemas control (C), liso (L) y microestructura (M). Los valores de expresión relativa de los genes myod, miogenina y miosina de cadena pesada se midieron a los 0, 3 y 7 días de diferenciación en tres condiciones. Los valores de expresión relativa se obtuvieron comparando directamente los niveles de expresión génica entre estas condiciones (L vs. C, M vs. C y M vs. L).

Para validar que los resultados obtenidos mediante RT-qPCR reflejan adecuadamente la expresión proteica, se realizó un análisis de inmunofluorescencia en los scaffolds microestructurados. Los resultados, mostrados en la Figura 16, evidencian una progresión miogénica clara. El primer marcador en ser detectado fue MyoD, que se expresó a los 0 días de diferenciación. A continuación, la expresión de mioferlina y Myomaker se observó a los 3 y 5 días, respectivamente. Los marcadores de expresión más tardía, miogenina y la miosina de cadena pesada, junto con la proteína de fusión Myomixer, fueron detectados a los 7 días de diferenciación. Aunque se observó una discrepancia en los tiempos de expresión para miogenina y mioferlina en comparación con los resultados de RT-qPCR, los datos de inmunofluorescencia confirman que la expresión proteica sigue el patrón general esperado

para la diferenciación miogénica. Estos hallazgos complementan y respaldan los resultados obtenidos por RT-qPCR, proporcionando una visión más completa del proceso de diferenciación.

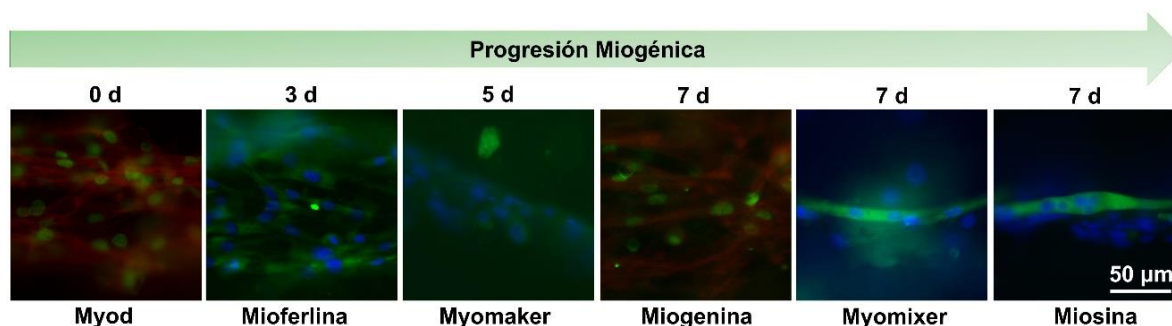


Figura 16: Imágenes de inmunofluorescencia de cultivos celulares que muestran la expresión de proteínas durante la progresión miogénica. Azul, tinción de Hoechst; rojo, tinción de rodamina-faloidina; verde, marcador de interés (myod, mioferlina, myomaker, miogenina, myomixer y miosina de cadena pesada) con el fluoróforo Alexa Flour 488. Barra de escala de 50 μm .

Además, se llevó a cabo una tinción de inmunofluorescencia para identificar la presencia de miosina de cadena pesada en los tres sistemas a tiempo final (7 días post diferenciación) (Fig. 17). Los resultados mostraron la formación de miofibras maduras en todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, en el control (Fig. 17A), las miofibras presentaron ramificaciones, un fenómeno que no ocurre in vivo y que se busca evitar, ya que estas ramificaciones pueden interferir con la funcionalidad del músculo al dificultar la contracción eficiente de las miofibras (Denes et al., 2019). Las miofibras cultivadas en el scaffold liso (Fig. 17B) mostraron una falta de direccionalidad coherente. Esto se contrapone a lo observado en el scaffold microestructurado (Fig. 17C), donde las miofibras están claramente alineadas en una dirección uniforme y son positivas para el marcador de miosina, indicando una diferenciación exitosa. Este patrón de alineación en el scaffold microestructurado resalta su efectividad en promover una organización celular que favorece la funcionalidad muscular.

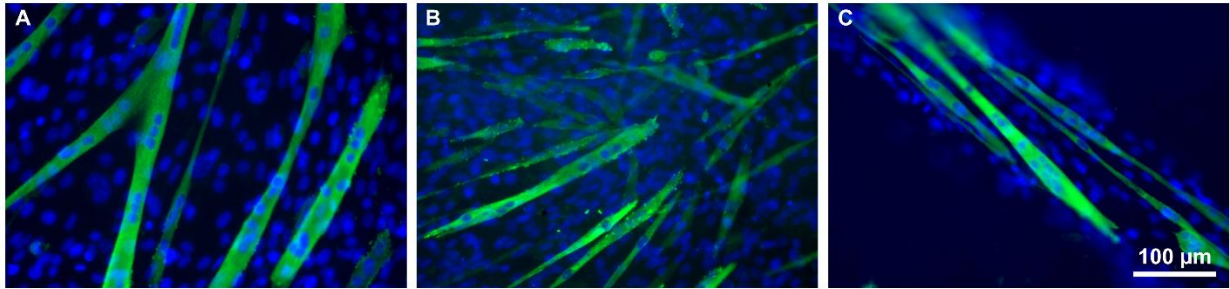


Figura 17: Identificación de miosina de cadena pesada en células musculares creciendo en las situaciones de control (A), scaffold liso (B) y scaffold microestructurado (C). En verde se observan miofibras positivas para miosina de cadena pesada (Alexa Fluor 488) y en azul se observan los núcleos (Hoechst).

4.4 Identificación a través de análisis transcriptómico (RNA seq) la expresión diferencial de genes de las células C2C12, ante la presencia de microcanales, para proponer un modelo de expresión génica que contemple los procesos de miogénesis y fusión celular.

En la sección anterior se analizó la expresión de genes específicos involucrados en los procesos de miogénesis y fusión celular. Sin embargo, este enfoque dirigido no proporciona una visión completa de cómo los scaffolds y su microestructura impactan en la expresión génica global. Para abordar esta limitación, se llevó a cabo una secuenciación del transcriptoma completo utilizando tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Este enfoque integral ofrece una visión general de los cambios en la expresión génica a nivel global, permitiendo descubrir variaciones en los patrones de expresión entre las distintas condiciones, e identificando procesos y vías que pueden verse afectados por la microestructura de los scaffolds, incluso aquellos que inicialmente no se esperaban influenciados.

4.4.1 Exploración del transcriptoma de células musculares al crecer en scaffolds

En este estudio se empleó tecnología de secuenciación de alto rendimiento junto con herramientas bioinformáticas avanzadas para analizar el transcriptoma de células C2C12 (*Mus musculus*) cultivadas en scaffolds con superficies lisas y microestructuradas, además de un control de plástico. Se obtuvieron un promedio de 86.067.975 lecturas sin procesar de las muestras de control, lisas y microestructuradas, distribuidas entre 9 muestras (3 por cada condición), con una lectura limpia promedio de 83.302.338 (Tabla 4). Todo el análisis posterior se basó en estos datos de alta calidad. Las lecturas limpias fueron alineadas con la secuencia del genoma de referencia de ratón (*Mus musculus*), versión GRCm39, obtenida de Ensembl, logrando una alineación aproximada del 94.8% de las transcripciones con el genoma.

Para evaluar los cambios en el transcriptoma entre los diferentes sistemas, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico (Fig. 18A). En este análisis, las muestras se representan en las columnas y se clasifican en función de la abundancia relativa de los genes, con colores que van desde verde para genes con baja abundancia relativa hasta rojo para genes con alta abundancia relativa. Las muestras de control se agruparon en un grupo, mostrando distribuciones de transcriptomas similares. Por otro lado, las muestras cultivadas en scaffolds lisos y microestructurados también tendieron a agruparse juntas. Esto sugiere que el tipo de

scaffold, ya sea plano o microestructurado, tiene un impacto significativo en la expresión génica, diferenciándose claramente de las muestras de control.

Tabla 4: Cantidad de lecturas obtenidas en la secuenciación en los tres sistemas evaluados.

Grupo	Código	Total de bases	Lecturas crudas	Lecturas limpias
Control	C2	6,551,238,586	43,385,686	41,631,020
	C3	8,716,882,398	57,727,698	56,965,038
	C4	6,628,800,038	43,899,338	43,015,412
Liso	F2	9,108,192,556	60,319,156	57,289,794
	F3	15,922,210,402	105,445,102	92,454,178
	F4	16,699,647,794	110,593,694	109,196,306
Microestructurado	M1	13,690,497,446	90,665,546	89,520,814
	M2	28,092,960,194	186,046,094	184,021,086
	M4	11,555,948,762	76,529,462	75,627,400

Para verificar la distribución de las réplicas, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de evaluar la similitud en los perfiles transcriptómicos. Los gráficos de PCA para las réplicas de control, scaffolds lisos y microestructurados (Fig. 18B) revelaron que el primer componente principal explicó el 49.3% de la variabilidad total, mientras que el segundo componente explicó el 14.3%. Cada condición experimental se agrupó claramente, mostrando una separación evidente entre las diferentes condiciones. Esta separación indica una alta consistencia entre las réplicas dentro de cada condición y confirma que las diferencias observadas en la expresión génica están bien diferenciadas entre los tipos de scaffold y el control.

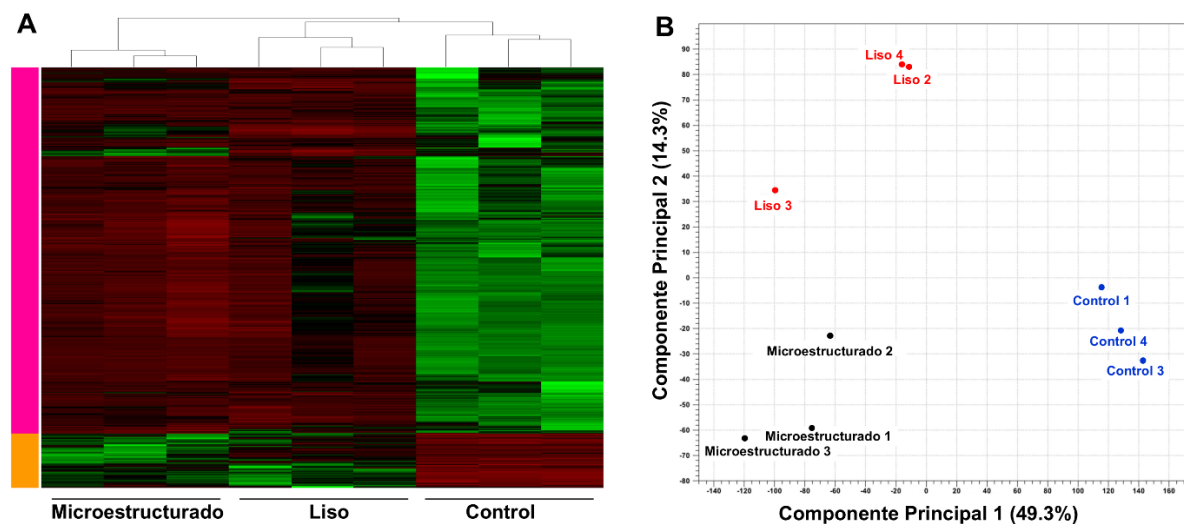


Figura 18: A: Análisis de agrupamiento jerárquico para los perfiles del transcriptoma de muestras de control, planas y microestructuradas. El mapa de calor presenta la abundancia relativa media de los genes con diferentes colores (verde: baja abundancia; rojo: alta abundancia). B: Gráfico de puntuación de PCA de las muestras de control, planas y microestructuradas.

Finalmente, los cambios globales en los perfiles transcriptómicos se visualizan en los gráficos de volcanes presentados en la Figura 19. Estos gráficos destacan los genes diferencialmente expresados, donde los puntos rojos indican genes que están significativamente sobre expresados y los puntos verdes representan genes que están sub expresados. Esta representación facilita la identificación de las diferencias en la expresión génica entre las diferentes condiciones experimentales, permitiendo una evaluación visual clara de cómo los scaffolds y sus características afectan el transcriptoma de las células.

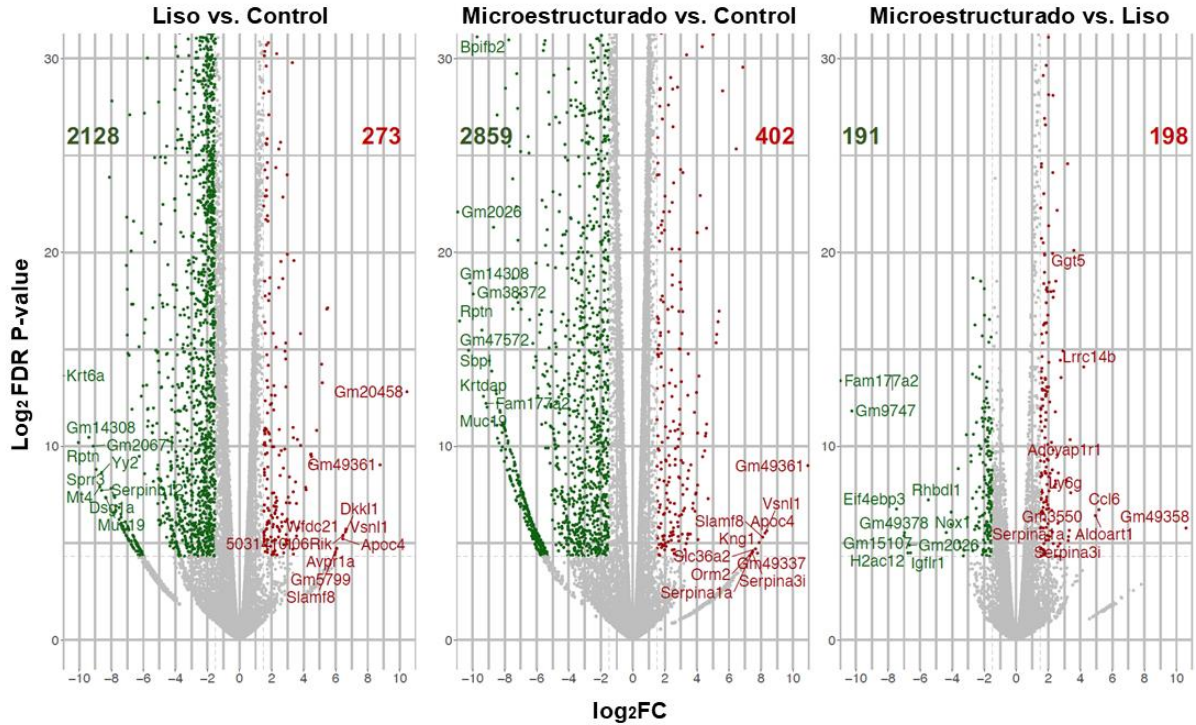


Figura 19: Gráficos de volcán que resaltan la mayoría de los genes expresados de manera diferencial ($\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$; valor p corregido por FDR $< 0,05$) para las tres comparaciones liso versus control, microestructurado versus control y microestructurado versus liso, respectivamente.

Al realizar comparaciones entre las distintas muestras (Figura 20A), se identificaron un total de 6321, 8154 y 1490 genes diferencialmente expresados (GDE) en las comparaciones de scaffolds lisos frente a control (L vs. C), microestructurados frente a control (M vs. C), y microestructurados frente a lisos (M vs. L), respectivamente. Las comparaciones entre L vs. C y M vs. C revelaron una cantidad significativamente mayor de GDE al contrario de la comparación M vs. L, donde se observaron menos GDE. De manera interesante, se identificaron 124 genes que se expresan exclusivamente en la comparación M vs. L. Estos genes están asociados principalmente con proteínas de la categoría de enzimas de interconversión metabólica, seguidas por proteínas citoesqueléticas, enzimas modificadoras de proteínas y transportadores (Fig. 20B). Este hallazgo sugiere que la microestructura de los scaffolds tiene un efecto distintivo en la regulación génica que afecta diversos procesos metabólicos y estructurales dentro de las células.

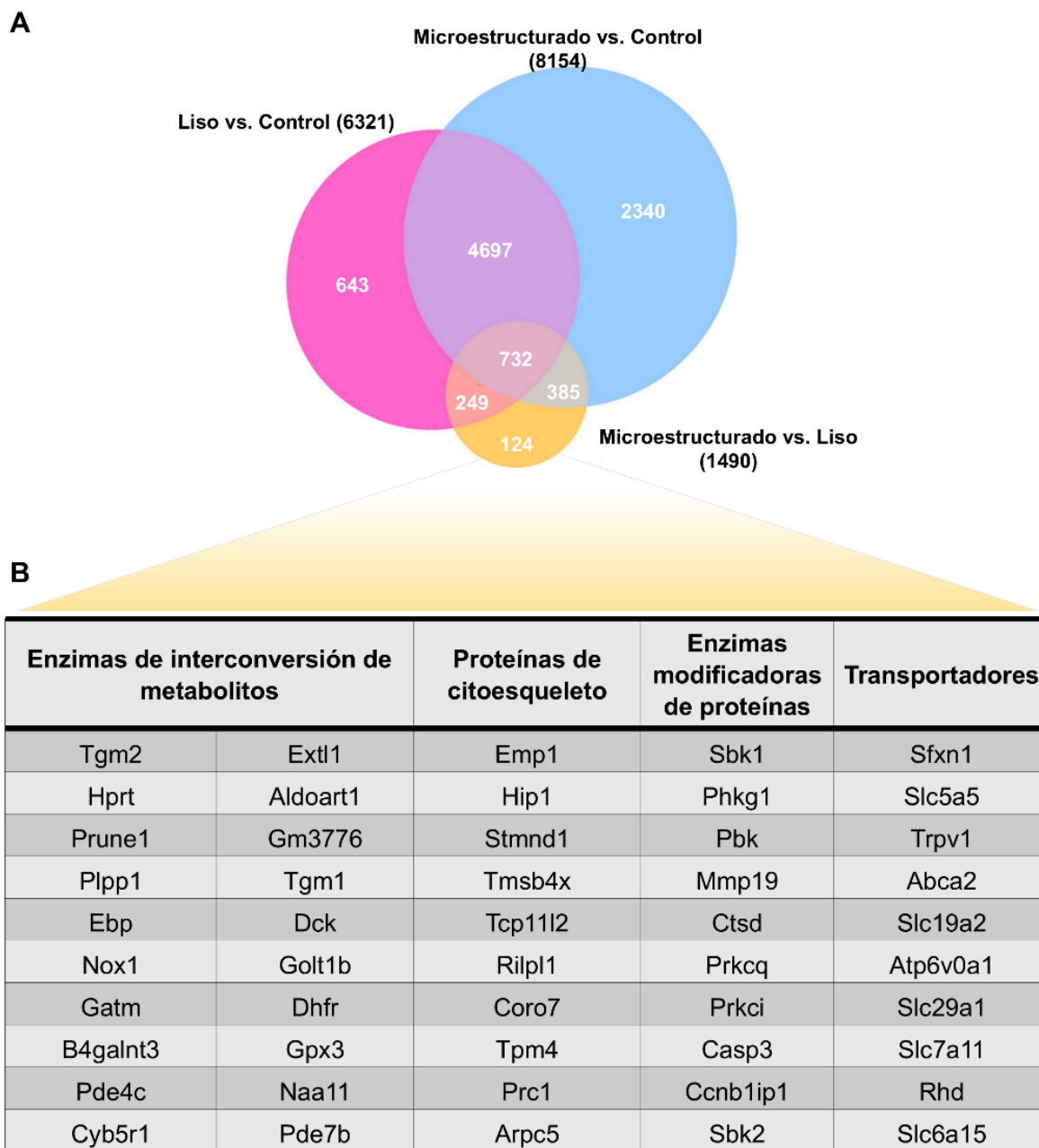


Figura 20: A: Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados por cada tipo de muestra. Los círculos de colores representan la cantidad de GDE para las comparaciones de liso versus control, microestructurado versus control y microestructurado versus liso respectivamente. Un total de 6321, 8154 y 1490 GDE se expresaron de manera diferencial ($FC > 1,5$; valor p corregido por $FDR < 0,05$) para liso versus control, microestructurado versus control y microestructurado versus liso respectivamente. B: Tabla con los 124 genes encontrados exclusivamente en la comparación de M vs. L, y sus respectivas categorías.

En nuestras comparaciones generales, observamos que los genes con las regulaciones positivas y negativas más significativas carecen de funciones anotadas en la literatura (Tabla 5). Sin embargo, las diferencias significativas en su expresión entre las distintas condiciones sugieren que estos genes podrían estar potencialmente implicados en procesos celulares relevantes durante el desarrollo y la diferenciación de las fibras musculares. Además, de acuerdo con la base de datos Mouse Genome Informatics (<https://www.informatics.jax.org/>), se ha documentado la expresión de estos genes durante el desarrollo embrionario.

En particular, el gen Gm2026, que muestra una sub-regulación en las comparaciones M vs. C y M vs. L, se expresa en las extremidades, el sistema nervioso y el sistema reproductivo. Los genes Gm38372 y Gm47572, también regulados negativamente en la comparación M vs. C, tienen una expresión generalizada en la mayoría de los sistemas. Por último, Gm14308 está exclusivamente presente en el hígado y el sistema biliar. Estos hallazgos podrían proporcionar indicios sobre el papel potencial de estos genes en los procesos de diferenciación y desarrollo muscular.

Para obtener una visión más profunda sobre las posibles funciones moleculares de los genes identificados, se realizaron búsquedas de homología utilizando BLAST y análisis de dominios.

- Gm20458 mostró como mejor resultado de BLAST una proteína de isoforma X3 homóloga a SYS1 de *Myodes glareolus*. Esta proteína se caracteriza por ser una proteína de membrana integral que se une a la red trans de Golgi, con la anotación PFAM09801. Esto sugiere un posible papel en el tráfico de proteínas dentro de la célula.
- Gm49361 pertenece a la familia de la serina/treonina-proteína quinasa LATS2 (isoforma X1). Esta información sugiere que Gm49361 podría estar implicado en la transducción de señales durante el desarrollo muscular, dado que las quinasas LATS2 están involucradas en diversas vías de señalización celular.
- Gm5799 se alinea con la superfamilia takusan (PFAM04822), una amplia familia de proteínas aún no completamente caracterizadas.
- Gm20671 mostró como mejor resultado de BLAST una proteína PRR14L de *Fukomys damarensis* (con un 80% de identidad y un 100% de cobertura de consulta). El análisis de dominios y motivos indica que la proteína codificada por Gm20671 contiene un dominio C2H2, de caja KRAB y dedo de zinc. Estos dominios están asociados con la

regulación transcripcional, sugiriendo que Gm20671 podría desempeñar un papel en la regulación de la expresión génica.

Tabla 5: Selección de los 20 genes más sobre y sub regulados en las tres comparaciones estudiadas.

	Liso vs. Control			Microestructurado vs. Control			Microestructurado vs. Liso		
	Símbolo	Nombre	Log Fold Change	Símbolo	Nombre	Log Fold Change	Símbolo	Nombre	Log Fold Change
Sobre- Regulados	Gm20458	Predicted Gene 20458	10,45	Gm49361	Predicted Gene, 49361	10,92	Gm49358	Predicted Gene, 49358	10,60
	Gm49361	Predicted Gene, 49361	8,77	Apoc4	Apolipoprotein C-IV	8,36	Ccl6	Chemokine (C-C Motif) Ligand 6	5,16
	Wfdc21	WAP Four-Disulfide Core Domain 21	6,64	Vsnl1	Visinin-Like 1	8,25	Aldoat1	Aldolase 1 A, Retrogene 1	4,94
	Dkk1	Dickkopf-Like 1	6,62	Slamf8	SLAM Family Member 8	8,10	Lrrc14b	Leucine Rich Repeat Containing 14B	4,21
	Vsnl1	Visinin-Like 1	6,45	Kng1	Kininogen 1	7,88	Ggt5	Gamma-Glutamyltransferase 5	3,59
	5031410I06Rik	RIKEN Cdna 5031410I06 Gene	6,45	Gm49337	Predicted Gene, 49337	7,78	Ly6g	Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus G	3,40
	Apoc4	Apolipoprotein C-IV	6,44	Slc36a2	Solute Carrier Family 36 (Proton/Amino Acid Symporter), Member 2	7,66	Adcyap1r1	Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 1 Receptor 1	3,36
	Slamf8	SLAM Family Member 8	6,06	Orm2	Orosomucoid 2	7,48	Gm3550	Ribosomal Protein L29, Retrotransposed	3,31
	Gm5799	Predicted Gene 5799	6,06	Serpina1a	Serine (Or Cysteine) Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 1A	7,47	Serpina1a	Serine (Or Cysteine) Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 1A	3,26

	Avpr1a	Arginine Vasopressin Receptor 1A	5,98	Serpina3i	Serine (Or Cysteine) Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 3I	7,43	Serpina3i	Serine (Or Cysteine) Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 3I	3,24
Sub- Regulados	Muc19	Mucin 19	-8,34	Muc19	Mucin 19	-9,09	Gm20458	Predicted Gene 20458	-4,06
	Dsg1a	Desmoglein 1 Alpha	-8,36	Fam177a2	Family With Sequence Similarity 177 Member A2	-9,16	Zfp273	Zinc Finger Protein 273	-4,06
	Yy2	Yy2 Transcription Factor	-8,61	Krtdap	Keratinocyte Differentiation Associated Protein	-9,32	Nox1	NADPH Oxidase 1	-4,37
	Serpina12	Serine (Or Cysteine) Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 12	-8,61	Gm47572	Predicted Gene, 47572	-9,42	Rhbd1l1	Rhomboid Like 1	-5,48
	Mt4	Metallothionein 4	-8,72	Bpifb2	BPI Fold Containing Family B, Member 2	-9,72	Igflr1	IGF-Like Family Receptor 1	-6,59
	Sprr3	Small Proline-Rich Protein 3	-8,95	Gm38372	Predicted Gene, 38372	-9,96	Gm2026	Predicted Gene 2026	-6,67
	Gm20671	Predicted Gene 20671	-9,13	Gm14308	Predicted Gene 14308	-10,17	H2ac12	H2A Clustered Histone 12	-6,76
	Gm14308	Predicted Gene 14308	-9,40	Sbpl	Spermine Binding Protein-Like	-10,25	Gm49378	Predicted Gene, 49378	-6,97
	Rptn	Repetin	-10,05	Rptn	Repetin	-10,81	Gm15107	Predicted Gene 15107	-7,00
	Krt6a	Keratin 6A	-11,76	Gm2026	Predicted Gene 2026	-10,93	Eif4ebp3	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 3	-7,47

Referente a los genes que sí se encuentran caracterizados y cuya función sí se conoce, podemos observar en la Tabla 5 que en la comparación L vs. C, podemos destacar entre los genes más sobre regulados, aquellos que participan en la activación enzimática (Wfdc21, Log FC: 6.64), actividad de unión a correceptor (Dkk1, Log FC : 6,62) y actividad de unión a calcio (Vsnl1, Log FC: 6,45); en cuanto a los que están sub regulados podemos encontrar genes como Krt6a (Log FC: -11.76), que codifica la queratina, una proteína estructural que forma parte del citoesqueleto, Rptn (Log FC: -10.05), que codifica la reptina, una proteína de la matriz extracelular, y Sprr3 (Log FC: -8,95) que participa en los procesos de queratinización.

En la comparación M vs. C, algunos de los genes más regulados corresponden a Apoc4 (Log FC: 8.36) que participa en el transporte de lípidos, Slamf8 (Log FC: 8.10) que permite una actividad de unión a proteínas idéntica, y Kng1 (Log FC: 7.88) que participa en respuesta al estímulo. En cuanto a los genes más sub regulados encontramos los que participan en la actividad de unión a lípidos (Bpifb2, Log FC: -9.72), el desarrollo de la epidermis (Krtap, LogFC: -9.32) y el desarrollo de las glándulas salivales (Muc19, Log FC: -9,09).

Finalmente, los genes más regulados en M vs. L son Ccl6 (Log FC: 5.16) que participa en procesos del sistema inmunológico, Aldoat1 (Log FC: 4.94) proceso glicolítico y Ggt5 (Log FC: 3.59) que tiene actividad hidrolasa. En cuanto a los genes con menor expresión, estos son Eif4ebp3 (Log FC: -7,47), que participa en la regulación de la traducción, H2ac12 (Log FC: -6,76), que participa en la unión del ADN, e Igflr1 (Log FC: -6,59), que participa en la unión de proteínas.

Además de estas observaciones, nuestro análisis reveló una expresión diferencial de genes con niveles medios y moderados dentro de la comparación M vs. L. En particular, identificamos genes responsables de codificar componentes estructurales de la matriz extracelular, como la elastina (Eln, Log FC: 2,62) y la cadena alfa-1(X) del colágeno (Col10a1, Log FC: 2,52). Además, se identificaron genes que codifican proteínas estructurales del sarcómero como miosina, polipéptido pesado 2 (Myh2, Log FC: 2,25), miosina XVIIIb (Myh18b, Log FC: 2), obscurina (Obscn, Log FC: 2,17) y nebulina (Neb, Log FC: 2,02).

El colágeno y la elastina son parte integral de los componentes fibrilares de la matriz extracelular (ECM) en el músculo esquelético, que comprende el endomisio, el perimisio y el epimisio, que envuelven el músculo. La matriz extracelular del músculo contribuye

significativamente a la transmisión de fuerzas contráctiles, así como a los procesos de desarrollo, crecimiento y reparación muscular (Csapo et al., 2020).

Los genes que muestran expresión diferencial también están asociados con la formación de sarcómeros, fundamentales tanto en la estructura como en la función del tejido muscular. Entre estos genes, se destaca miosina, una proteína esencial del sarcómero que juega un papel crucial en la contracción muscular al interactuar con la actina (Z. Wang et al., 2021). Además de la miosina, nuestro análisis reveló una mayor expresión de genes que codifican para nebulina y obscurina, ambos componentes importantes en la estructura y función del sarcómero, siendo nebulina vital para la regulación de las interacciones entre actina y miosina, la captación de calcio en el retículo sarcoplásmico y la alineación de los discos Z, contribuyendo así a la estabilidad y organización del sarcómero. La obscurina desempeña un papel crucial en la miofibrillogénesis, facilitando la formación de la banda A del sarcómero, la incorporación de miosina y el anclaje del sarcómero al retículo sarcoplásmico (Henderson et al., 2017). Estos hallazgos sugieren que la microestructura del scaffold puede promover un ambiente que favorece la formación de estructuras sarcoméricas más completas y funcionales, al incrementar la expresión de genes clave para la formación y organización de los sarcómeros.

La identificación de la expresión diferencial en genes que codifican proteínas asociadas con la matriz extracelular y las funciones estructurales del sarcómero ofrece valiosa información sobre cómo los scaffolds microestructurados modulan la expresión de genes implicados en la estructura y función del músculo esquelético. Este análisis destaca el impacto diferencial que los scaffolds microestructurados tienen en comparación con los scaffolds lisos. Al evidenciar un mayor nivel de expresión de genes cruciales para la formación y organización del sarcómero, estos resultados sugieren que los scaffolds microestructurados proporcionan un entorno más propicio para el desarrollo y la funcionalidad del músculo, promoviendo una organización estructural más avanzada y eficiente.

4.4.2 Respuesta transcripcional de las fibras musculares utilizando ontología genética y modelado de redes genéticas.

Se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de términos de ontología genética (GO) para clasificar las funciones de los genes expresados diferencialmente en cada comparación. En las comparaciones L vs. C y M vs. C, se identificaron genes asociados con procesos biológicos generales, como traducción, ciclo celular, procesos catabólicos y biosintéticos. Sin embargo,

el análisis para la comparación M vs. L reveló un alto índice de enriquecimiento en categorías específicas relacionadas con el desarrollo del músculo esquelético (Fig. 21). Este hallazgo sugiere que la microestructura de los scaffolds tiene un impacto significativo en la regulación de genes clave para la formación y maduración del músculo, destacando su papel crucial en la optimización del entorno para la diferenciación y funcionalidad muscular.



Figura 21: Análisis de enriquecimiento de términos GO de genes expresados diferencialmente encontrados en la comparación Microestructurado versus Liso, en la categoría de Proceso biológico.

La relación entre las proteínas asociadas con los GDE de los términos GO para la comparación M vs. L se ilustra como redes de interacción de proteínas generadas utilizando String y Cytoscape (Figura 22) donde los nodos con mayor número de interacciones se representan en un tamaño mayor. Los nodos verdes representan genes regulados positivamente y los rojos representan genes regulados negativamente. Los colores de las líneas corresponden al tipo de interacción indicando: gris: fusión de genes; naranja: homología; azul: coexpresión; amarillo: interacción determinada experimentalmente; verde: anotada en bases de datos; rojo: minería de texto automatizada.

Entre las categorías relevantes encontradas podemos destacar el deslizamiento de filamentos, la contracción muscular y la organización de sarcómeros. Estos resultados son una evidencia

clara de los cambios asociados con el desarrollo muscular cuando la microestructura está presente en el scaffold, que fue diseñado para mejorar la alineación de las células musculares. A continuación, se describe un análisis detallado de cada categoría mencionada anteriormente.

4.4.2.1. Deslizamiento del filamento

Las células musculares están formadas por miofibrillas, que a su vez están compuestas por filamentos finos y gruesos organizados axialmente a lo largo de las células. Los filamentos delgados están formados principalmente por monómeros de actina, mientras que los filamentos gruesos están compuestos por miosina. La contracción muscular resulta del deslizamiento de estos filamentos entre sí, lo que provoca el acortamiento de las fibras musculares (Powers et al., 2021). Nuestros resultados indican que, al comparar los scaffolds microestructurados con los planos, se observan genes regulados positivamente que están asociados con estos filamentos, especialmente aquellos relacionados con la miosina pesada (Myh7, Myh6, Myh8) y la cadena ligera (Myl6b) (Fig. 22A). Este hallazgo sugiere una mejora en los procesos relacionados con el deslizamiento de los filamentos. Además, el gen tropomiosina 1 (Tpm1), que también está regulado positivamente, muestra interacciones con todos los componentes de la red de proteínas asociada a esta categoría. De estos componentes, tres (Myh8, Myh6 y Tnnt2) han sido confirmados experimentalmente, como se reporta en la plataforma String.

4.4.2.2. Contracción muscular

Además de la actina y la miosina, otras proteínas clave en la contracción muscular incluyen la troponina, la titina y la Tcap. En nuestros análisis, se observó que todos los genes que codifican estas proteínas están regulados positivamente en el scaffold microestructurado en comparación con el scaffold liso (Fig. 22B). La troponina inicia la contracción muscular al unirse al Ca^{+2} , lo que provoca cambios conformacionales que exponen los sitios de unión de la miosina. Concurrentemente, la titina actúa como una plantilla molecular que mantiene la longitud de los filamentos durante la contracción longitudinal (Mukund & Subramaniam, 2020). En el análisis de interacción en red, se observa que la mayoría de los genes interactúan entre sí, a excepción de Stac3, que solo muestra interacción con Tnnt3 y Jrsp1.

4.4.2.3. Organización sarcómero

Los sarcómeros son la unidad funcional del músculo, responsables de generar fuerza y soportar carga. La estructura del sarcómero se organiza en varias zonas: la banda I,

Capítulo 5

Discusión

Los scaffolds utilizados en esta tesis se desarrollaron empleando biomateriales comestibles no derivados de mamíferos y considerando las dimensiones del diámetro de las miofibras que se encuentran en los animales comúnmente utilizados para consumo. Entre los métodos de fabricación evaluados, el scaffold producido mediante la técnica de solvent casting demostró ser el más adecuado, ya que facilitó la alineación de las células musculares.

En contraste, aunque la técnica de electrospinning permitió la fabricación de microcanales paralelos, estos no produjeron el efecto de alineación celular esperado. Esto se debe probablemente a que el ancho de los microcanales resultantes, de aproximadamente 400 μm , era demasiado amplio para inducir un efecto significativo en la alineación celular. A pesar de la alineación a nivel de nanofibras observada, la alineación de las células no fue paralela a los microcanales, sino perpendicular, lo que no cumplió con las expectativas iniciales.

Por lo anterior se decidió desarrollar el resto de esta tesis utilizando scaffolds fabricados con la técnica de solvent casting y se evaluó, más allá de un aspecto morfológico, el efecto de la alineación celular. Los aspectos evaluados fueron la expresión de marcadores miogénicos, de fusión celular y expresión transcriptómica en general.

La miogénesis, proceso de formación muscular, se divide en etapas tempranas, medias y tardías, en función del estado de las células y los marcadores que expresan. Los marcadores comúnmente utilizados para identificar estas etapas son MyoD (temprana), miogenina (media) y miosina de cadena pesada (tardía) (Schmidt et al., 2019). La fusión celular, crucial para la miogénesis, permite la formación de miofibras multinucleadas al fusionarse células individuales que luego compartirán núcleos. Proteínas clave en este proceso incluyen Myomaker, Myomixer y Mioferlina (Lehka & Rędowicz, 2020). La identificación de estos marcadores se llevó a cabo utilizando la técnica de RT-qPCR, mediante la fabricación de primers específicos para las secuencias génicas asociadas con la expresión de estas proteínas.

Para evaluar el efecto de los microcanales, se realizó la extracción de ARN de células luego de 0, 3 y 7 días post diferenciación, creciendo en los scaffolds liso, microestructurados y en placas de cultivo plásticas (control). La comparación con el plástico (L vs. C) nos habla del

efecto del biomaterial sobre las células, y la comparación entre microcanales y liso (M vs. L), nos habla del verdadero efecto de la alineación de las células en su expresión génica.

Se realizó un análisis de componente principal (Fig. 24) para evaluar la relación entre los genes. Los resultados indican que el 61,5% de la variabilidad se explica por el primer componente principal (PC1) que incluye los genes myod, miogenina, myomaker, miosina de cadena pesada y miomixer, es decir, todos los genes evaluados, excepto mioferlina. El segundo componente principal (PC2), que explica el 22,9% de la variabilidad, está asociado con la expresión de mioferlina, lo que sugiere que este gen no está correlacionado con los otros genes evaluados. Además, en el PC2 se observa que Ld7 se distingue de Md0 y Md3, lo que podría indicar que mioferlina está subregulado por la microestructura durante las etapas tempranas de la miogénesis.

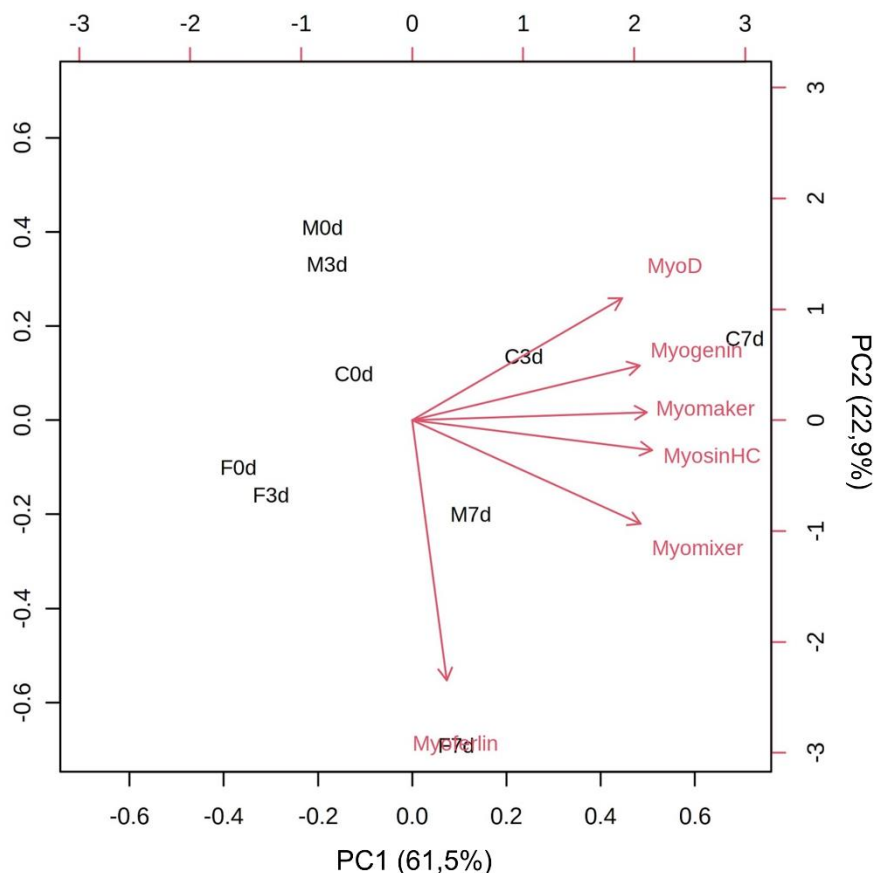


Figura 24: Análisis de componente principal donde se observan las variables evaluadas.

En la Tabla 6 se presenta una matriz de correlación de Pearson, que muestra el grado de relación entre dos variables. Los valores cercanos a 1 indican una fuerte relación, mientras

que los valores cercanos a -1 reflejan una relación débil. Entre los resultados, se destaca la fuerte correlación entre miosina de cadena pesada y miogenina (0,873), miosina y myomixer (0,773), myod y myomaker (0,766), myomixer y myomaker (0,696), miosina y myomaker (0,668), miogenina y myomaker (0,645), y myod y myomixer (0,588). Es importante señalar que mioferlina fue la única variable que no mostró una correlación significativa con las demás.

Tabla 6: Matriz de correlación de Pearson de la expresión génica.

	Myomaker	Myomixer	Mioferlina	Myod	Miogenina
Myomixer	0.696**				
Mioferlina	0.129	0.472			
Myod	0.766**	0.588*	-0.317		
Miogenina	0.645*	0.553	-0.094	0.610	
Miosina	0.668**	0.773	0.180	0.512	0.873***

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento jerárquico (Fig. 25) que reveló varios clusters: uno formado por los genes miosina y miogenina, otro que agrupa a miosina, miogenina y myomixer, y un tercero que incluye a myod y myomaker. Mioferlina quedó fuera de estos grupos, lo que concuerda con los hallazgos del análisis de componentes principales.

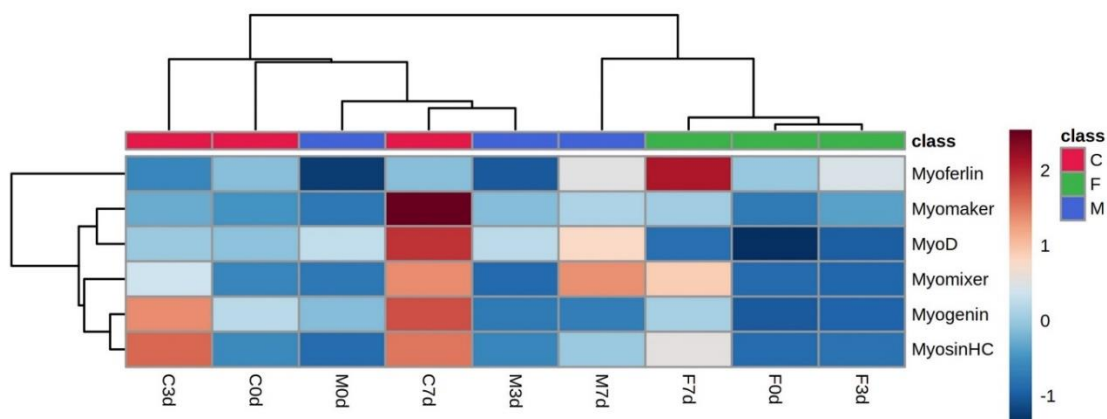


Figura 25: Análisis de agrupamiento jerárquico con los resultados de expresión génica, usando distancia de correlación de Pearson y enlace promedio.

A partir de estos análisis bioestadísticos, se propuso un modelo de expresión génica a lo largo del tiempo que facilita la comprensión de cómo estos genes interactúan con la microestructura del scaffold (Fig. 26). Este modelo sugiere que el uso de scaffolds microestructurados puede generar limitaciones en la disponibilidad de oxígeno (Jaques et al., 2021) en comparación con scaffolds lisos. La reducción en el suministro de oxígeno intensifica la glicólisis, lo que a su vez incrementa la producción de lactato, caracterizando así un entorno anaeróbico.

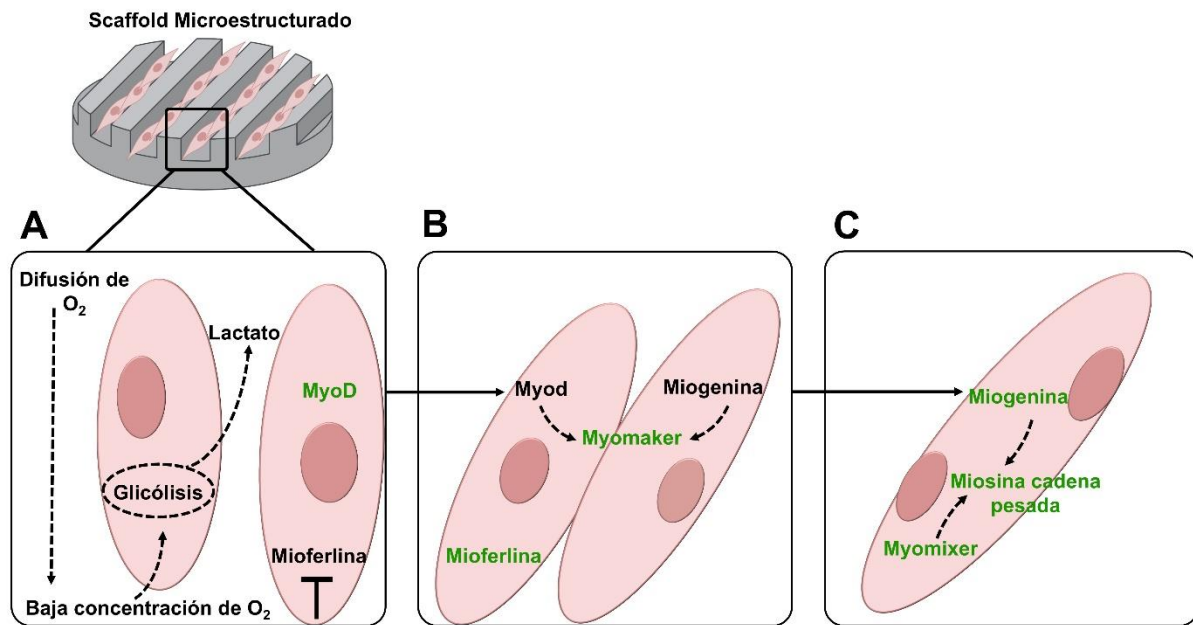


Figura 26: Modelo esquemático del efecto de la microestructura de los scaffolds en la interacción de los genes de miogénesis y fusión celular. En (A) se muestra el efecto de los microcanales en la difusión de oxígeno, lo cual produce un aumento en la glicólisis que a su vez aumenta la producción de lactato, lo cual ha demostrado ser un factor que influye en la expresión de MyoD. Además, se observa una baja en la expresión de mioferlina en la primera etapa de la miogénesis. En la etapa media de miogénesis (B) se observa la expresión de mioferlina y la relación entre la expresión de MyoD y Miogenina, que se relaciona directamente con la expresión de myomaker, participante del proceso de fusión celular. Finalmente, en la etapa final de miogénesis se observa la miofibra ya formada por la fusión de los mioblastos, con la característica morfología alargada y multinucleada. También se observa que en esta etapa ocurrió expresión de miogenina y miomixer, cuya expresión se encuentra relacionada con la expresión de miosina de cadena pesada, indicador de formación de miofibra madura.

Además, se ha reportado que myod está regulado por la hipoxia, lo que activa el mecanismo de regeneración muscular en respuesta a lesiones (Yun et al., 2005). Por lo tanto, se puede anticipar una expresión temprana de myod en sistemas de scaffolds microestructurados (Fig.

26A), lo cual es consistente con los resultados mostrados en la Figura 15, donde la expresión de myod fue significativamente mayor en el grupo M vs. F, a diferencia del grupo F vs. C. Es bien conocido que myod es uno de los primeros marcadores de la miogénesis temprana, y su expresión inicia el proceso de miogénesis. Posteriormente, se espera la expresión de miogenina, que a su vez activa la expresión de elementos contráctiles como la miosina de cadena pesada (Elashry et al., 2022). Esto coincide con nuestros resultados, que muestran una fuerte correlación estadística entre miogenina y miosina.

Myomaker y myomixer son proteínas cruciales para la fusión de células musculares, desempeñando roles fundamentales en los procesos de hemifusión y en la formación del poro de fusión (Leikina et al., 2018). Consistente con nuestro modelo, se ha reportado previamente que la expresión de myomaker está regulada por myod y miogenina (W. Luo et al., 2015).

En cuanto a la expresión de mioferlina, otra proteína involucrada en la fusión de células musculares, se observó que está afectada por el uso del scaffold microestructurado. La expresión de mioferlina aumentó con el tiempo en ambos tipos de scaffolds, liso y microestructurado. Sin embargo, la tasa de aumento fue más lenta en el scaffold microestructurado, lo que podría sugerir una regulación negativa inducida por la presencia de los microcanales.

Es ampliamente reconocido que los scaffolds son esenciales para la industria de la carne cultivada, ya que proporcionan una matriz necesaria para el cultivo de células dependientes de anclaje, como las células musculares, permitiendo su proliferación y diferenciación (Post et al., 2020). En este contexto, el modelo presentado en este estudio ayuda a comprender el papel de los scaffolds microestructurados en la producción de carne cultivada.

Una característica fundamental de los scaffolds en esta industria es su capacidad para permitir una organización celular que imite la estructura del músculo, es decir, estructuras alineadas (Kumar et al., 2023). La alineación celular es crucial para la producción de carne cultivada, y nuestros hallazgos subrayan el papel de los genes miogénicos y de fusión en la organización celular cuando se utilizan scaffolds microestructurados. Finalmente, acá proponemos un modelo que explica la expresión de marcadores de fusión y miogénicos, facilitando la comprensión de los procesos asociados con la producción de carne cultivada mediante el uso de estos scaffolds.

Capítulo 6

Conclusiones

En esta tesis se desarrollaron dos scaffolds comestibles a partir de biomateriales no derivados de mamíferos, diseñados para su uso en la producción de carne cultivada. Los scaffolds se fabricaron utilizando las técnicas de solvent casting y electrospinning, ambos con microcanales paralelos, con el fin de facilitar la alineación de las células musculares.

A partir de las observaciones de alineación celular, se determinó que el scaffold fabricado con la técnica de solvent casting cumplió con los resultados esperados, mostrando una morfología celular que imitaba la de las miofibras, con células alargadas y multinucleadas. Debido a estos resultados prometedores, se seleccionó este scaffold para evaluar su influencia en los procesos de miogénesis y fusión celular, fundamentales para el desarrollo de carne cultivada. Se realizaron evaluaciones de expresión génica de marcadores específicos y de transcriptoma completo, obteniendo resultados que permitieron establecer una relación entre la microestructura del scaffold y la expresión génica, así como diversos procesos celulares asociados.

El desarrollo de este scaffold microestructurado comestible, fabricado a partir de biopolímeros marinos, representa un avance significativo en el campo de la producción de carne cultivada. Este scaffold ha demostrado guiar de manera efectiva la alineación de las células musculares dentro de los microcanales, promoviendo la formación de estructuras alargadas y multinucleadas que imitan las miofibras y el tejido muscular in vivo.

A través de análisis de expresión genética utilizando la técnica de RT-qPCR, se han elucidado las interacciones clave entre los marcadores de fusión (mioferlina, myomaker y myomixer) y los marcadores miogénicos (myod, miogenina y miosina de cadena pesada), destacando el papel crucial de la microestructura en la progresión de la miogénesis. Esta investigación no solo mejora nuestra comprensión de cómo las microestructuras influyen en la producción de carne cultivada, sino que también establece un modelo para guiar estrategias futuras en la optimización de metodologías para el cultivo de células musculares. El scaffold desarrollado ofrece una solución de fácil producción, utilizando biomateriales comestibles y de manejo sencillo, adecuado para su aplicación en cultivos de células musculares.

Además, los datos transcriptómicos obtenidos en este estudio destacan diversos perfiles de expresión genética asociados con el uso de scaffolds microestructurados. En particular, enfatizando la función de genes relacionados con la organización de sarcómeros, la contracción muscular y el ensamblaje de miofibrillas. La regulación negativa observada en los genes responsables de la proliferación celular sugiere que el scaffold puede influir en los procesos de diferenciación celular al inhibir la proliferación.

Estos hallazgos resaltan la capacidad del scaffold para crear un entorno que favorezca la diferenciación de mioblastos. En esencia, este scaffold no solo tiene implicaciones prácticas para mejorar la eficiencia en la producción de carne cultivada, sino que también establece un precedente para futuros avances en tecnologías de biofabricación, orientadas hacia una producción alimentaria más sostenible.

Capítulo 7

Recomendaciones: Trabajo futuro

Los scaffolds fabricados mediante la técnica de electrospinning con un colector estático que incorpora microcanales presentaron ciertas limitaciones. Aunque se logró la alineación de las nanofibras, estas se dispusieron principalmente de manera perpendicular a las crestas de los microcanales. Esto resultó en una orientación de las células también perpendicular a los microcanales, lo cual no era el resultado deseado, ya que se esperaba que las células se alinearan de forma paralela a los microcanales para favorecer la formación de miofibras maduras.

Dado las limitaciones con el sistema de electrospinning utilizando el colector estático microestructurado, se diseñó un colector rotatorio para el sistema. Según la literatura consultada, un colector rotatorio operando a una frecuencia de 3000 revoluciones por minuto (RPM) o superior, debería permitir la alineación adecuada de las nanofibras (Luo et al., 2018; Wang et al., 2021). Se logró elaborar con éxito los nuevos scaffolds operando el colector rotatorio a 1000 y 3000 RPM. Se realizaron imágenes con SEM (Fig. 27) y análisis de orientación de nanofibras (Fig. 28), donde se observó que efectivamente se logró alineación de nanofibras en el scaffold fabricado a 3000 RPM, no así al utilizarlo con 1000 RPM.

Posteriormente se evaluó la morfología de las células al crecer en los scaffolds (Fig. 29). Se cultivaron las células a una densidad de 2×10^4 células por cm^2 , durante 72 horas y luego se realizó tinción de fluorescencia con Sytox Green y Rodamina Faloidina, para su posterior observación con microscopía láser confocal de fluorescencia. Se observa que al crecer las células en el scaffold de nanofibras alineadas presentan una clara alineación paralelas entre ellas (Fig. 29A), mientras que en los scaffolds sin alineación de nanofibras, no se observa esta alineación, más bien las células crecieron individualmente con la morfología deseada, pero colectivamente no se logró la alineación (Fig. 29B).

Esta mejora en el sistema de electrospinning se realizó hacia el final del trabajo doctoral, por lo que no se pudieron hacer más experimentos para evaluar más a fondo el efecto del alineamiento de las nanofibras en la expresión de distintos genes. Por lo anterior, como trabajo futuro para mejorar los resultados de este proyecto, se sugiere continuar con los scaffolds fabricados con la técnica de electrospinning con alineación de nanofibras, ya que se obtiene

un material comestible, fabricado con biomateriales no derivados de mamíferos, de fácil producción y con excelentes resultados de morfología celular y alineación.

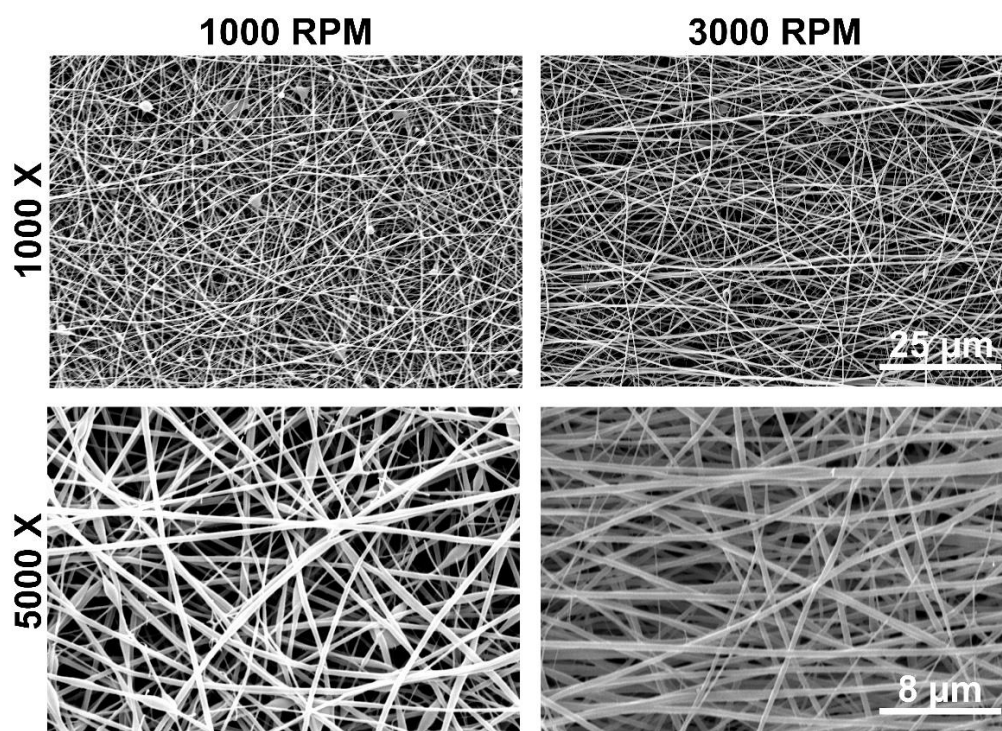


Figura 27: Imágenes de SEM de los scaffolds fabricados con la técnica de electrospinning utilizando colector rotatorio a 1000 y 3000 RPM. Se muestran dos distintas magnificaciones para observar la superficie obtenida (1000X) y el detalle de las nanofibras (5000X).

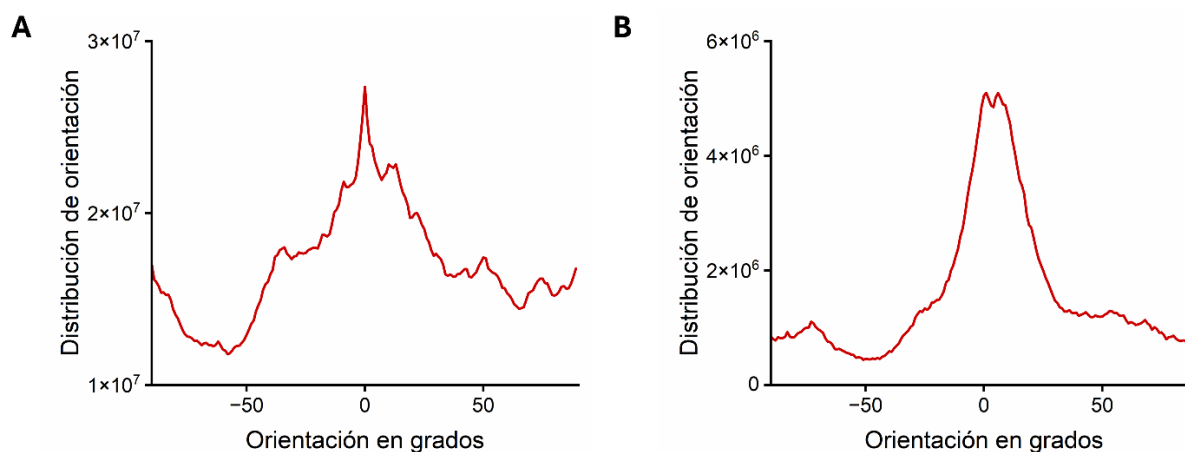


Figura 28: Análisis de orientación de nanofibras en scaffolds fabricados con colector rotatorio a 1000 RPM (A) y a 3000 RPM (B).

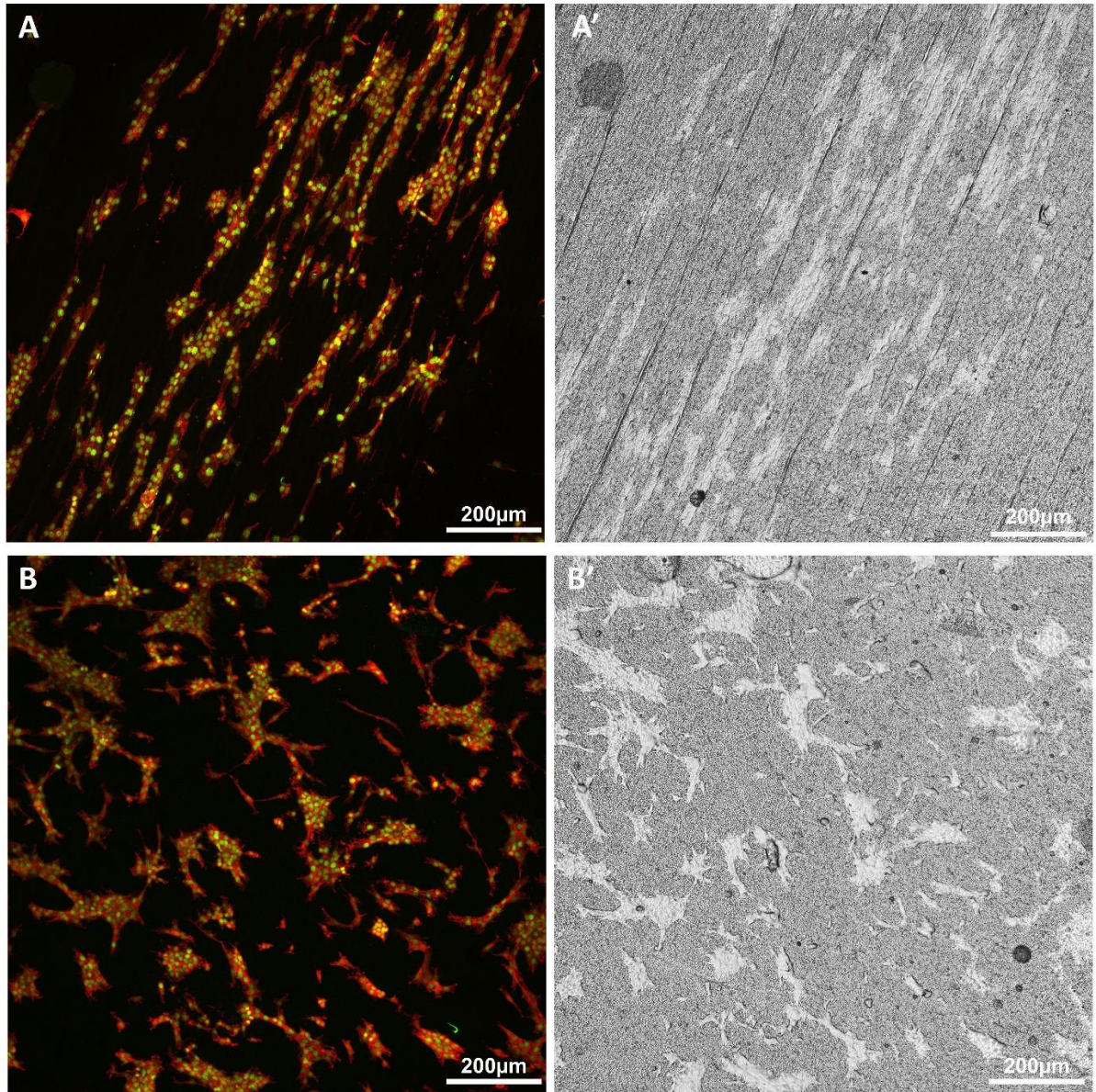


Figura 29: Cultivo de células musculares sobre scaffolds electrohilados fabricados con colector rotatorio. A: Células sobre scaffold alineado. A': Imagen de campo claro de scaffold alineado con células. B: Células sobre scaffold con nanofibras organizadas aleatoriamente. B': Imagen de campo claro de sobre scaffold con nanofibras organizadas aleatoriamente y con células.

Referencias

- Acevedo, C. A., Orellana, N., Avarias, K., Ortiz, R., Benavente, D., & Prieto, P. (2018). Micropatterning Technology to Design an Edible Film for In Vitro Meat Production. *Food and Bioprocess Technology*, 11(7), 1267–1273. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2095-4>
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48–53. <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
- Al-Nimry, S., Dayah, A. A., Hasan, I., & Daghmash, R. (2021). Cosmetic, Biomedical and Pharmaceutical Applications of Fish Gelatin/Hydrolysates. *Marine Drugs*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/md19030145>
- Aleksander, S. A., Balhoff, J., Carbon, S., Cherry, J. M., Drabkin, H. J., Ebert, D., Feuermann, M., Gaudet, P., Harris, N. L., Hill, D. P., Lee, R., Mi, H., Moxon, S., Mungall, C. J., Muruganugan, A., Mushayahama, T., Sternberg, P. W., Thomas, P. D., Van Auken, K., ... Westerfield, M. (2023). The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, 224(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). *Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data : A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization , Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets*. 5245–5250.
- Asfour, H. A., Allouh, M. Z., & Said, R. S. (2018). Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Experimental Biology and Medicine*, 243(2), 118–128. <https://doi.org/10.1177/1535370217749494>
- Ashburner, M., Ball, C., Blake, J., et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25, 25–29.
- Audic, S., & Claverie, J. M. (1997). The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*, 7(10), 986–995. <https://doi.org/10.1101/gr.7.10.986>
- Bach, A.D., Beier, J.P., Stern-Staeter, J. and Horch, R. E. (2004). Skeletal muscle tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8, 413–422. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00466.x>
- Berkes, C. A., & Tapscott, S. J. (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis.

- Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16(4–5), 585–595.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2005.07.006>
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11(SUPPL.), 127–152. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Bezjak, D., Orellana, N., Valdés, J. H., Corrales, T., & Acevedo, C. A. (2024). Towards Understanding the Role of Microstructured Edible Scaffolds for Cultured Meat Production. *Food and Bioprocess Technology*, 17(3), 767–779.
<https://doi.org/10.1007/s11947-023-03166-2>
- Bezjak, D., Orellana, N., Valdivia, G., Acevedo, C. A., & Valdes, J. H. (2024). Global transcriptome profiles provide insights into muscle cell development and differentiation on microstructured marine biopolymer scaffolds for cultured meat production. *Scientific Reports*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61458-9>
- Bhat, Z. F., & Bhat, H. (2011). Tissue engineered meat- Future meat. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 2(1), 1–10.
<https://academicjournals.org/journal/JSPPR/article-abstract/6C379A58474>
- Bhat, Z. F., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2017). In vitro meat: A future animal-free harvest. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4), 782–789.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.924899>
- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Mason, S. L., Bekhit, A. E. D. A., & Bhat, H. F. (2019). Technological, Regulatory, and Ethical Aspects of In Vitro Meat: A Future Slaughter-Free Harvest. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 1192–1208. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12473>
- Bi, P., Ramirez-Martinez, A., Li, H., Cannavino, J., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Sánchez-Ortiz, E., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2017). Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science*, 356(6335), 323–327.
<https://doi.org/10.1126/science.aam9361>
- Bishnoi, S., Trifol, J., Moriana, R., & Mendes, A. C. (2022). Adjustable polysaccharides-proteins films made of aqueous wheat proteins and alginate solutions. *Food Chemistry*, 391(November 2021), 133196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133196>

- Bjorkman, K. K., Buvoli, M., Pugach, E. K., Polmear, M. M., & Leinwand, L. A. (2019). MiR-1/206 down-regulates splicing factor Srsf9 to promote myogenesis. *BioRxiv*, 1–12. <https://doi.org/10.1101/691162>
- Blais, A. (2015). Myogenesis in the Genomics Era. *Journal of Molecular Biology*, 427(11), 2023–2038. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.009>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Broucke, K., Van Pamel, E., Van Coillie, E., Herman, L., & Van Royen, G. (2023). Cultured meat and challenges ahead: A review on nutritional, technofunctional and sensorial properties, safety and legislation. *Meat Science*, 195(March 2022), 109006. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.109006>
- Bruckman, N. G., Uygur, B., Podbilewicz, B., & Chernomordik, L. V. (2019). How cells fuse. *Journal of Cell Biology*, 218(5), 1436–1451. <https://doi.org/10.1083/jcb.201901017>
- Burattini, S., Ferri, R., Battistelli, M., Curci, R., Luchetti, F., & Falcieri, E. (2004). C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: Morpho-functional characterization. *European Journal of Histochemistry*, 48(3), 223–233. <https://doi.org/10.4081/891>
- Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C. J., Shu, S., Marshall, B., Lewis, S., Lomax, J., Mungall, C., Hitz, B., Balakrishnan, R., Dolan, M., Wood, V., Hong, E., & Gaudet, P. (2009). AmiGO: Online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics*, 25(2), 288–289. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn615>
- Chal, J., & Pourquié, O. (2017). Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development (Cambridge)*, 144(12), 2104–2122. <https://doi.org/10.1242/dev.151035>
- Chen, Y., Stegaev, V., Kouri, V. P., Sillat, T., Chazot, P. L., Stark, H., Wen, J. G., & Kontinen, Y. T. (2015). Identification of histamine receptor subtypes in skeletal myogenesis. *Molecular Medicine Reports*, 11(4), 2624–2630. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.3073>
- Csapo, R., Gumpenberger, M., & Wessner, B. (2020). Skeletal Muscle Extracellular Matrix – What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A

- Narrative Review. *Frontiers in Physiology*, 11(March), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00253>
- Davis, D. B., Delmonte, A. J., Ly, C. T., & McNally, E. M. (2000). Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 9(2), 217–226. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.2.217>
- Denes, L. T., Riley, L. A., Mijares, J. R., Arboleda, J. D., McKee, K., Esser, K. A., & Wang, E. T. (2019). Culturing C2C12 myotubes on micromolded gelatin hydrogels accelerates myotube maturation. *Skeletal Muscle*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13395-019-0203-4>
- Díaz, P., López, D., Matiacevich, S., Osorio, F. and Enrione, J. (2011). State diagram of salmon (*Salmo salar*) gelatin films. *J. Sci. Food Agric.*, 91, 2558–2565.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.4451>
- Elashry, M. I., Kinde, M., Klymiuk, M. C., Eldaey, A., Wenisch, S., & Arnhold, S. (2022). The effect of hypoxia on myogenic differentiation and multipotency of the skeletal muscle-derived stem cells in mice. *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1), 1–17.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-02730-5>
- Enrione, J., Blaker, J. J., Brown, D. I., Weinstein-Opppenheimer, C. R., Pepczynska, M., Olguín, Y., Sánchez, E., & Acevedo, C. A. (2017). Edible scaffolds based on non-mammalian biopolymers for myoblast growth. *Materials*, 10(12).
<https://doi.org/10.3390/ma10121404>
- Enrione, J., Pino, K., Pepczynska, M., Brown, D. I., Ortiz, R., Sánchez, E., & Acevedo, C. A. (2018). A novel biomaterial based on salmon-gelatin and its in vivo evaluation as sterile wound-dressing. *Materials Letters*, 212, 159–164.
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.10.049>
- Fasciano, S., Wheba, A., Ddamulira, C., & Wang, S. (2024). Recent advances in scaffolding biomaterials for cultivated meat. *Biomaterials Advances*, 162(February), 213897.
<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2024.213897>
- Ganassi, M., Badodi, S., Ortuste Quiroga, H. P., Zammit, P. S., Hinits, Y., & Hughes, S. M. (2018). Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06583-6>

- Ghasemzadeh, H., Afraz, S., Moradi, M., & Hassanpour, S. (2021). Antimicrobial chitosan-agarose full polysaccharide silver nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 179, 532–541.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.192>
- Heid, Christian A., Stevens, Junko., Livak, Kenneth J., Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Methods*, 33(1 Suppl), 101–109.
<https://doi.org/10.1016/b978-012372185-3/50024-9>
- Henderson, C.A., Gomez, C.G., Novak, S.M., Mi-Mi, L. and Gregorio, C. . (2017). Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr. Physiol.*, 7((3)), 891–944.
- Hernández-Hernández, J. M., García-González, E. G., Brun, C. E., & Rudnicki, M. A. (2017). The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 72, 10–18.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.010>
- Hou, Y., Fu, L., Li, J., Li, J., Zhao, Y., Luan, Y., Liu, A., Liu, H., Li, X., Zhao, S., & Li, C. (2018). Transcriptome Analysis of Potential miRNA Involved in Adipogenic Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Lipids*, 53(4), 375–386.
<https://doi.org/10.1002/lipd.12032>
- Jana, S., & Zhang, M. (2013). Fabrication of 3D aligned nanofibrous tubes by direct electrospinning. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(20), 2575–2581.
<https://doi.org/10.1039/c3tb20197j>
- Jaques, A., Sánchez, E., Orellana, N., Enrione, J., & Acevedo, C. A. (2021). Modelling the growth of in-vitro meat on microstructured edible films. *Journal of Food Engineering*, 307(April). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110662>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kang, M. S., Lee, S. H., Park, W. J., Lee, J. E., Kim, B., & Han, D. W. (2020). Advanced techniques for skeletal muscle tissue engineering and regeneration. *Bioengineering*, 7(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030099>
- Khademhosseini, A., Du, Y., Rajalingam, B., Vacanti, J. P., & Langer, R. S. (2006). Microscale technologies for tissue engineering. *Advances in Tissue Engineering*, 103(8),

349–369. https://doi.org/10.1142/9781848161832_0017

Kierszenbaum A. (2008). *Histología y Biología Celular* (Segunda Ed). Elsevier.

Kirsch, M., Morales-Dalmau, J., & Lavrentieva, A. (2023). Cultivated meat manufacturing: Technology, trends, and challenges. *Engineering in Life Sciences*, 23(12), 1–14. <https://doi.org/10.1002/elsc.202300227>

Kitzmann, M., & Fernandez, A. (2001). *Cellular and Molecular Life Sciences Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts*. 58, 571–579.

Kumar, A., Sood, A., & Han, S. S. (2023). Technological and structural aspects of scaffold manufacturing for cultured meat: recent advances, challenges, and opportunities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(5), 585–612. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2132206>

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>

Lee, S. Y., Lee, D. Y., Yun, S. H., Lee, J., Mariano, E., Park, J., Choi, Y., Han, D., Kim, J. S., & Hur, S. J. (2024). Current technology and industrialization status of cell-cultivated meat. *Journal of Animal Science and Technology*, 66(1), 2–30. <https://doi.org/10.5187/jast.2023.e107>

Lehka, L., & Rędownicz, M. J. (2020). Mechanisms regulating myoblast fusion: A multilevel interplay. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 104(January), 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.004>

Leikina, E., Gamage, D. G., Prasad, V., Goykhberg, J., Crowe, M., Diao, J., Kozlov, M. M., Chernomordik, L. V., & Millay, D. P. (2018). Myomaker and Myomerger Work Independently to Control Distinct Steps of Membrane Remodeling during Myoblast Fusion. *Developmental Cell*, 46(6), 767–780.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.006>

Li, R., Yu, C., Li, Y., Lam, T. W., Yiu, S. M., Kristiansen, K., & Wang, J. (2009). SOAP2: An improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics*, 25(15), 1966–1967. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp336>

- Li, T., Zhang, G., Wu, P., Duan, L., Li, G., Liu, Q., & Wang, J. (2018). Dissection of myogenic differentiation signatures in chickens by RNA-seq analysis. *Genes*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/genes9010034>
- Liu, B., Jiang, G., Zhang, Y., Li, J., Li, X., Yue, J., Chen, F., Liu, H., Li, H., Zhu, S., Wang, J., & Ran, C. (2011). Analysis of transcriptome differences between resistant and susceptible strains of the citrus red mite *panonychus citri* (acari: Tetranychidae). *PLoS ONE*, 6(12), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028516>
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 19(6), 485–502. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>
- Luo, B., Tian, L., Chen, N., Ramakrishna, S., Thakor, N., & Yang, I. H. (2018). Electrospun nanofibers facilitate better alignment, differentiation, and long-term culture in an: In vitro model of the neuromuscular junction (NMJ). *Biomaterials Science*, 6(12), 3262–3272. <https://doi.org/10.1039/c8bm00720a>
- Luo, W., Li, E., Nie, Q., & Zhang, X. (2015). Myomaker, regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3P, promotes chicken myoblast fusion. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26186–26201. <https://doi.org/10.3390/ijms161125946>
- Millay, D. P., O'Rourke, J. R., Sutherland, L. B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2013). Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature*, 499(7458), 301–305. <https://doi.org/10.1038/nature12343>
- Moran, J. L., Li, Y., Hill, A. A., Mounts, W. M., & Miller, C. P. (2002). Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. *Physiological Genomics*, 2002(10), 103–111. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00011.2002>
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7), 621–628. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1226>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 12(1), 1–46. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>

- Nobre, F. S. (2022). Cultured meat and the sustainable development goals. *Trends in Food Science and Technology*, 124(May 2021), 140–153.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.011>
- Orellana, N., Sánchez, E., Benavente, D., Prieto, P., Enrione, J., & Acevedo, C. A. (2020). A new edible film to produce in vitro meat. *Foods*, 9(2), 1–14.
<https://doi.org/10.3390/foods9020185>
- Paradossi, G., Cavalieri, F., Chiessi, E., Spagnoli, C., & Cowman, M. K. (2003). Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14(8), 687–691.
<https://doi.org/10.1023/A:1024907615244>
- Petrany, M. J., & Millay, D. P. (2019). Cell Fusion: Merging Membranes and Making Muscle. *Trends in Cell Biology*, 29(12), 964–973. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.09.002>
- Pette, D., & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, 50(6), 500–509. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7)
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. 29(9), 16–21.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes , differentially regulated target genes and sample integrity : BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. 509–515.
- Posey, A. D., Demonbreun, A., & McNally, E. M. (2011). Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 96). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385940-2.00008-5>
- Post, M. J. (2014). Cultured beef: Medical technology to produce food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1039–1041. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6474>
- Post, M. J., Levenberg, S., Kaplan, D. L., Genovese, N., Fu, J., Bryant, C. J., Negowetti, N., Verzijden, K., & Moutsatsou, P. (2020). Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat. *Nature Food*, 1(7), 403–415.
<https://doi.org/10.1038/s43016-020-0112-z>
- Powers, J. D., Malingen, S. A., Regnier, M., & Daniel, T. L. (2021). The Sliding Filament

- Theory since Andrew Huxley: Multiscale and Multidisciplinary Muscle Research. *Annual Review of Biophysics*, 50, 373–400. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-110320-062613>
- Quinn, M. E., Goh, Q., Kurosaka, M., Gamage, D. G., Petrany, M. J., Prasad, V., & Millay, D. P. (2017). Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. *Nature Communications*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms15665>
- Ribeiro, J. C. V., Vieira, R. S., Melo, I. M., Araújo, V. M. A., & Lima, V. (2017). Versatility of Chitosan-Based Biomaterials and Their Use as Scaffolds for Tissue Regeneration. *Scientific World Journal*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8639898>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Sampath, S. C., Sampath, S. C., & Millay, D. P. (2018). Myoblast fusion confusion: The resolution begins. *Skeletal Muscle*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13395-017-0149-3>
- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*, 270(5235), 467–470. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.467>
- Schmidt, M., Schüler, S. C., Hüttner, S. S., von Eyss, B., & von Maltzahn, J. (2019). Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(13), 2559–2570. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03093-6>
- Segundo-Val, I. S., & Sanz-Lozano, C. S. (2016). Introduction to the gene expression analysis. *Methods in Molecular Biology*, 1434, 29–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3652-6_3
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). *human reticulocytes using real-time PCR*.

- 9, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>
- Sousa, A. M. M., Souza, H. K. S., Uknalis, J., Liu, S. C., Gonçalves, M. P., & Liu, L. (2015). Electrospinning of agar/PVA aqueous solutions and its relation with rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 115, 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.074>
- Spletter, M. L., Barz, C., Yeroslaviz, A., Zhang, X., Lemke, S. B., Bonnard, A., Brunner, E., Cardone, G., Basler, K., Habermann, B. H., & Schnorrer, F. (2018). A transcriptomics resource reveals a transcriptional transition during ordered sarcomere morphogenesis in flight muscle. *ELife*, 7, 1–34. <https://doi.org/10.7554/eLife.34058>
- Stark, R., Grzelak, M., & Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews Genetics*, 20(11), 631–656. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>
- Steen, L., Glorieux, S., Goemaere, O., Brijs, K., Paelinck, H., Foubert, I., & Fraeye, I. (2016). Functional Properties of Pork Liver Protein Fractions. *Food and Bioprocess Technology*, 9(6), 970–980. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1685-2>
- Stoll-Kleemann, S., & O’Riordan, T. (2015). The sustainability challenges of our meat and dairy diets. *Environment*, 57(3), 34–48. <https://doi.org/10.1080/00139157.2015.1025644>
- Taborda, M. I., Catalan, K. N., Orellana, N., Bezjak, D., Enrione, J., Acevedo, C. A., & Corrales, T. P. (2023). Micropatterned Nanofiber Scaffolds of Salmon Gelatin, Chitosan, and Poly(vinyl alcohol) for Muscle Tissue Engineering. *ACS Omega*, 8(50), 47883–47896. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06436>
- Vandesompele, J., Preter, K. De, Poppe, B., Roy, N. Van, & Paepe, A. De. (2002). *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. 1–12.
- Veliça, P., & Bunce, C. M. (2011). A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. *Muscle and Nerve*, 44(3), 366–370. <https://doi.org/10.1002/mus.22056>
- Wang, X., Zhu, J., Sun, B., Jin, Q., Li, H., Xia, C., Wang, H., Mo, X., & Wu, J. (2021). Harnessing electrospun nanofibers to recapitulate hierarchical fibrous structures of meniscus. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 109(2), 201–213. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34692>

- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics in Western Equatoria State. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57.
- Wang, Z., Grange, M., Wagner, T., Kho, A. L., Gautel, M., & Raunser, S. (2021). The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle. *Cell*, 184(8), 2135-2150.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.047>
- Wei, C., Li, L., Su, H., Xu, L., Zhang, L., Lu, J., Liu, W., Ren, H., & Du, L. (2014). Identification of the crucial molecular events during the large-scale myoblast fusion in sheep. *Physiological Genomics*, 46(12), 429–440. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00184.2013>
- Xie, F., Xiao, P., & Chen, D. (2012). *miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs*. 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
- Yamada, S., Yamamoto, K., Ikeda, T., Yanagiguchi, K., & Hayashi, Y. (2014). Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. *BioMed Research International*, 2014(3). <https://doi.org/10.1155/2014/302932>
- Yamamoto, D. L., Csikasz, R. I., Li, Y., Sharma, G., Hjort, K., Karlsson, R., & Bengtsson, T. (2008). Myotube formation on micro-patterned glass: Intracellular organization and protein distribution in C2C12 skeletal muscle cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56(10), 881–892. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.951228>
- Yun, Z., Lin, Q., & Giaccia, A. J. (2005). Adaptive Myogenesis under Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 25(8), 3040–3055. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.8.3040-3055.2005>
- Zammit, P. S. (2017). Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 72, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.011>
- Zaraska, M. (2013). Lab-grown beef taste test: ‘Almost’ like a burger. *The Washington Post*. https://www.washingtonpost.com/national/health-science/lab-grown-beef-taste-test-almost-like-a-burger/2013/08/05/921a5996-fdf4-11e2-96a8-d3b921c0924a_story.html
- Zhang, Q., Vashisht, A. A., O'Rourke, J., Corbel, S. Y., Moran, R., Romero, A., Miraglia, L., Zhang, J., Durrant, E., Schmedt, C., Sampath, S. C., & Sampath, S. C. (2017). The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15664>

- Zhao, P., Gu, H., Mi, H., Rao, C., Fu, J., & Turng, L. sheng. (2018). Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review. *Frontiers of Mechanical Engineering*, 13(1), 107–119. <https://doi.org/10.1007/s11465-018-0496-8>
- Zhao, Y., Zeng, H., Nam, J., & Agarwal, S. (2009). Fabrication of skeletal muscle constructs by topographic activation of cell alignment. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2), 624–631. <https://doi.org/10.1002/bit.22080>
- Zhu, W., Zhou, B., Zhao, C., Ba, Z., Xu, H., Yan, X., Liu, W., Zhu, B., Wang, L., & Ren, C. (2019). Myoferlin, a multifunctional protein in normal cells, has novel and key roles in various cancers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(11), 7180–7189. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14648>

Productos

Publicaciones científicas

- **Bezjak, D.**, Orellana, N., Valdivia, G., Acevedo, C. A., Valdés, J. Global Transcriptome Profiles Provide Insights into Muscle Cell Development and Differentiation on Microstructured Marine Biopolymer Scaffolds for Cultured Meat Production. *Nature Scientific Reports* (2024). DOI: 10.1038/s41598-024-61458-9
- **Bezjak, D.**, Orellana, N., Valdés, J. et al. Towards Understanding the Role of Microstructured Edible Scaffolds for Cultured Meat Production. *Food Bioprocess Technology* (2023). DOI: 10.1007/s11947-023-03166-2
- T, M. I., Catalán, K. N., Orellana, N., **Bezjak, D.**, Enrione, J., Acevedo, C. A., Corrales, T. P. Micropatterned nanofiber scaffolds of salmon gelatin, chitosan and poly (vinyl alcohol) for muscle tissue engineering. *ACS Omega* (2023). DOI: 10.1021/acsomega.3c06436
- Da Silva, R., **Bezjak, D.**, Corrales, T.P., Kappl, M., Petri, D. Chitosan-vanillin-polydimethylsiloxane scaffolds with tunable stiffness for muscle cells proliferation. *Int. J. Biol. Macromol.* **Under review.**
- **Bezjak, D.**, Cortés, D., Orellana, N., Acevedo, C. A., Kappl, M., Corrales, T. P. Single-Cell studies of myoblast differentiation on aligned electrospun scaffold: understanding the first stages of cell adhesion. **In preparation**

Participación en congresos

- Brazilian Materials Research Society (B-MRS) 2024, Santos, Brasil, 29 de septiembre-3 de octubre, 2024. Presentación Oral: “Comparative study of electrospun nanofibers incorporating PVA- Salmon Gelatin- Chitosan with different alignment methods: Assessing muscle cell alignment for tissue engineering applications”

- Scientific Symposium “From the Neckar Valley to the Cordillera de los Andes: Breaking Borders with Molecular Systems Engineering” Heidelberg University. April 15th-20th, 2024, Santiago, Chile. Poster presentation: “Nanofibers for Tissue Engineering: A Mechanobiological Approach.”
- VII National Conference of Nanotechnology. November 12th- 15th, 2023, Pucón, Chile. Poster presentation: “Comparing the effect of different type of nanofibers alignment methods on muscle cells development.”
- III National Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. October 24th- 25th, 2023, Valparaíso, Chile. Título del trabajo presentado: Poster presentation: “Microstructured scaffolds for muscle cell culture: Role in the gene expression of myogenic and cell fusion markers.”
- 33rd Annual Conference of the European Society for biomaterials. September 4th- 8th, 2023, Davos, Switzerland. Poster and Rapid-Fire Presentation: “Effect of electrospun PVA- Salmon Gelatin- Chitosan nanofibers using different types of collectors on muscle cell alignment.”
- 32nd Annual Conference of the European Society of Biomaterials, September 4th- 8th, 2022, Bordeaux, France. Poster presentation: “Microstructured Electrospun Scaffold Composed of PVA And Marine Biopolymers and Its Effect on Muscle Cells.”
- II National Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, December 7th, Chile. Presented work: “Development of a microstructured scaffold for in vitro muscle manufacturing.”

Pasantías

06/2022-12/2022 **Max Planck Institute for Polymer Research, Mainz, Alemania**

Laser Scanning Confocal Microscopy para evaluación de morfología celular en scaffolds fabricados en Chile. Adhesion force measurements of muscle cells growing on electrospun scaffolds with FluidFM. Evaluation of mechanical properties of electrospun scaffolds with Atomic Force Microscopy.

06/2023-10/2023 **Max Planck Institute for Polymer Research, Mainz, Alemania**

Mediciones de fuerza de adhesión de células musculares a scaffolds electrohilados utilizando FluidFM. Evaluación de propiedades mecánicas con microscopía de fuerza atómica (AFM).