



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



**COMPARACIÓN DEL CULTIVO DE CÉLULAS DE PECES EN 2D Y CRECIMIENTO
EN ANDAMIOS DE *DURVILLAEA ANTARCTICA* CON FUTURA APLICACIÓN EN
CARNE *IN VITRO*.**

Por

JOSÉ IGNACIO BURGOS LAGOS

Tutora

ALLISSON ASTUYA VILLALÓN

Co-tutora

ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA
MARINA Y ACUICULTURA

Concepción, Chile
Abril, 2023

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS

Este Seminario de Título ha sido realizado en un comienzo en el Laboratorio de Biotoxinas y Cultivo Celular de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción y continuado para su finalización en el Centro de Biotecnología y Bioingeniería con LUYEF BIOTECHNOLOGIES en la Universidad de Chile.

Profesora Guía

Dra. Allisson Astuya Villalón

Jefa de Laboratorio de Biotoxinas y Cultivo Celular – LBTx
COPAS COASTAL
Universidad de Concepción

Profesora Co-tutora

Dra. Ziomara Gerdtsen Hakim

Jefa de Laboratorio de Cultivo Celular de Mamíferos - MCCL
Universidad de Chile

Representada por la siguiente
Comisión Evaluadora

Mg. Luis Seminario Salas

Vicedecano de la Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Dra. Andrea Villanueva A.

Directora de Tecnología
LUYEF BIOTECHNOLOGIES

Coordinador Seminario de Título

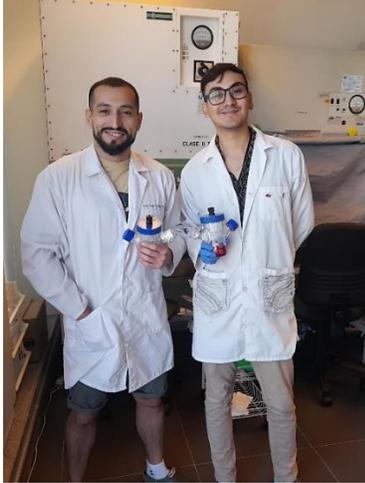
Dr. Fernando Cruzat Cruzat

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

. . . Puedes con todo . . .
pero no con todo a la vez . . .

"Desde el conocimiento, aportamos a la ciencia, con investigaciones
colaborativas que ayuden a las personas y el entorno."

AGRADECIMIENTOS



Agradecer en primera instancia a mi profesora Allisson Astuya (tutora) por guiarme e incentivar me desde un inicio en este tema de investigación del cual quería ser participe, por adoptarme en un tema de interés propio. A mis colegas Ambbar, Alejandra, Ghyslaine, Daniela, Verónica y a todo el equipo de LBTx UdeC por hacer que mi estadía como tesista fuese mucho más llevadera, para poder entregar entusiasmo a aquellos que solo ven esta área como un trabajo más del montón y darles a conocer que para otros es realmente motivacional, porque donde unos ven peces otros ven aspiraciones científicas. También a Luis Solano quién fue mi maestro mientras me encontraba en Santiago realizando los análisis de mis cultivos con LUYEF y sabiendo la situación de ser estudiante de otra región que con tan solo correos y reuniones se logró la coordinación.

A la profesora Alejandra Llanos a cargo del laboratorio de Toxicología acuática por brindarme la materia prima de mis cultivos primarios; los peces cebra, ya que sin su duda fueron parte fundamental en este trabajo.

Y a todas y todos quienes estuvieron conmigo de alguna manera, pues me acompañaron en este proceso, ya sean amigos y familia, nunca me dejan solo, porque, aunque uno tenga metas propias, siempre hay que considerar aquellos que te quieren a tu lado en momentos difíciles, a esas personas les agradezco por confiar y creer en mí.

Este trabajo obtuvo financiamiento de parte de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas y del Plan Ciencia 2030, ambos pertenecientes a la Universidad de Concepción.



Índice de Contenidos

Índice de Figuras	7
-------------------------	---

Índice de Tablas	8
------------------------	---

Resumen	9
---------------	---

1. Introducción

1.1. Panorama de la Pesca y Acuicultura	11
1.2. Producción de carne a base de células	11
1.3. Fuentes celulares	13
1.4. Cultivo celular	14
1.4.1. Proceso miogénico	14
1.5. Líneas Celulares	15
1.5.1. CHSE-214	15
1.5.2. C2C12	15
1.6. Matriz Extracelular	16
1.6.1. Colágeno	16
1.6.2. Laminina	17
1.7. Andamios	17
1.7.1. Alginato	19
1.7.2. <i>Durvillaea antarctica</i>	19
1.8. Medios de crecimiento	20
1.9. LUYEF Biotechnologies	21

2. Hipótesis

2.1. Objetivo general	23
2.2. Objetivos específicos	23

3. Materiales y Métodos

3.1. Mantenimiento de peces cebras (<i>Danio rerio</i>)	24
3.1.1. Eutanasia	25
3.1.2. Desinfección / Esterilización	25
3.1.3. Disección	25
3.1.4. Disgregación enzimática	25
3.1.5. Aislamiento	26
3.1.6. Mantenimiento de los cultivos celulares de MSCz	27
3.2. Recubrimiento de matrices en placa	27
3.3. Mantenimiento de líneas celulares	27
3.3.1. Mantenimiento de CHSE-214	27

3.3.2.	Mantenimiento de C2C12	27
3.4.	Conteo Celular	28
3.5.	Ensayo con alamarBlue	29
3.6.	Cultivos celulares en andamios de LUYEF	29
3.7.	Obtención de Imágenes	30
3.8.	Análisis estadístico	31

4. Resultados y Discusiones

4.1.	Desarrollo de un cultivo primario de pez cebra en 2D	32
4.1.1.	Disgregación enzimática	32
4.1.2.	Evaluación de técnicas asépticas para mitigar el riesgo de contaminantes en cultivos celulares	33
4.1.3.	Adhesión celular en distintas matrices	35
4.2.	Crecimiento de células en 2D	37
4.2.1.	Curva de crecimiento en 2D	38
4.2.2.	Porcentaje de Reducción de alamarBlue en 2D	40
4.3.	Cultivo de células en andamios de <i>D. antarctica</i>	42
4.3.1.	Porcentaje de Reducción de alamarBlue en 3D	44
4.4.	Proyecciones futuras	45

5.	Conclusión	46
----	------------------	----

	Bibliografía	47
--	--------------------	----

	Anexo	53
--	-------------	----

Índice de Figuras

1. Uso y consumo mundial de pescado como alimento	11
2. Pez cebra como el pez más estudiado en ciencias	13
3. Resultados experimentales de la sustitución del suero fetal de bovino	13
4. Proceso miogénico desde el compromiso de células precursoras miogénicas hasta su diferenciación en fibras musculares	15
5. Representación esquemática de la composición de la matriz extracelular (ECM)	16
6. <i>Durvillaea antarctica</i> durante la fabricación de andamios	20
7. Sistema de Recirculación de Agua del laboratorio de Toxicología acuática	24
8. Disección del músculo esquelético de pez cebra adulto	26
9. Principio del método de azul de tripán	28
10. Diagrama del procedimiento de conteo celular	29
11. Diagrama de crecimiento de andamios en spinners	30
12. Digestión enzimática del explante a través del tiempo de incubación	32
13. Impacto de las distintas enzimas frente a la viabilidad celular para el proceso de disgregación del tejido	33
14. Imágenes procedentes de FLoid de distintos tipos de contaminación en un cultivo	33
15. Eritrocitos en cultivo primario	34
16. Prueba para reactivos y medios utilizados en el cultivo primario de pez cebra	35
17. Absorbancia (570nm) medida mediante alamarBlue®	35
18. Microfotografía de adherencia de las CHSE-214 en placa	36
19. Crecimiento de las distintas fuentes celulares a través del tiempo	37
20. Curvas de Crecimiento de las distintas fuentes celulares; MSCz, CHSE-214 y C2C12	38
21. Comparación del crecimiento de las células de peces; MSCz y CHSE-214 a través del tiempo	39
22. Comparación del porcentaje reducido de alamarBlue® mediante dos tipos de lecturas; lectura diaria y lectura/cultivo permanente a través del tiempo, para dos tipos de células C2C12 y CHSE-214	40
23. Comparación del porcentaje reducido de alamarBlue® en las distintas fuentes celulares a través del tiempo	41
24. Cultivo de C2C12 en andamios de <i>Durvillaea antarctica</i> en spinners	42
25. Cultivo de CHSE-214 en andamios de <i>Durvillaea antarctica</i> en spinners	43
26. Microfotografía de los andamios de <i>D. antarctica</i> vistos mediante tinción con cristal violeta a través del tiempo en aumento 40X	44
27. Comparación del porcentaje reducido de alamarBlue® de las dos líneas celulares (C2C12 y CHSE-214), creciendo en los andamios de cochayuyo	44
28. Comparación del porcentaje reducido de alamarBlue® en 2D y en cultivos 3D de las dos líneas celulares (C2C12 y CHSE-214)	45

29. Diagrama de flujo del aislamiento de células asociadas al músculo esquelético de <i>Danio rerio</i> adulto	58
30. Cuadrante del hemocitómetro utilizado para recuento de células	58
31. Normalidad y Homocedasticidad de los datos de la curva de crecimiento de las células de peces	59

Índice de Tablas

1. Ventajas de la Carne <i>in vitro</i>	12
2. Ventajas y limitaciones de los distintos tipos de andamiaje	18
3. Densidades celulares promedio alcanzadas con las distintas enzimas en la digestión del tejido	32
4. Parámetros de cultivo obtenidos para las distintas fuentes celulares	38
5. Volúmenes de recubrimiento por placa	56
6. Coeficientes de extinción molar para alamarBlue	59

Abstract

COMPARISON OF THE CULTURE OF FISH CELLS IN 2D AND GROWTH ON SCAFFOLDS OF *DURVILLAEA ANTARCTICA* WITH FUTURE APPLICATION IN MEAT *IN VITRO*.

At present, foods of marine origin such as fish provide an important component in world diets, especially in the contribution of proteins. Initially, the activities of capture fishing and aquaculture are the conventional sources of protein of marine origin but considering the current scenery of these sources on the depletion of resources by fishing, an alternative is used to cover the demand from cell-based cultured meat, instead of raising animals. Methods to produce meat *in vitro* require the isolation of muscle cells as well as innovations and studies on the construction of scaffolds to mimic the biological and physical characteristics *in vivo*.

Therefore, this work presents an advance on the isolation of cells associated with the skeletal muscle of zebrafish (*Danio rerio*) as a study model so that it can be taken to other fish of commercial interest and be able to compare them with other cell lines; a salmon cell line (CHSE-214) and mouse myoblast cell line (C2C12) in 2D. Obtaining comparative results between said cell sources such as the viability index by means of a reduction assay with alamarBlue, which measures the reducing power of cellular mitochondria against the alamarBlue® reagent. Based on the comparisons based on the doubling time it is observed that the growth rates of C2C12 have a longer doubling time compared to salmon cells and those of zebrafish, which is to be expected as it's mammalian lineage with a metabolism greater, with a Td of 23.8h < 30.8h < 331.8h, respectively. This last time being longer than the rest, which implies that the cells associated with the skeletal muscle of the primary culture, instead of duplicating, are maintained in culture. Based on these results, the use of type of culture for its evaluation in the growth of bioreactors containing the scaffolds is ruled out due to the initial seeding requirement that must exceed 10 x 10⁶ cells/ml.

Due to the low amount of cells obtained from the primary culture of *Danio rerio*, C2C12 was used as a replacement for muscle associated cells to be used in *Durvillaea antarctica* (cochayuyo) scaffolds belonging to LUYEF Biotechnologies as adhesion structures and be compared to CHSE-214 cells. Said scaffolds were coated with pig skin gelatin selected by preliminary tests with 2D assay of alamarBlue, identifying the best types of matrixes to increase cell proliferation and adhesion. Even though the coating with collagen I was optimal, the discarding of this option is based exclusively on the economic technical analysis, considering the interests of the industry and of the consumers themselves, because gelatin was chosen over collagen.

Although the growth in 2D vs 3D could be comparable, it was also possible to show that both C2C2 and CHSE-214 cell lines grow and adhere to the LUYEF scaffolds, which allows us to conclude that there is a potential for multispecificity since different cell types they were able to perfuse and grow into these three-dimensional structures.

Resumen

COMPARACIÓN DEL CULTIVO DE CÉLULAS DE PECES EN 2D Y CRECIMIENTO EN ANDAMIOS DE *DURVILLAEA ANTARCTICA* CON FUTURA APLICACIÓN EN CARNE *IN VITRO*.

En la actualidad, los alimentos de origen marino como pescados proporcionan un componente importante dentro de las dietas mundiales, especialmente en el aporte de proteínas. Inicialmente las actividades de pesca por captura y acuicultura son las fuentes convencionales de proteína de origen marino, pero tomando en consideración el panorama actual de dichas fuentes sobre el agotamiento de los recursos por parte de la pesca es que se emplea una alternativa sobre cubrir la demanda a partir de carne cultivada a base de células, en lugar de criar animales. Los métodos para producir carne *in vitro* requieren del aislamiento de células musculares además de innovaciones y estudios sobre la elaboración de andamios para imitar las características biológicas y físicas *in vivo*.

Por lo tanto, este trabajo presenta un avance sobre el aislamiento de células asociadas al músculo esquelético del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo de estudio para que pueda ser llevado a otros peces de interés comercial y poder compararlas con otras líneas celulares; una línea celular de salmón (CHSE-214) y una línea celular de mioblastos de ratón (C2C12) en 2D. Obteniendo resultados comparativos entre dichas fuentes celulares como el índice de viabilidad mediante ensayo de reducción con alamarBlue, que mide el poder reductor de las mitocondrias celulares frente al reactivo de alamarBlue®. En base a las comparaciones basadas en el tiempo de duplicación se observa que las tasas de crecimiento de las C2C12 tienen un tiempo de duplicación mayor respecto a las células de salmón y que las de pez cebra, esperable al ser un linaje de mamífero con un metabolismo mayor, con un Td de 23,8 h < 30,8 h < 331,8 h respectivamente. Siendo este último tiempo mayor al resto, lo que implica que las células asociadas al músculo esquelético del cultivo primario, en vez de duplicarse se mantienen en cultivo. A partir de estos resultados, se descarta el uso de este tipo de cultivo para su evaluación en el crecimiento de biorreactores que contienen los andamios debido al requerimiento de siembra inicial que debe superar los 10×10^6 células/ml.

Debido a la baja cantidad de células obtenidas del cultivo primario de *Danio rerio* es que se utilizaron las C2C12 a modo de reemplazo de células asociadas al músculo para ser utilizadas en andamios de *Durvillaea antarctica* (cochayuyo) pertenecientes a LUYEF Biotechnologies como estructuras de adhesión y ser comparadas con las células CHSE-214. Dichos andamios fueron recubiertos con gelatina de piel de cerdo seleccionado por ensayos preliminares con alamarBlue en 2D, identificando los mejores tipos de matrices para aumentar la proliferación y adherencia celular. A pesar de que el recubrimiento con colágeno I fue óptimo, el descarte de esta opción se basa exclusivamente en el análisis técnico económico, considerando los intereses de la industria y de los propios consumidores es que se eligió la gelatina antes que el colágeno.

Aunque el crecimiento en 2D vs 3D pudo ser comparable, también se logró evidenciar que ambas líneas celulares C2C12 y CHSE-214 crecen y se adhieren a los andamios de LUYEF, lo que nos permite concluir que existe un potencial de multiespecificidad dado que tipos celulares distintos pudieron profundir y crecer en estas estructuras tridimensionales.

Introducción

1.1. Panorama de la Pesca y Acuicultura

Entre 1960 y 1990, la captura por pesca fue la principal fuente de suministro de alimentos marinos. Sin embargo, desde 1990 en adelante la producción pesquera se ha ido estancando, ya que en los últimos años el 60% de las poblaciones se pescan íntegramente mientras que más del 34% sufre por sobrepesca amenazando las poblaciones actuales de peces (FAO, 2020). Si bien la industria de la acuicultura es una fuente adecuada para abastecer a la creciente población de personas, esta requiere de peces capturados en la naturaleza utilizados para la alimentación en la acuicultura, ya que su dieta comprende harina de pescado derivado de peces silvestres, por lo tanto, incluso a medida que aumenta la acuicultura, también lo hace la pesca por captura (Merino et al., 2012). Con esta perspectiva de la industria acuícola y pesquera se han presentado desafíos para alimentar a la creciente población mundial de manera sostenible, abriendo una oportunidad a la carne de pescado a base de células para transformar el panorama de la sostenibilidad, definido como *Acuicultura celular*.

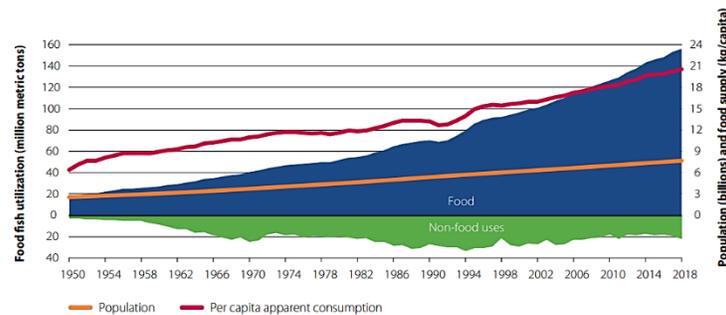


Figura 1.1. Uso y consumo mundial de pescado como alimento. Fuente: (FAO, 2020).

Los alimentos de origen marino, como pescados y mariscos son valorados como fuentes ricas en proteínas (Alexander et al., 2017). Donde más de mil millones de personas dependen de productos como el pescado como fuente de dicha proteína (Figura 1) (FAO, 2020). Como en la mayoría de los peces el músculo esquelético constituye el 60% de la masa corporal, ya que esta musculatura está relacionada con la fisiología de estos animales, permite los movimientos de natación y adaptación al medio acuático, lo que representa la reserva principal de proteínas, comprendiendo la parte más valiosa del pescado: el filete (Johnston et al., 2001).

1.2. Producción de carne a base de células

La alternativa de la carne a base de células es una tecnología emergente que presenta cualidades similares y algunas diferencias al tipo de carne convencional (ver Tabla I) (llamaremos carne convencional en este caso al filete proveniente del pescado tradicional) y que cuando se habla de

carne en base de células, se hace referencia a la “carne *in vitro*” la cual se basa en la producción de tejido muscular comestible a partir de células musculares o desarrollada a partir de células madre multi o totipotenciales, que trata de imitar la carne tradicional 3D usando técnicas de ingeniería de tejidos en medios de cultivo específicos y bajo condiciones controladas (Zhang et al., 2019).

Tabla I: Ventajas de la Carne *in vitro*.

Criterio	Carne <i>in vitro</i>	Carne convencional
Diseño de la Carne	La carne <i>in vitro</i> puede verse influenciada cambiando la composición del medio de cultivo, como los nutrientes para que sea saludable. <i>Por ejemplo;</i> reemplazando las grasas dañinas con grasas saludables como el omega-3 previniendo enfermedades cardiovasculares (Bhat & Bhat, 2011).	El consumo de carne proveniente de animales siempre es un riesgo debido a las enfermedades animales. Incluso las enfermedades relacionadas con la nutrición, la gastroenteritis y la intoxicación alimentaria (Ghaydane et al., 2018).
Tiempo de producción	La producción de la carne tarda solamente semanas en cultivarse y cosecharse (Ghaydane et al., 2018).	El ciclo de crianza de un animal comprende años para el caso de bovinos e incluso para peces de producción como lo es el salmón (Varela et al., 2021).
Bienestar Animal	No implica la matanza de animales, ya que sólo se necesita una muestra de células musculares del animal donante (Cartín-Rojas & Ortiz, 2018).	Los sistemas de producción intensivos de carne están involucrados en la desensibilización debido al bienestar animal y la matanza excesivamente brutal de millones de animales destinados a la alimentación (Welin, 2013).
Disponibilidad de una Carne Exótica	Como la producción de carne <i>in vitro</i> sólo requiere de células madre del animal deseado, se pueden utilizar células de especies sobreexplotadas, en peligro de extinción para producir carne exótica (Bhat et al., 2017).	La carne de varios animales salvajes no está disponible para el consumo humano sobre todo de especies que no están distribuidas en todo el mundo (Bhat et al., 2017).
Sostenibilidad Ambiental	La reducción en el uso de terrenos para el cultivo animal abre la perspectiva para reforestación y restauración de especies (Ghaydane et al., 2018).	El uso de tierras que se ocupan para la producción de carne corresponde a un 30% de la superficie terrestre a nivel mundial, además de producir el 18% de emisiones de gases de efecto invernadero (Steinfeld et al., 2006).

1.3. Fuentes celulares

El uso de especies experimentales como lo es el pez cebra (*Danio rerio*) que ha sido utilizado ampliamente en el mundo científico como un modelo biológico (Figura 2); esto debido a que el 82% de sus genes tienen una alta identidad con el genoma humano y por tanto ha permitido el estudio de enfermedades humanas, con el objetivo de conocer mecanismos y desarrollar potenciales tratamientos (YourGenome, 2014), que sumado a su alto grado de regeneración lo hacen un modelo atractivo. Otra ventaja de elegir el modelo de pez cebra es la obtención de muestras biológicas de embriones y peces como fuente de células. El pez cebra satisface bien esta necesidad, ya que la especie se cría en laboratorios de todo el mundo (Kinth et al., 2013), esto debido al pequeño tamaño del pez adulto (3cm X 2cm X 1cm); lo que garantiza el mantener numerosos ejemplares en un reducido espacio, reduciendo costos y el espacio de las instalaciones, además la reproducción del pez cebra es continua, una hembra puede producir alrededor de 200 óvulos en cada puesta y el éxito de la fecundación es alto ya que se fecundan cerca del 90% de óvulos eclosionados (Vargas-Vargas, 2017).

Con todos estos antecedentes del pez cebra, su uso para la investigación en producción *in vitro*, proporcionaría resultados para otras especies comerciales, ya que si bien es un pez que se cultiva ya sea por razones de investigación u ornamentales, existen evidencias bibliográficas que respaldan la teoría de que es posible obtener carne *in vitro* desde peces ornamentales. En el año 2001 la NASA financió un estudio sobre la utilización de explantes (Fragmento de un tejido extraído de un ser vivo para cultivarlo en un medio artificial, RAE) del músculo esquelético del pez dorado (*Carassius auratus*) en medios de crecimiento vegetales, cuyos resultados (figura 3) demostraron que el área de los explantes (mm²) cultivados en distintos extractos de hongos presentan diferencias significativas en comparación con el suero control (SBF) como control. El mayor crecimiento del área cultivada en extracto de hongo Maitake fue un 15.6% mayor respecto a otros extractos de hongos y respecto al control con SBF (Benjaminson et al., 2002).

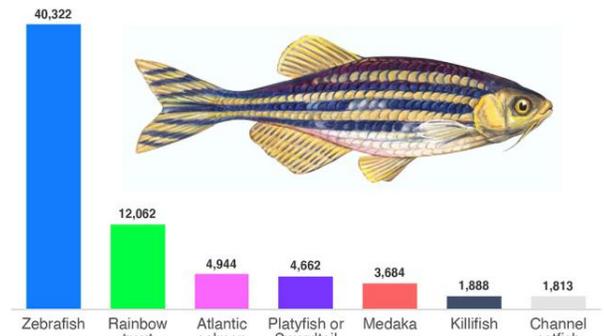


Figura 2: Pez cebra como el pez más estudiado en ciencias. Los resultados de búsqueda dentro de la base de datos de PubMed revelaron que *Danio rerio* presentó 40.322 publicaciones, frente al recuento de publicaciones de otras especies dulceacuícolas. Fuente: Potter et al., 2020.

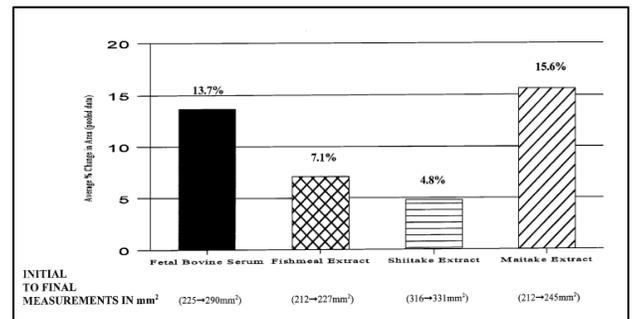


Figura 3: Resultados experimentales de la sustitución del suero fetal de bovino. Fuente: (Benjaminson et al., 2002).

Para el cultivo de la carne *in vitro* la fuente de células es vital en el éxito del cultivo, una de las principales fuentes de interés deriva de células madre, con características de multi o totipotencialidad, se caracterizan por ser células indiferenciadas con capacidad de replicarse y bajo ciertas condiciones controladas, pueden ser inducidas a diferenciarse en células de un linaje específico (Oyarzún E., 2005). Siendo las responsables de la cicatrización cuando el tejido sufre algún tipo de trauma (ya sea herida, quemadura, etc.) (Asakura, Komaki & Rudnicki, 2001).

Por otra parte, una fuente de células musculares adultas (CMA), pluripotentes posee la capacidad intrínseca de dar lugar a células adultas del linaje del mismo tejido en el que se encuentren, donde su función es conservar y restaurar dicho tejido, sugiriendo ser la mejor opción para producir mioblastos (Datar & Betti, 2010).

1.4. Cultivo de células musculares

Para consideración de la técnica a utilizar se tiene que el cultivo celular es una herramienta *in vitro* ampliamente utilizada donde se permite mantener y estudiar las células fuera del organismo (R. Ian Freshney, John Wiley & Sons, 2005). Los cultivos celulares pueden definirse como un sistema formado por células provenientes de un órgano o un tejido siendo mantenidos en medios de cultivo. Como objetivo de la técnica se tiene la finalidad de aumentar el número de células en condiciones artificiales controladas, para posteriormente llegar a la diferenciación (Cartín-Rojas & Ortiz, 2018). En cultivo podemos encontrar dos fases fundamentales los cuales consideran: la fase de proliferación y la fase de diferenciación. Para el caso de proliferación hay que maximizar las duplicaciones de las células, esto se puede lograr mediante la inclusión de factores de crecimiento adecuado en los medios de cultivos, mientras que la diferenciación se debe someter los miotubos (células musculares diferenciadas) a estímulos eléctricos y/o mecánicos, con el fin de que produzcan las proteínas que caracterizan al tejido muscular y así obtener la consistencia del filete (Post, 2012).

Para los peces es recomendable utilizar cultivos celulares derivados específicamente de la especie de interés, para ello es necesario establecer cultivos celulares primarios¹ de mioblastos provenientes del músculo esquelético (células con capacidad de sintetizar filamentos finos poco antes de su fusión con otros mioblastos) para dar lugar a la formación de miotubos (Johnston et al., 2011). ¹Los cultivos primarios son aquellos preparados directamente del tejido de interés con las mismas características celulares, este procedimiento debe realizarse de manera rápida ya que las células primarias sólo pueden conservar sus características originales durante un breve período de tiempo antes que entren en apoptosis (Freshney, 2010).

1.4.1. Proceso Miogénico

La formación de las fibras musculares o miogénesis ocurre después de la formación del embrión, continúa a lo largo de la vida del feto y se completa principalmente al nacer (Orzechowski, 2015), ya que las fibras musculares son multinucleadas, siendo el resultado de la fusión de mioblastos que

no son multinucleados. Los cultivos de mioblastos de peces constan de los siguientes pasos para el proceso miogénico, en donde principalmente se realiza el compromiso de las células precursoras, la proliferación y migración de los mioblastos. Mientras que en el proceso de la tendencia a la diferenciación participan la difusión de mioblastos en miotubos para su posterior maduración en fibras musculares (Johansen & Overturf, 2005; Almeida et al., 2010) (Ver Figura 4).

La miogénesis ocurre principalmente durante el desarrollo del embrión y el feto, sin embargo, se ha descrito que este proceso también podría ocurrir en ejemplares adultos, a través del reclutamiento de células miosatélites para la regeneración muscular después de una lesión o como una adaptación a la carga de trabajo (Orzechowski, 2015). A medida que un organismo envejece, el potencial regenerativo de la población de miosatélites disminuye rápidamente, de ahí la preferencia por cosechar células de miosatélites de animales recién nacidos (Datar & Betti, 2010).



Figura 4: Proceso miogénico desde el compromiso de células precursoras miogénicas hasta su diferenciación en fibras musculares. Fuente: (Duran, 2019).

1.5. Líneas Celulares

1.5.1. CHSE-214

Las CHSE-214 corresponden a una línea celular a partir de tejido embrionario de salmón Chinook (*Onchorhynchus tshawytscha*) que se inició en 1964 (Fryer & Lannan, 1994). Desde entonces, ha sido utilizada para estudios de diagnóstico citopatológicos en referencia a su susceptibilidad a una amplia gama de patógenos como virus y bacterias de peces, las que han permitido estudiar los mecanismos de acción de dichos virus, como el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) (Levicán et al., 2017). A pesar de que es una línea celular de tejido embrionario, no se han identificado estudios referentes a la diferenciación celular para un determinado linaje, lo que hace interesante abordar como desafío dentro de este trabajo.

1.5.2. C2C12

Las C2C12 son una línea celular de mioblastos de murinos (ratón) derivada de células satélite (Yafel & Saxel, 1977). Las cuales se usan como un modelo *in vitro* en la regeneración muscular debido a su

gran capacidad de pasar a una fase proliferativa a una diferenciada con los estímulos adecuados (Kokabu et al., 2017). Dado que existen antecedentes de su uso en el desarrollo de cultivos 3D (Sánchez, 2022), el interés de este trabajo es usarlas como control de crecimiento para los andamiajes tridimensionales.

1.6. Matriz Extracelular (ECM)

Las fibras musculares poseen una matriz extracelular constituida por tejido conjuntivo denso compuesto por moléculas de la ECM tales como fibrina, fibronectina, laminina, colágeno, proteoglicanos, entre otras de las cuales interactúan directamente con las fibras musculares (Figura 5). Parte de la composición molecular de las capas de tejido lo compone una red de colágeno mecánicamente fuerte (Bomkamp et al., 2021).

La ECM se sintetiza, degrada y reorganiza constantemente. La degradación de la ECM es necesaria para la formación de miotubos y migración celular, este proceso es clave a la hora de realizar cultivo primario a partir de un explante, ya que está se regula en gran medida por enzimas denominadas colagenasas, que degradan las uniones de colágeno, fibronectina, laminina, y los proteoglicanos. Sin embargo, se ha evaluado el uso de otras enzimas con este objetivo como por ejemplo dispasa, que se ha demostrado su utilidad para la disociación de tejido (Bomkamp et al., 2021).

La matriz extracelular que requieren las células de peces para sobrevivir y proliferar de manera *in vitro* en las placas de cultivo, las cuales son placas especiales tratadas para favorecer la adhesión de las células, generalmente contienen una superficie recubierta de poliestireno, que permite ser más hidrófilas que las placas no tratadas para el cultivo, favoreciendo la adhesión de las células musculares y las cuales deberán estar recubiertas de laminina (Oestbye & Ytteborg, 2018) u otra ECM.

Por lo tanto, para el éxito de la construcción de un tejido 3D se requiere inicialmente la formación de la matriz 3D de manera *in vitro*, por lo que, en esta propuesta, se analizan las potenciales proteínas y estructuras disponibles, sugeridas con ventajas para este fin, que poseen antecedentes de eficiencia a la hora de construir un tejido 3D.

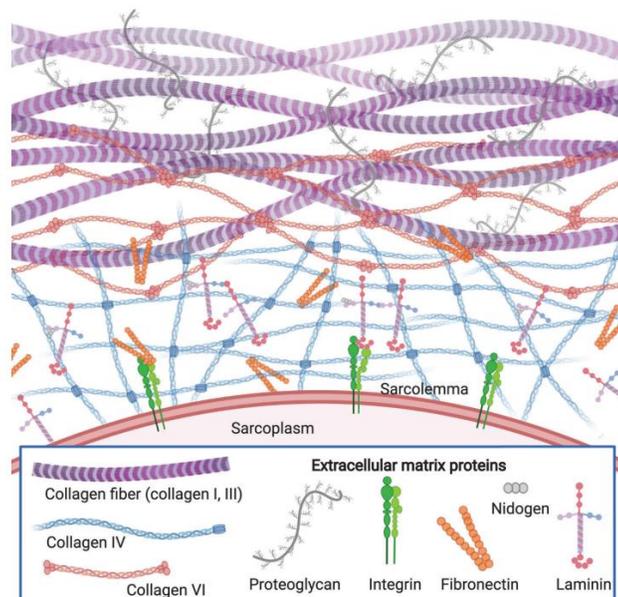


Figura 5: Representación esquemática de la composición de la matriz extracelular (ECM).

1.6.1. Colágeno

El colágeno es la principal proteína estructural en la EMC muscular. El colágeno I y V son los principales tipos en el músculo de pescado (Ramshaw et al., 1996). La membrana basal del músculo se compone principalmente de una red de colágeno tipo IV.

En los peces, el colágeno muscular tiene baja estabilidad térmica y, por lo tanto, no puede mantener su estructura durante las temperaturas altas (por ejemplo: la cocción). Por lo tanto, la textura de la carne de pescado se atribuye principalmente a las fibras musculares (Listrat et al., 2016). Una consecuencia importante de esta estabilidad térmica inferior es que en los peces el músculo se vuelve escamoso cuando se cocina debido a la fusión de colágeno. Los andamios para peces cultivados necesitarán simular esta estabilidad térmica ya sea teniendo un punto de fusión más bajo o proporcionando un entorno propicio para obtener un colágeno apropiado (Bomkamp et al., 2020).

Para la producción de andamiajes basados en colágeno, se puede obtener desde proveedores comerciales tales como Thermofisher, Merck, entre otros. Sin embargo, la utilización de estas fuentes de colágeno encarecería la elaboración de un tejido 3D, debido a los altos costos de este tipo de sustrato de ECM. Sugiriendo la existencia de otras fuentes naturales de esta proteína y además de origen marino, ya que el colágeno de organismos marinos es una opción atractiva por ser muy abundante en residuos sólidos que genera la industria pesquera y es que la gran cantidad de desechos que son generados consisten en partes no consumidas como piel, escamas, esqueleto, cabeza, colas y aletas (Coppola et al., 2021).

1.6.2. Laminina

Las lamininas (LMs) son proteínas de la ECM que predominan en las membranas basales, cuya forma estructural se asemeja a una forma de cruz (Durbeej, 2010). De hecho existen distintas isoformas de LM dependiendo del tejido y lo que hacen las LMs es que se unen a los factores de crecimiento, proteínas ampliamente utilizadas en ingeniería de tejidos debido a su capacidad para controlar los procesos de diferenciación de células madre (Dobre et al., 2021).

Los cultivos en placas petri revestidas de laminina tienen diferentes aplicaciones, existen antecedentes de su uso para las células como el trasplante de mioblastos o el tratamiento con LM optimizan la regeneración muscular (Riederer et al., 2015), ya que incrementan significativamente la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular de diversos tipos de células, particularmente neuronas, células epiteliales, miocitos y mioblastos (Kortessmaa et al., 2000). Para el cultivo de fibras musculares existe evidencia que su uso mejora la adhesión ya que, en el tejido muscular esquelético, las lamininas desempeñan un papel estructural, interactuando con otras isoformas de lamininas, uniendo las fibras musculares a otros componentes de la ECM, como colágenos y proteoglicanos y glicosaminoglicanos (Lund & Cornelison, 2013), por lo que su uso es sugerido para optimizar la eficiencia de estructuración de este linaje celular.

1.7. Andamios

Se define como andamio tisular a un material poroso donde las células como mioblastos, que necesitan de un anclaje, por lo que las células requieren de un andamio que debe tener la microestructura y las propiedades físicas adecuadas para permitir la unión y proliferación celular (Enrione et al., 2017), además de ser flexible (que permita la contracción). Los materiales de este tipo de andamios deben ser preferentemente naturales, inocuos (no tóxicos), comestibles y de bajo costo, pensando en su futura aplicación en la industria alimentaria.

Los andamios para el cultivo celular y la ingeniería de tejidos se producen y ofertan en una variedad de formas como se muestran en la Tabla II, los más sencillos son los microportadores, que suelen utilizarse para la proliferación celular a gran escala o las perlas hechas de colágeno comestible como sustrato, cuya elección se basa principalmente en maximizar el área de superficie, permitiendo aumentar la difusión y la cantidad de nutrientes en el tejido, que se pueda cultivar al igual que el resto de andamios (Edelman et al., 2005). Para la maduración del tejido, la mayor parte de la evidencia los clasifica como andamios porosos, hidrogeles o de fibra. Si bien tanto los andamios porosos como los de fibra contienen espacios vacíos a través de los cuales pueden circular los medios, estos difieren en estructura, siendo los andamios porosos sugeridos por ofrecer una estructura similar a una esponja y los andamios de fibra, una estructura constituida por fibras largas y delgadas. Para el caso de los hidrogeles estos imitan la estructura de la EMC natural, lo cual es una ventaja para la compatibilidad celular, de hecho, la composición puede resultar en base a colágeno, fibrina y/o matrigel (Bomkamp et al., 2021).

En cuanto a los aspectos físicos del andamio; la rigidez del sustrato incide directamente sobre la eficiencia de la proliferación de células miosatélite y la maduración de los miotubos, mientras que la estimulación mecánica es importante para la alineación de los mioblastos y la maduración de los miotubos. Si el material del andamio corresponde con alguno de los componentes de la ECM del mismo linaje del tejido estos se sugieren, ya que son más eficientes debido a su correlación con las células de la especie y por ende le otorga los factores de crecimiento (Langelaan *et al.*, 2010).

Tabla II: Ventajas y limitaciones de los distintos tipos de andamiaje.

Tipo de Andamio	Ventaja	Limitaciones
Microportadores 	Resultan ser simples de producir, permiten una eficiente adherencia celular (Bomkamp et al., 2021).	El usar materiales no comestibles, requiere de un proceso de disociación de andamio-célula, lo que probablemente aumente los costos (Bomkamp et al., 2021).
Andamios Porosos	La estructura de poros permite facilitar el transporte de oxígeno, nutrientes y	Su aplicabilidad se puede ver afectada en la porosidad, es decir,

	<p>desechos. Proporcionan estabilidad mecánica para que las células formen tejidos (Zeltinger et al., 2001).</p>	<p>que si los poros son pequeños no permiten el transporte eficiente de nutrientes y oxígeno para las células (Zeltinger et al., 2001).</p>
<p>Andamios de Fibras</p> 	<p>Apoyan la adhesión de fibras musculares, capaces de alinearse para promover la maduración de dichas fibras (MacQueen et al., 2019).</p>	<p>La ampliación y el escalado de este tipo de andamios conllevan un alto costo asociado (Bomkamp et al., 2021).</p>
<p>Hidrogeles</p> 	<p>Los hidrogeles hechos de más de un tipo de material (asociaciones) muestran propiedades mejoradas en comparación con los andamios hechos de un solo material (Chang et al., 2013). <i>Ejemplo:</i> La asociación de fibrina y colágeno hace que la maduración tisular sea más adecuada en comparación al colágeno solo (Beier et al., 2009).</p>	<p>Los hidrogeles que son demasiado rígidos pueden inhibir la proliferación y migración de las células (Drury & Mooney, 2003).</p>

En la actualidad existen diversos tipos de polímeros biocompatibles que podrían ser utilizados en sustitución de los componentes naturales y que podrían optimizar el proceso biotecnológico de la construcción de tejido 3D, los que se destaca el uso de polímeros como alginato, quitosano y otras proteínas de origen marino, inclusive el colágeno de origen marino (Liu et al., 2022).

1.7.1. Alginato

El alginato es un polisacárido derivado de las algas pardas, puede también ser un material de andamiaje prometedor. Se ha demostrado que los tubos derivados de alginato soportan una alta densidad celular y las tasas de crecimiento de las células madre pluripotentes y para ser compatible con los protocolos de diferenciación (Bomkamp et al., 2021).

El desarrollo de compuestos híbridos o asociaciones de colágeno y alginato se han visto en distintos estudios ya sea para mejorar la cicatrización de heridas a partir de apósitos de hidrogel, ya que promueven la formación de tejido de granulación y aceleran la regeneración epitelial (Feng et al., 2020). Existen antecedentes que sugieren su exitoso uso en la bioimpresión de hidrogeles cargados de células imprimibles en 3D a partir de mezclas de colágeno extraído de la piel de tiburón azul (*Prionace glauca*) con alginato, obteniendo excelentes propiedades mecánicas y la supervivencia de líneas celulares de fibroblastos de ratón durante y después de la impresión, por lo que ayudo a la proliferación de fibroblastos debido a la presencia del colágeno de tiburón (Diogo et al., 2020).

1.7.2. *Durvillaea antarctica*

D. antarctica o también conocida como “Cochayuyo”, es una macroalga parda comestible que se encuentra en el hemisferio sur en la franja intermareal-submareal de las costas chilenas (Smith et al., 1998). Su uso ha sido demostrado principalmente en el campo culinario y para la producción de extractos de alginatos (Mateluna et al., 2020).

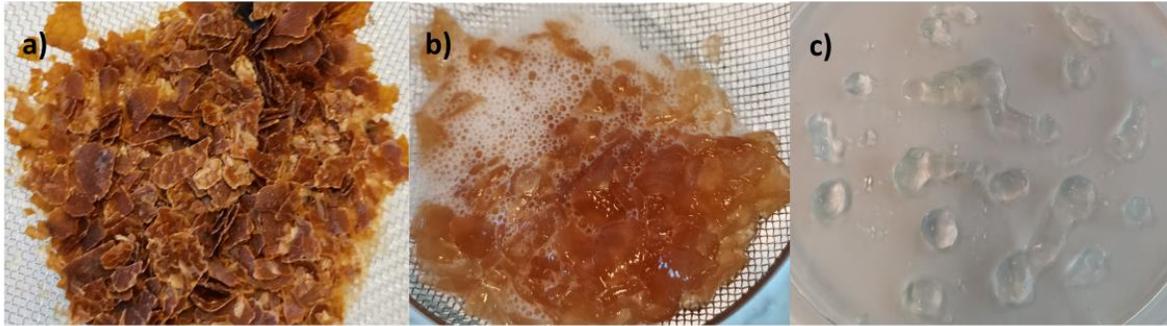


Figura 6: *Durvillaea antarctica* durante la fabricación de andamios de LUYEF. a) Cochayuyo triturado. b) proceso de descelularización. c) Luego del proceso de neutralización (Sánchez, 2022).

Finalmente, un parámetro clave para el crecimiento celular es la selección y el desarrollo de medios de cultivo para la mantención de las células (Baust, 2007).

1.7. Medios de Crecimiento

Los medios de cultivo celular corresponden a una mezcla de nutrientes y factores de crecimiento que, junto con el entorno físico pueden permitir llevar a cabo tanto el crecimiento como la división de las células, tanto así que los requerimientos nutricionales difieren en los distintos tipos de células, ya que se utilizan diferentes aminoácidos y otros componentes (Baust et al., 2017) como el uso de sueros animales, adición de glucosa, sales inorgánicas, entre otras.

Las variables por considerar para la preparación de medios de cultivo de peces son: concentración de sales para equilibrar la osmolaridad, soluciones tamponadas para el mantenimiento del pH, selección de parámetros fisicoquímicos como la temperatura y fundamentalmente una fuente de carbono estable. Sin embargo, existen medios comerciales sugeridos que pueden ser utilizados como el Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) y Leibowitz's 15 (L-15) medium (Fernandez et al., 1993). Estos medios están completamente definidos y son fáciles de replicar, incluido el contenido de sales inorgánicas, aminoácidos y nutrientes básicos para el crecimiento del cultivo. Es fundamental considerar la incorporación de factores de crecimiento, según antecedentes bibliográficos y resultados preliminares sugieren el uso de suero fetal bovino (SBF) como un aditivo común en los medios de cultivo (Arora, 2013), que dependiendo del individuo y las células de interés el porcentaje de SBF suele variar según el linaje celular o tejido específico, sin embargo, el uso de este suplemento debe ser restringido a la etapa de replicación o amplificación del cultivo, y durante

la diferenciación se sugiere el suero no fetal como el suero de caballo (HS) que induzca la diferenciación de las células (Ganassi et al., 2021).

Por último, es fundamental la evaluación de la adherencia de las células frente a los andamios como se sugiere en el estudio de Feng et al. (2020), quien evalúa este parámetro a través de la medición de viabilidad celular en la superficie de los apósitos hechos de colágeno-alginato, cuya comparación sugiere que la mayor viabilidad de las células era relacionada con la mayor adherencia generada en el hidrogel. Finalmente se sugiere que la definición de la densidad celular es fundamental, y se sugiere mejorar con el uso de los andamios de estructura porosa, lo que permitirá definir la eficiencia de producción de un tejido 3D en este proyecto.

1.9. LUYEF Biotechnologies

Luyef es una empresa emergente de tecnología alimentaria impulsada por la misión que desarrolla la tecnología para interrumpir verdaderamente la industria de la carne al traer al mercado productos ecológicos y libres de animales asequibles, de alta calidad y altamente sofisticados que realmente puedan competir con la carne convencional (LUYEF, 2023). Dicha empresa se ha dedicado a financiar el estudio de andamiajes y análisis de escalamiento del cultivo de células satelitales para la producción de carne cultivada (Sánchez, 2022). Durante este proyecto de investigación, se realizó una estancia en dependencias de la Universidad de Chile, pudiendo evaluar andamiajes desarrollados por ellos de origen marino.

Hipótesis

Los andamios han demostrado ser estructuras adecuadas para el crecimiento en cultivos celulares por poseer propiedades entre las cuales se destacan la adhesión celular, proliferación e inclusive diferenciación, por lo tanto, se espera que:

“La utilización de andamios naturales como *D. antarctica* en conjunto con proteínas de adhesión permiten aumentar el crecimiento celular para elaborar un cultivo tridimensional con respecto a un cultivo celular en 2D, a partir de fuentes celulares de peces.”

Objetivo general

- Comparar el crecimiento celular de distintas fuentes celulares en 2D y posteriormente en 3D con el uso de andamios hechos de *Durvillaea antarctica* de la empresa LUYEF Biotechnologies.

Objetivos específicos

- Desarrollar un cultivo celular en 2D a partir del musculo esquelético del pez cebra "*Danio rerio*".
- Comparar la eficiencia de cultivo 2D de distintas fuentes celulares; cultivo primario, linaje de células embrionarias de salmón (CHSE-214) respecto al cultivo de la línea celular muscular de ratón (C2C12).
- Evaluar el crecimiento de las líneas celulares en los andamios desarrollados a partir de *D. antarctica* producidos por LUYEF Biotechnologies.

Materiales y Métodos

3.1. Mantención de peces cebra (*Danio rerio*)

Para la mantención y cuidado de peces cebra el Laboratorio de Toxicología Acuática de la Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas, UdeC (LTxA) utiliza un sistema automático de recirculación de agua (Figura 7). En este se agrega agua destilada en el sumidero inferior la cual pasa a través de filtros de carbón y se esteriliza con UV, para luego permitir que ingrese a los tanques donde se encuentran los peces. El agua en los acuarios sigue circulando con la ayuda de una pequeña bomba de agua en el tanque base. El sistema cuenta con 15 estanques con aproximadamente 15 L de capacidad cada uno, los que son capaces de contener hasta 30 peces adultos.

Los ejemplares de pez cebra adultos de la cepa WT (Wild Type) de 12 meses a 24 meses de edad, se mantuvieron en los acuarios a 28°C con un estabilizador de temperatura en cada estanque para mantener la temperatura y con un fotoperíodo de 14 :10 horas de luz/oscuridad. Los peces fueron alimentados con pellet Skretting GEMMA, dos veces al día, junto con un monitoreo constante de pH, temperatura, y conductividad del agua, de acuerdo con las normas de bienestar animal de la UdeC y con el fin de prevenir patologías y mantener la salud en los tanques.

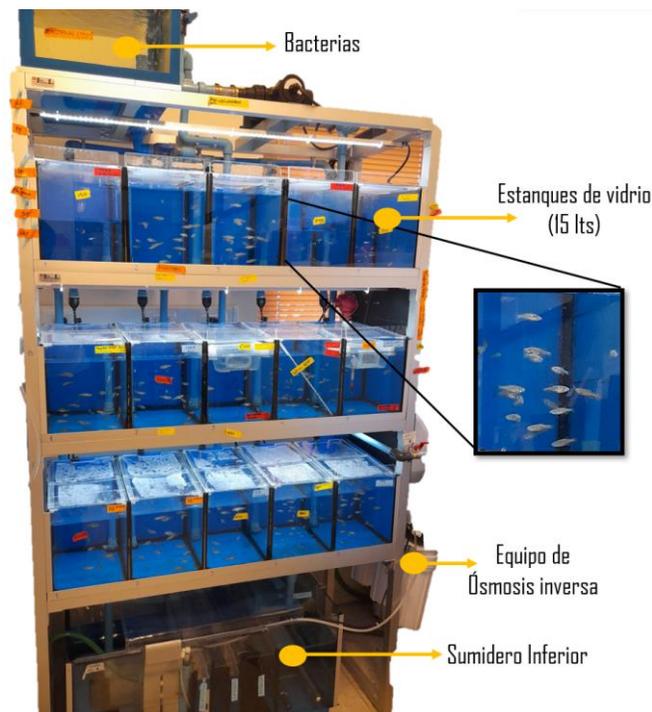


Figura 7: Sistema de Recirculación de Agua del laboratorio de Toxicología acuática.

3.1.1. Eutanasia

Los peces fueron sacrificados según los protocolos de bioética del LTxA, por lo cual se sugiere el método por sobredosis de anestésicos como Tricaína o MS-222* (0,3 mg/ml) o Isoeugenol 50% (0,026 ml/L) en conjunto con inmersión en hielo, dado que todos los peces pueden sufrir un choque de temperatura cuando se colocan en agua fría, sobre todo las especies de aguas cálidas como el pez cebra (*Danio rerio*) (Davis et al., 2022).

*El metanosulfonato de tricaína es uno de los anestésicos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para anestesiarse y sacrificar peces.

3.1.2. Desinfección / Esterilización

El cuerpo del pez previamente eutanasiado, es expuesto a una solución de etanol al 70% durante unos 30 segundos y posteriormente es transferido a una tabla de disección, con la ayuda de pinzas y alfileres entomológicos, con un bisturí de hoja n°10, se eliminan las escamas para disminuir riesgos por contaminación microbiana. El cuerpo es transferido a una placa petri de 100mm que contiene PBS más antibióticos – (Penicilina/Estreptomina) (ver receta n°3 del anexo) durante unos 30 segundos.

3.1.3. Disección

El cuerpo del pez es transferido a la tabla de disección. La disección mecánica se realiza bajo lupa con luz fría, se cortan todas las aletas y la cabeza como se observan en la figura 8, para luego abrir con un bisturí el abdomen, lo que facilita la extracción de los órganos y desgarrando cuidadosamente la piel para exponer el músculo y facilitar su extracción.

3.1.4. Disgregación Enzimática

La disgregación enzimática es una etapa clave del aislamiento celular y primera fase del desarrollo del cultivo primario. Se realizó una digestión del tejido con el fin de liberar las células del músculo esquelético progenitor. Dado que en literatura se sugieren diferentes protocolos y enzimas, en este trabajo se realizó una comparación de la eficiencia de digestión utilizando distintas enzimas para optimizar el protocolo de aislamiento de (Alexander et al., 2011) y de (Ganassi et al., 2021).

- Colagenasa tipo I (Gibco™, número de catálogo: 17100017)
- Dispasa II (Sigma-Aldrich, número de catálogo: D4693)
- Tripsina (Gibco™, número de catálogo: 25200056)

El explante fue digerido con Colagenasa tipo I (debido que es uno de los principales tipos de colágeno en peces), la solución se incubó a temperatura ambiente durante unos 45 minutos,

homogenizando mediante agitación suave (figura 8.f y g). Pasado el tiempo de incubación, se inactivan las enzimas mediante incubación con medio completo con 10% SBF, y los desechos residuales o “escombros” del tejido se separan mediante filtración a través de un filtro de 70µm y posteriormente este filtrado es nuevamente separado por un filtro de 40µm.

Volumen recomendado = 1g de Tejido → 3,5ml de enzima

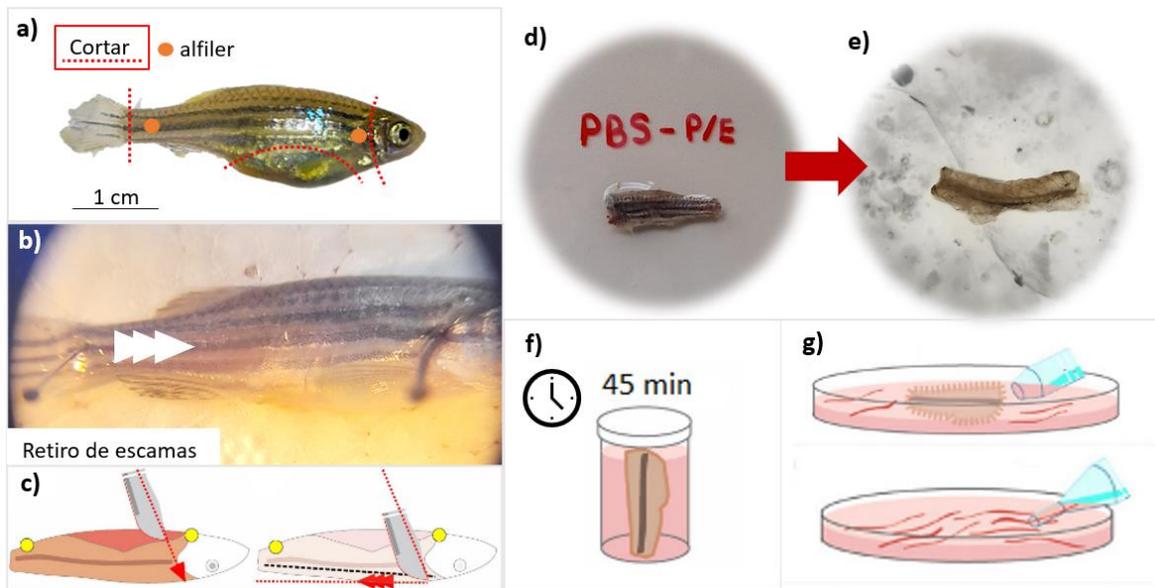


Figura 8: Disección del músculo esquelético de pez cebra adulto. a) ejemplar de pez cebra adulto representando el posicionamiento del alfiler (puntos naranjas) para anclar a la tabla de disección. Las líneas discontinuas rojas indican los cortes para extirpar. b) las flechas blancas indican el sentido que debe pasar el bisturí para eliminar las escamas. c) Diagrama para realizar la incisión ventral para la evisceración. d) el resto del cuerpo es lavado en PBS - P/E. e) porción muscular del filete de pescado. f) el filete se incubó con solución enzimática para su disgregación durante 45 minutos. g) esquema de pipeteo para ayudar con la disgregación mecánica.

3.1.5. Aislamiento

Posterior a la disgregación y filtración, las células son aisladas por centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos a 9°C. Una vez centrifugada la muestra, el sobrenadante se aspira y el pellet se resuspende en tampón de lisis de glóbulos rojos (ver receta n°7 del anexo), incubándose durante 3 minutos a temperatura ambiente antes de su neutralización con medio L-15 completo (10% SBF). Se realizó una segunda centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos a 9°C, y el sobrenadante se descarta por aspiración y el pellet se resuspende en medio L-15 para ser sembrado en placas de cultivo pre-recubiertas con matrices de adhesión.

3.1.6. Mantención de los cultivos celulares de MSCz

Las células MSCz (Muscular Skeletal Cells zebrafish) se mantienen en placas que son incubadas en cámaras a una temperatura de 28°C (temperatura óptima para el pez cebra), resguardando la humedad del ambiente y con un monitoreo periódico (diario) bajo microscopio invertido. El medio se recambia cada 2 a 3 días según se estima conveniente.

3.2. Recubrimiento con matrices de adhesión en placas.

Las placas de cultivo son recubiertas con las proteínas de matriz extracelular comercial por 24 horas o durante la noche dependiendo el tipo de recubrimiento a una temperatura de 27°C, posterior a lo cuál se retira el exceso y se lava con solución salina (PBS 1X) antes de su uso.

Para el recubrimiento de las placas con Colágeno I (Gibco™, A1048301) ver receta n°8

Para el recubrimiento de las placas con Laminina (Gibco™, 23017-015) ver receta n°9

Para el recubrimiento de las placas con Gelatina Tipo A (Sigma-Aldrich G1890) ver receta n°10

3.3. Mantención de Líneas celulares

3.3.1. Mantención de CHSE-214

Las células CHSE-214 (ECACC 91041114) son mantenidas en medio L-15 suplementado con 2mM de Glutamina, 10% de Suero Bovino Fetal (SBF) y 1% de antibiótico, con control de temperatura de incubación de 20°C. La rutina de subcultivo o pasaje se realiza en base a la confluencia de los cultivos (~70 – 80%). Para placas de 96 pocillos se siembra a 10.000 células por cm utilizando 0.25% de tripsina/EDTA, las células se desprenden después de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.

3.3.2. Mantención de C2C12

La línea celular C2C12 (CRL-1772) son mantenidas en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de antibiótico. Los cultivos requieren una temperatura de incubación de 37°C, control de humedad e inyección de CO₂ (5%), de acuerdo con los requerimientos de las células de mamíferos. Para la rutina de subcultivos, las células son disgregadas con 0.25% de tripsina/EDTA en menos de 5 minutos a temperatura ambiente.

3.4. Conteo celular

Se requiere la cuantificación del número celular presentes en un cultivo (densidad celular). Para ello la cuantificación se realizó utilizando el método de exclusión de azul tripán (Kerschbaum et al., 2021), un colorante vital que se introduce en el interior de las células que presentan ruptura o daño en su membrana plasmática. Se resuspende un volumen de suspensión celular con uno igual de disolución de azul tripán p/v en relación 1:1. Las células son contadas en un hemocitómetro (Figura 9.b).

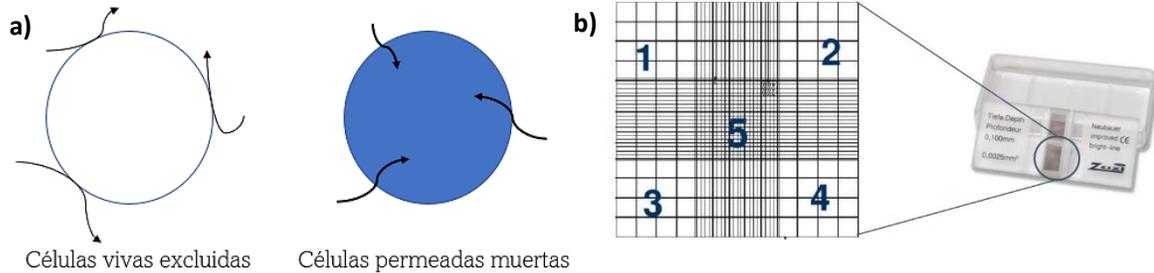


Figura 9: Principio del método de azul de tripán. a) las células que se ven de color azul corresponden a las células no viables. b) Cámara de Neubauer o hemocitómetro, es utilizada para el conteo de células en donde los cuadrantes a contar son 5 como se muestran en la imagen.

Para el cálculo de la densidad celular se usaron las siguientes ecuaciones

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \text{Conteo promedio por cuadrante} \times \text{factor de conversión} \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{Células total en frasco} = \frac{\text{Células}}{\text{mL}} \times \text{Volumen de la suspensión}$$

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Número de células totales} - \text{Número de células muertas}}{\text{Número de células totales}} \times 100$$

Nota: Para ver cálculo de ejemplo ver anexo.

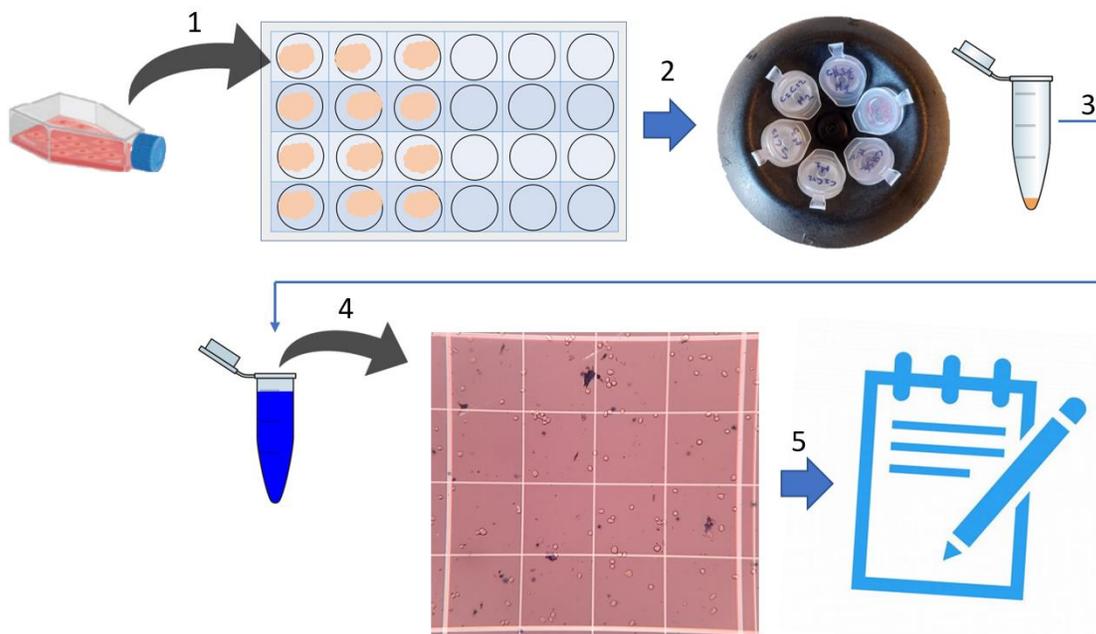


Figura 10: Diagrama del procedimiento de conteo celular. **1.** Traspaso de células a placa multipocillo como siembra inicial. **2.** Centrifugación 1000 rpm durante 5 minutos. **3.** Adición de azul tripan a la suspensión celular. **4.** Conteo celular en Cámara Neubauer. **5.** Registro de datos.

3.5. Ensayo con alamarBlue®

El reactivo de alamarBlue® es un kit de solución lista para su uso a base de una solución de resazurina que funciona como indicador de salud celular para medir viabilidad (Invitrogen, DAL 1025), este reactivo no es tóxico para las células. Para la determinación de viabilidad y poder reductor de las células frente al reactivo de alamarBlue se realizó una cuantificación en base a la determinación de la razón de cálculo de dos longitudes de ondas; 570nm y 600nm. Esto con el fin de determinar el porcentaje de reducción de alamarBlue. Ver preparación del ensayo en receta.

$$\%Reducido = \frac{Cred\ pocillo\ de\ prueba}{Cox\ pocillo\ de\ control\ negativo} \times 100$$

$$\%Reducido = \frac{(\epsilon_{ox})\lambda_2 \times A\lambda_1 - (\epsilon_{ox})\lambda_1 \times A\lambda_2}{(\epsilon_{red})\lambda_1 \times A'\lambda_2 - (\epsilon_{red})\lambda_2 \times A'\lambda_1} \times 100$$

Donde;

ϵ_{ox} = coeficiente de extinción molar forma oxidada

ϵ_{red} = coeficiente de extinción molar forma reducida

A = Absorbancia de los pocillos de prueba

A' = Absorbancia del pocillo control negativo (blanco)

λ_1 = 570nm

λ_2 = 600nm

Nota: Para ver cálculo de ejemplo ver anexo de la página 59.

3.6. Cultivos celulares en andamios de LUYEF

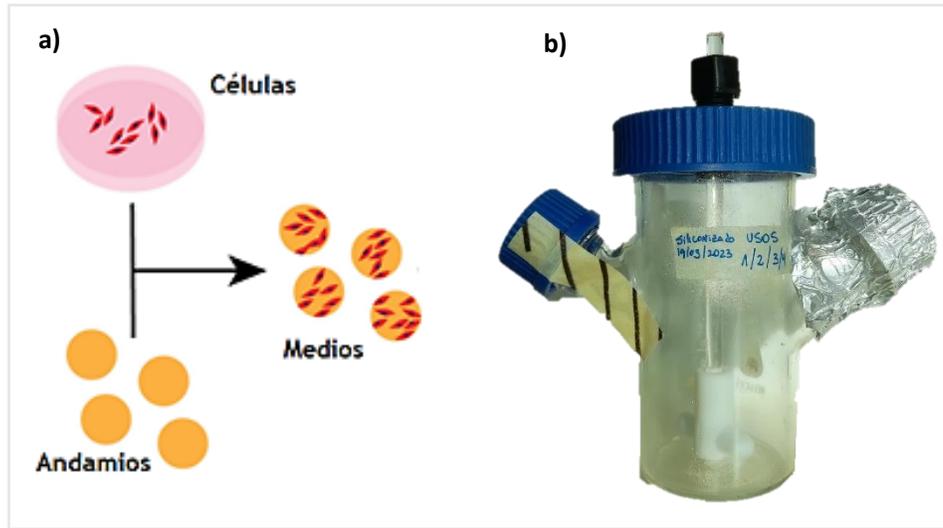


Figura 11: Diagrama de crecimiento de andamios en spinners. a) esquema de la composición de los medios de cultivo que se encuentran dentro de un b) Spinner con impeller de agitación tipo imán.

Los andamios descelularizados de *D. antarctica* de LUYEF se recubrieron con una de las matrices comerciales que mejor eficiencia de adhesión (actividad 3.2) se obtuvieron en el ensayo de adherencia celular mediante alamarBlue en 2D.

La fase de adherencia inicial de las células en los andamios requiere de una siembra inicial mayor a 10×10^6 (células/ml) para un peso de 15g de andamios de *Durvillaea antarctica* dentro del spinner. Junto con una intermitencia de 30rpm de agitación durante 5 minutos y 40 minutos de detención lo que permite a las células adherirse las primeras 6 horas de incubación. Pasado el tiempo se debe dejar con una velocidad de agitación constante de 30rpm hasta la finalización del experimento.

3.7. Obtención de Imágenes y datos

Las observaciones y fotografías fueron adquiridas a partir de una estación de imágenes de células llamado FLoid™ Cell Imaging Station con una resolución de imágenes asequible y fácil de usar para la detección y verificación rápida de muestras celulares (100μm). Además, se utilizó el registro de imágenes mediante el uso de cámara digital de un móvil portátil desde las observaciones de microscopía invertida. Para la obtención de imágenes de los andamios de *D. antarctica* estos fueron teñidos con cristal violeta (Merck, 101408) con 20μL, los que se colocaron sobre un portaobjeto para poder ser fotografiados a través del programa LAS EZ (Leica Application Suite) reconocida por su precisión óptica.

Los datos de lecturas de absorbancia de los ensayos con alamarBlue fueron obtenidos con el lector Omega (software versión: 5.50 R4).

3.8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizan en base a los experimentos del cultivo primario que se repitieron al menos dos veces utilizando disgregaciones y ejemplares de peces en diferentes días. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron significativos cuando $p < 0.001$.

Se analiza la normalidad y homocedasticidad de los datos que deben presentar para poder ser llevados a un análisis estadístico. Para el ensayo de adhesión en matrices con alamarBlue se utilizó ANOVA con una prueba post-hoc de Bartlett's. Tomando importancia con un valor $p < 0.05$ para las pruebas paramétricas. Todos los datos estadísticos fueron analizados por el programa de GraphPad Prism 8.0.1 (software GraphPad).

Resultados y Discusión

4.1. Desarrollo de un cultivo primario de pez cebrá en 2D.

4.1.1. Disgregación enzimática.

Para lograr una correcta disgregación del tejido y obtención de células musculares se determinaron los tiempos de incubación con distintas enzimas para liberar células individuales del explante.

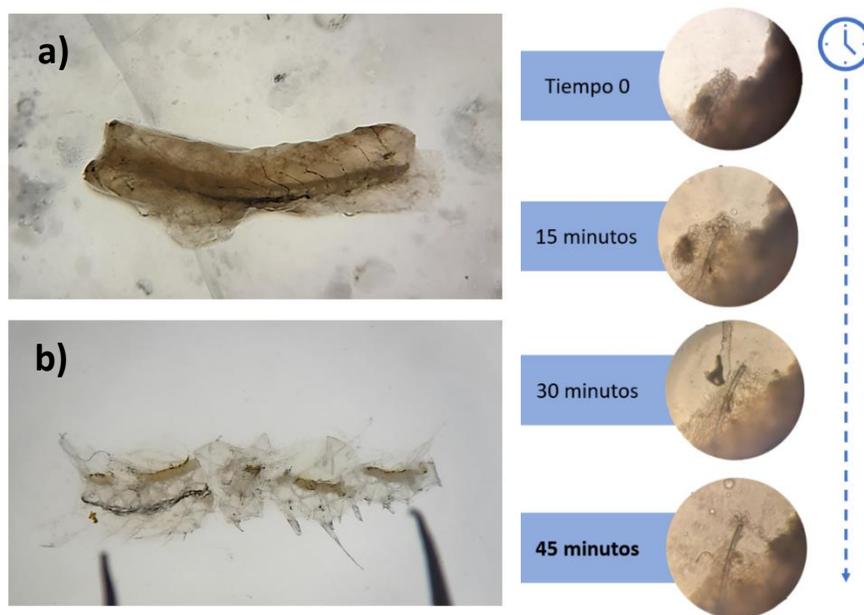


Figura 12: Digestión enzimática del explante a través del tiempo de incubación. a) Porción muscular del ejemplar diseccionado. b) post digestión enzimática del explante, observándose las hilachas del tejido y los restos del esqueleto, después de una exposición de 45 minutos.

Tabla III: Densidades celulares promedio alcanzadas con las distintas enzimas en la digestión del tejido.

Enzimas	Colagenasa	Dispasa	Colagenasa + Tripsina	Colagenasa + Dispasa
Densidad celular (células/mL)	$0,343 \times 10^6$	$0,415 \times 10^6$	$0,473 \times 10^6$	$1,102 \times 10^6$

Los resultados de experimentación de la figura 13 mostraron que la mezcla de enzimas de Colagenasa Tipo I y Dispasa II libera un mayor número de células ($1,228 \times 10^6$ células/ml) por digestión en comparación con las enzimas individuales y las formulaciones evaluadas. Las densidades celulares obtenidas se muestran en la tabla III. En base a estos resultados se puede concluir que el uso de la mezcla de Colagenasa más Dispasa a los 45 minutos concuerdan con lo que sugiere Alexander et al., 2011 para la obtención de células musculares, lo que determinaron que el porcentaje de células disociadas era mayor respecto a las enzimas individuales.

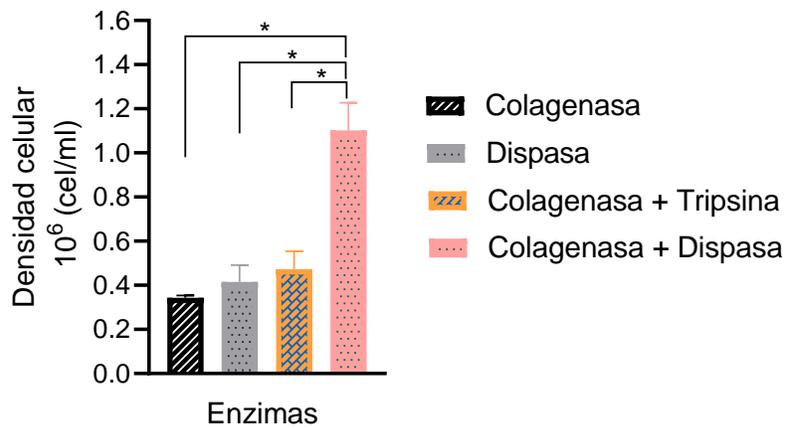


Figura 13: Impacto de las distintas enzimas frente a la viabilidad celular para el proceso de disgregación del tejido. *Significativamente diferente de las otras enzimas. $p < 0.001$.

4.1.2. Evaluación de técnicas asépticas para mitigar el riesgo de contaminantes en cultivos celulares.

La mantención de un cultivo celular estéril juega un papel importante, debido que sí se contamina el cultivo, las células se contaminan y permite que otros agentes contaminantes como por ejemplo bacterias puedan superar a las células deseadas y el pH del medio cambie a ácido (Baust et al., 2017). En la figura 14 se observaron diferentes tipos de contaminación en los cultivos en las células musculares de pez cebra.

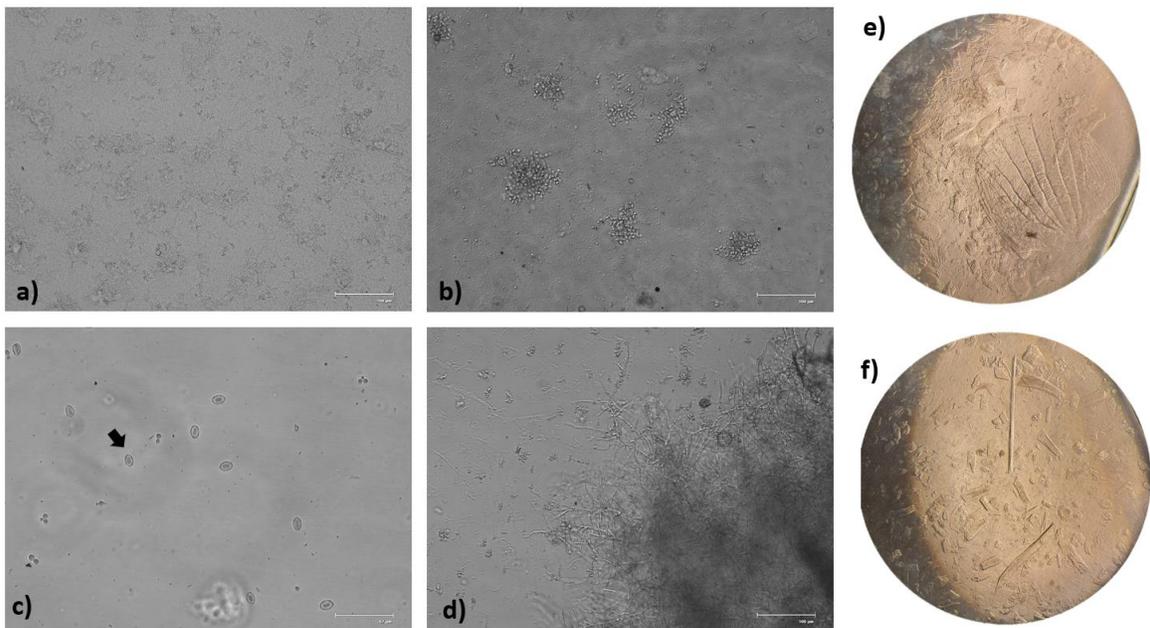


Figura 14: Imágenes procedentes de FLOID de distintos tipos de contaminación en un cultivo. a) Bacterias, b) Levaduras, c) Eritrocitos (glóbulos rojos), d) Hongos, e) escamas, f) espinas.

En el análisis de las causas de contaminación se observa que las fuentes de contaminación eran de diferente naturaleza, microbiana como hongos y bacterias principalmente, siendo una de las fuentes contaminantes más frecuentes y problemáticas debido a la difícil eliminación y porque afectan la sobrevivencia del cultivo celular, por lo tanto, se probó el uso de antibióticos y antifúngicos para prevenir y disminuir el riesgo de este tipo de contaminación. Obteniendo que la combinación de Penicilina/Estreptomina, anfotericina B y gentamicina mejoró este riesgo en los cultivos.

La contaminación cruzada con tejidos y estructuras propias del pez que son liberadas durante la disección muscular, como presencia de escamas y espinas pertenecientes al pez cebra (figura 14e y 14f), fue abordado, (mejorando la técnica del operador) con la mejor estrategia para evitar este tipo de contaminación, sugiriendo utilizar hojas de bisturí de manera exclusiva para cada etapa de la disección, es así como se define utilizar luego del proceso de descamación, se debe, desechar la hoja de bisturí y posteriormente utilizar una nueva hoja para la extracción de los órganos, para evitar contaminación con escamas en el cultivo de músculo esquelético. Para el caso de las espinas evitar ocupar tejidos que no fueron disgregados enzimáticamente en los cultivos, porque suelen ser una fuente de contaminación microbiana.

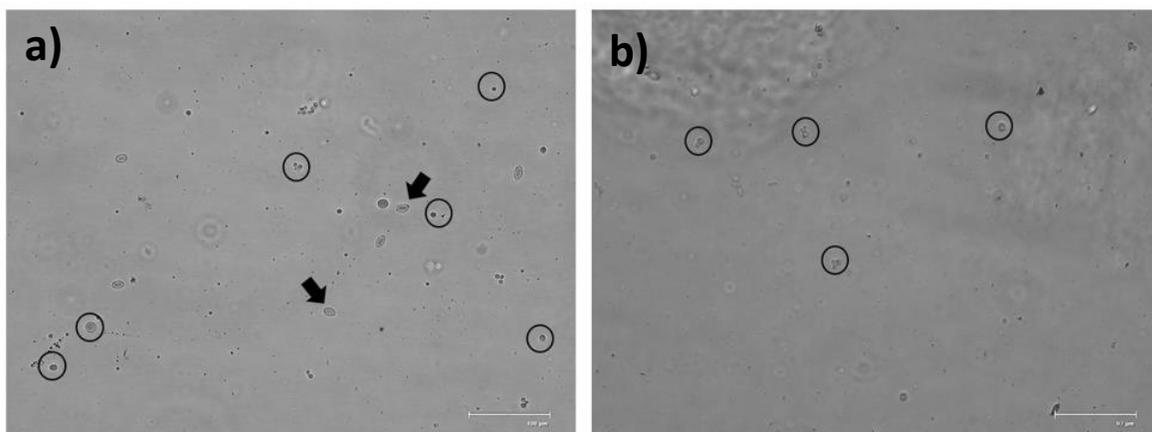


Figura 15: Eritrocitos en cultivo primario. a) presencia de eritrocitos (flecha negra) en la primera filtración (70µm). b) células musculares (círculo negro) post segunda filtración (40µm) + tampón de lisis de glóbulos rojos.

Para disminuir la contaminación con otras células, como eritrocitos en el cultivo primario, se realizó un proceso de filtración con dos tamaños de filtros, a través de un filtro de 70µm y luego de un filtro de 40µm. Observándose glóbulos rojos aún en el primer filtro (figura 15a). Una vez terminado el traspaso con el segundo filtro, la suspensión celular se resuspende en tampón de lisis de glóbulos rojos (receta n°7) durante un periodo de 3 a 5 minutos antes de su neutralización con medio, obteniendo un cultivo libre de eritrocitos como se observa en la figura 15b. Dicha solución tamponada de lisis contiene cloruro de amonio (NH₄Cl) que lisa los eritrocitos, lo que lo hace citotóxico para dichas células (Li et al., 2017).

Para disminuir o prevenir la contaminación con levaduras en cultivo se realizaron varios lavados del tejido con PBS, dejando un stock de prueba de todos los reactivos y medios que se encontraban en uso como se observa en la figura 16, donde el reactivo contaminado con levadura fue el PBS 1X, el

cual se utiliza constantemente para el lavado de células y dilución con otros reactivos, por lo que se procede a eliminar y descartar dicho reactivo y también los cultivos.

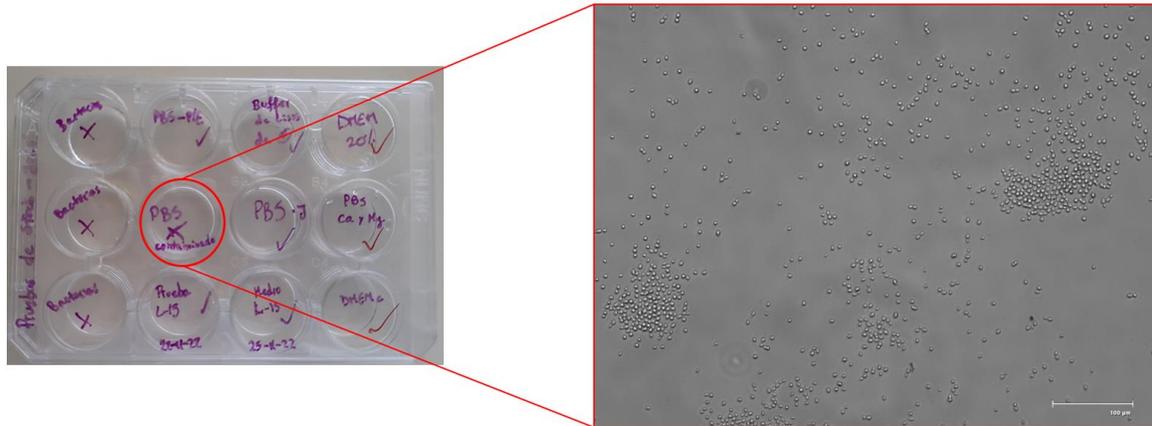


Figura 16: Prueba para reactivos y medios utilizados en el cultivo primario de pez cebra. Presencia de PBS contaminado con Levadura.

4.1.3. Adhesión celular en distintas matrices.

La evaluación de eficiencia de recubrimiento con proteínas de adhesión se realizó mediante el ensayo de viabilidad celular con alamarBlue®, teniendo como control pocillos sin ningún recubrimiento de matriz pero que contenían células y medio celular L-15 de manera idéntica a los pocillos recubiertos.

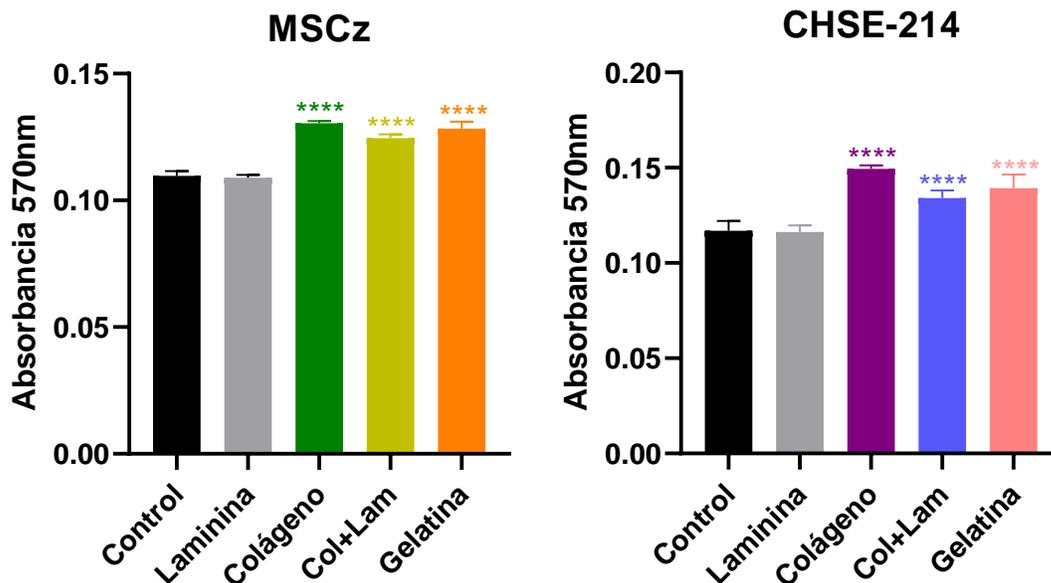


Figura 17: Absorbancia (570nm) medida mediante alamarBlue®, de dos fuentes celulares de peces (MSCz y CHSE-214) en distintas matrices de recubrimiento en placa. ****Significativamente diferente del control. $p < 0.001$.

Los resultados de esta evaluación son presentados como absorbancia, siendo este parámetro indicativo de viabilidad celular, es decir, a mayor absorbancia mayor viabilidad. Los resultados indican que el recubrimiento en 2D para ambas fuentes celulares (células de pez cebra y línea celular de salmón) muestran resultados similares. Dado que el recubrimiento con laminina presenta una densidad celular menor (menor absorbancia) a los demás recubrimientos analizados, pero sin diferencias significativas respecto al control, alcanzando una absorbancia de 0.112 frente al control de 0,117 para las células de pez cebra, resultado similar para el caso de las CHSE-214 con una absorbancia de 0.121 respecto al control de 0.123. Esto difiere respecto a los resultados observados en literatura para los cuales laminina se espera mejore la adhesión respecto a un pocillo no recubierto, sin embargo, la fuente de origen de esta laminina es de ratón lo que podría ser la razón de este resultado al no ser de origen animal de pez.

Por otro lado, los mejores recubrimientos para aumentar la viabilidad celular y por ende la proliferación son las matrices de **Colágeno**, seguida de **Gelatina** de piel de cerdo que aporta con aminoácidos como glicina, prolina e hidroxiprolina (Hafidz et al., 2011) además de contar con propiedades gelificantes y la asociación de Colágeno con Laminina, esto para las dos fuentes celulares ya que la Laminina por sí sola no represento una mejora versus el control. Estos resultados se correlacionan con lo determinado por otros autores en los cuales para cultivo de músculo se propone el uso de gelatina (Alexander et al., 2011; Enrione et al., 2017).

De estos resultados se puede sugerir la selección de Gelatina o Colágeno para recubrir una estructura tridimensional como los andamios de *D. antarctica* de LUYEF (Objetivo específico n°3), donde se observó mayor densidad celular (absorbancia) y diferencia significativa respecto al control.

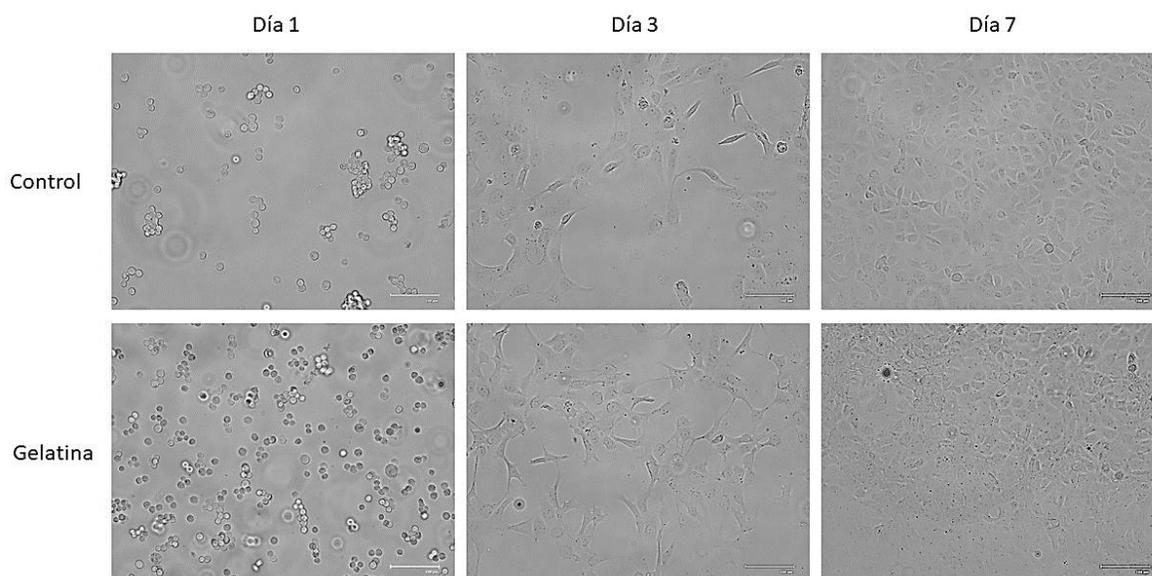


Figura 18: Microfotografía de adherencia de las CHSE-214 en placa, con un control utilizando solo medio y un recubrimiento de gelatina al 10% volumen del pocillo a través de 7 días. Barra de escala: 100µm.

4.2. Crecimiento de células en 2D.

En la figura 19, se observan los cultivos en placa durante 4 días (96 horas) de las tres fuentes celulares con las cuales se trabajó. 48 horas después de la siembra las células C2C12 llegan a una confluencia aproximada del 90% y a las 72 horas las células se encuentran en un 100% de confluencia. Por otra parte, la línea celular CHSE-214 alcanza la confluencia del 100% pasado las 96 horas. Para el caso de las MSCz cuya siembra se realizó desde un explante.

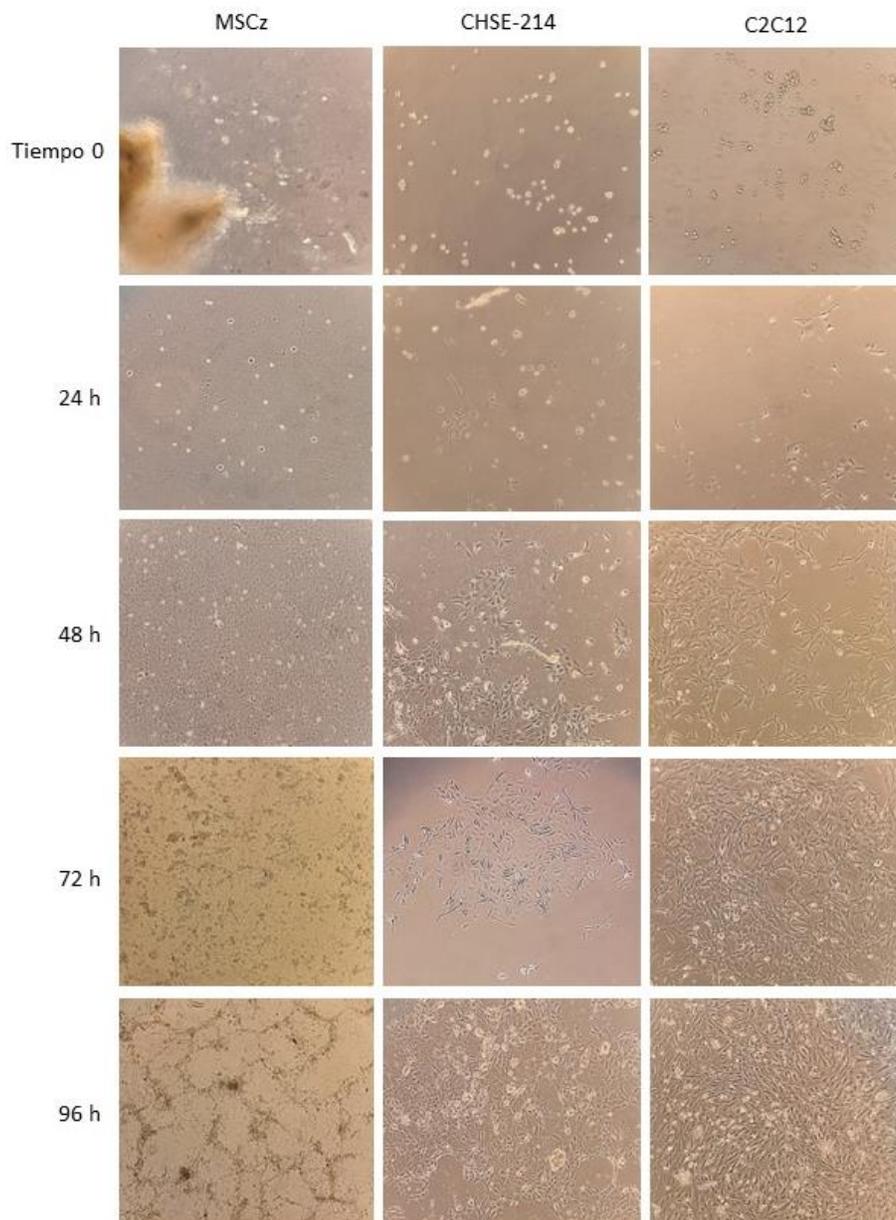


Figura 19: Crecimiento de las distintas fuentes celulares a través del tiempo. Observación bajo microscopía invertida.

4.2.1. Curva de Crecimiento en 2D.

A continuación, se procedió a evaluar el crecimiento celular de las 3 fuentes celulares utilizadas en placas, con el fin de determinar tanto la curva como los parámetros de crecimiento que se presentan en la Figura 20 y la Tabla III respectivamente.

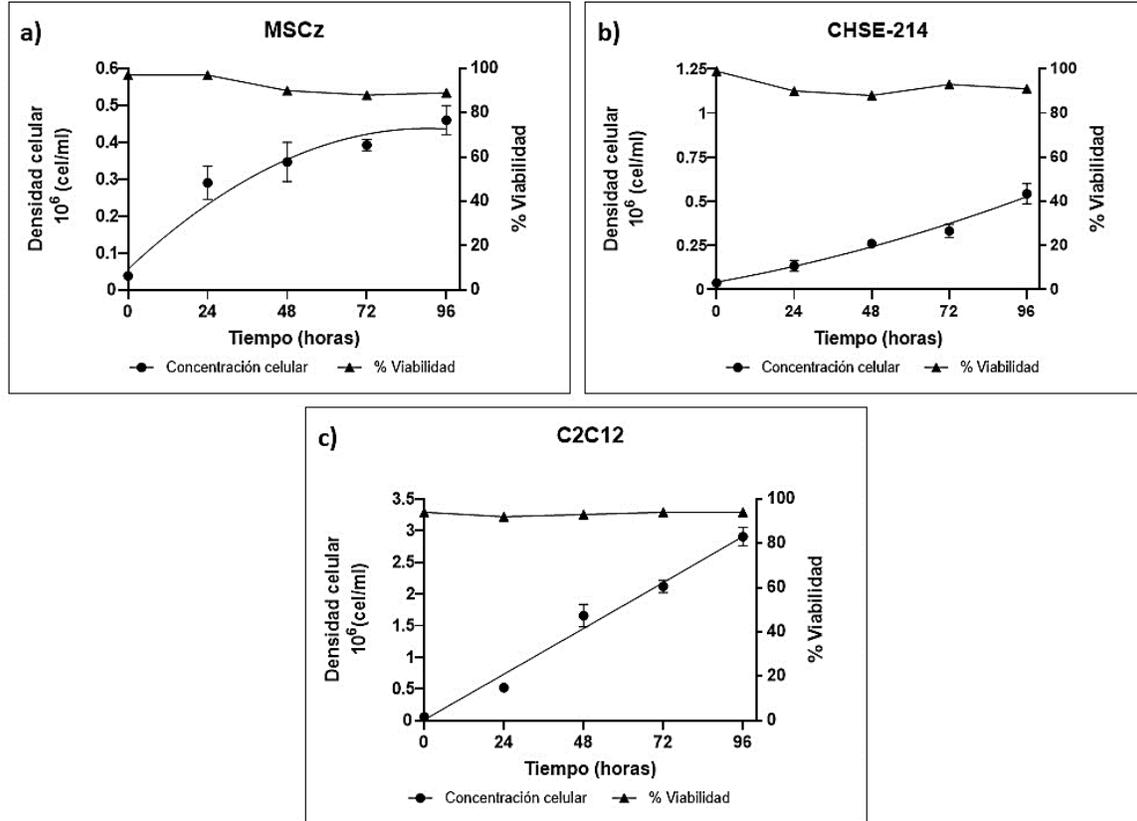


Figura 20: Curvas de Crecimiento de las distintas fuentes celulares; MSCz, CHSE-214 y C2C12. Donde el medio utilizado para las células MSCz y CHSE-214 es L-15 suplementado, mientras que para C2C12 el medio utilizado es DMEM-F12 suplementado. para a) y b) la densidad celular de inoculación fue de $0,038 \times 10^6$ (células/ml). c) la densidad celular de inoculación fue de $0,06 \times 10^6$ (células/ml).

Tabla IV: Parámetros de cultivo obtenidos para las distintas fuentes celulares.

Parámetros	MSCz	CHSE-214	C2C12
Condición de cultivo	L-15 suplementado	L-15 suplementado	DMEM-F12 suplementado
Temperatura	27°C	20°C	37°C
Densidad máxima alcanzada	$0,46 \times 10^6$ (células/ml)	$0,54 \times 10^6$ (células/ml)	$2,9 \times 10^6$ (células/ml)
Tiempo de duplicación	331,8 (h)	30,8 (h)	23,8 (h)
Velocidad específica	0,005(h ⁻¹)	0,023(h ⁻¹)	0,029(h ⁻¹)

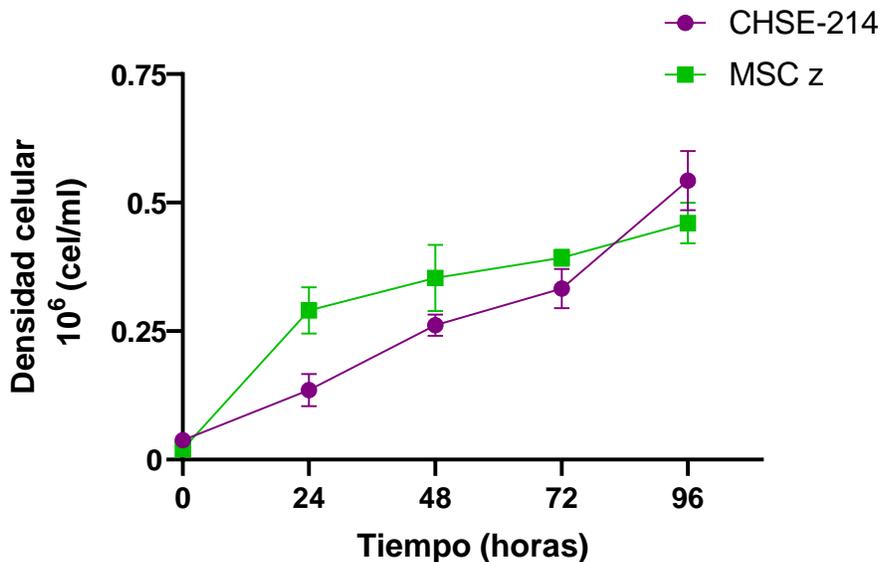


Figura 21: Comparación del crecimiento de las células de peces; MSCz y CHSE-214 a través del tiempo.

Al comparar las curvas de la figura 21, se observa que existe un comportamiento bastante significativo entre las distintas células, ya que la densidad celular alcanzada para ambas células fue cercana a $0,5 \times 10^6$ (células/ml), y es que para las MSCz al pertenecer a un cultivo primario, las células en vez de duplicarse como lo hace una línea celular, estas se mantienen en el tiempo debido a su tiempo de duplicación que es bastante más largo que el de los otros tipos celulares ($331,8 \text{ h} > 30,8 \text{ h} > 23,8 \text{ h}$). Desde ese punto, existe la detención del crecimiento del cultivo por la densidad celular alcanzada, sin embargo, para el caso de la figura 20c, en las C2C12 se distingue un aumento mantenido de la densidad celular como se espera por literatura. Al comparar las densidades máximas alcanzadas, se observa que las C2C12 son bastante rápidas en crecimiento a tal punto que en menos de un día (24 h) ya se encuentra el doble de las células sembradas. La viabilidad celular para las MSCz y CHSE-214 se mantiene por sobre el 80% mientras que la viabilidad celular de las C2C12 se mantiene siempre por sobre el 90% y se llevó a cabo el cultivo en un tiempo de 4 días (96 horas).

4.2.2. Porcentaje de Reducción de alamarBlue® en 2D.

alamarBlue® mide la proliferación celular con mayor precisión cuando las células están en fase de crecimiento exponencial (Al-Nasiry et al., 2007). A medida que las células que se analizan crecen, la actividad metabólica innata da como resultado una reducción química de alamarBlue por lo que el porcentaje de reducción irá en aumento a medida que se reduzca el compuesto, esto lo podemos observar en las gráficas de la figura 22, las cuales se quizá comprobar que los cultivos en placas pueden volver a medirse en una fecha posterior sin la necesidad de descartar el cultivo o eliminar las células de los pocillos.

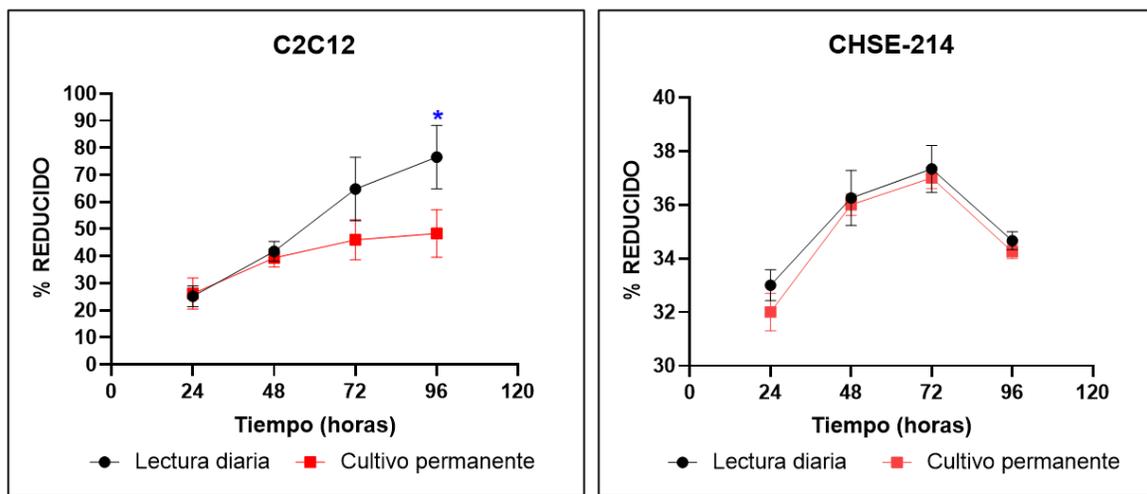


Figura 22: Comparación del porcentaje reducido de alamarBlue® mediante dos tipos de lecturas; lectura diaria y lectura/cultivo permanente a través del tiempo, para dos tipos de células C2C12 y CHSE-214. *Significativamente diferente. $p < 0.001$.

El porcentaje de reducción de alamarBlue en ambas líneas celulares obtuvieron una tendencia bastante similar para los dos tipos de lectura, es decir, para la lectura diaria descartable y la lectura permanente del pocillo (células que se mantienen en el pocillo para una próxima medición). Para el caso de las C2C12 de la figura 22 el porcentaje reducido de la lectura permanente arrojó valores de reducción más bajos a las 72 y 96 horas, esto puede deberse porque la densidad celular es demasiado alta, la proliferación celular disminuirá, dando menos reducción del alamarBlue de lo que se hubiera esperado. Y tiene sentido por el tiempo de duplicación rápido y confluencia alcanzada al tercer y cuarto día, donde los pocillos llegan a su máxima densidad de cultivo.

Para el caso de porcentaje reducido de CHSE-214 esta línea celular crece más lentamente respecto a las C2C12 por ende el poder reductor de las células frente al reactivo es menor y no crecen como lo hacen las C2C12 teniendo una densidad celular baja, con una tasa de crecimiento **más lenta** podría resultar una reducción insignificante de alamarBlue, considerando que su porcentaje de reducción se encuentra en el rango de 32 y 34,7%, no así el rango de C2C12 que va entre 25,2 y 76,5% debido a su rápido crecimiento celular. Suponiendo que el agente de alamarBlue no es tóxico debido a su estabilidad con las células (Ahmed et al., 1994) se evidencia una baja a las 96 horas como si indicará que a ese tiempo para estas células induzcan muerte celular.

Teniendo como resultado esperado;

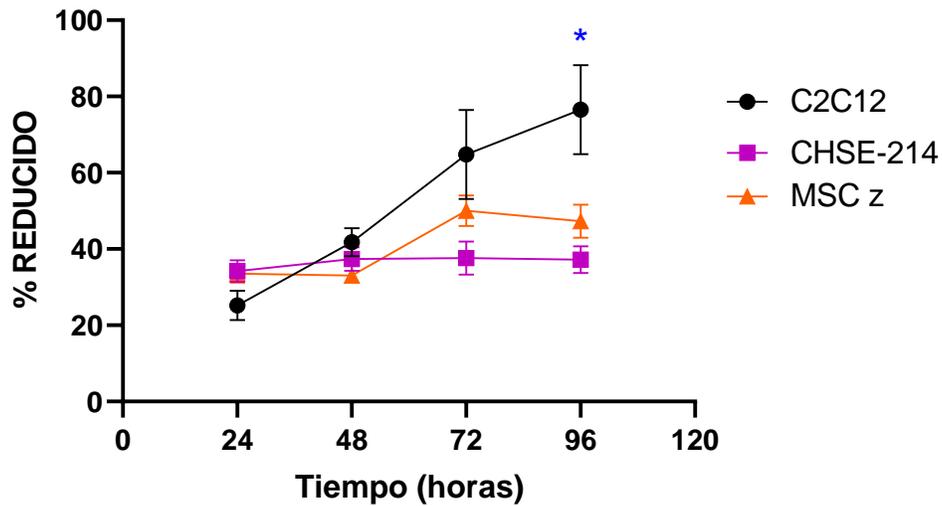


Figura 23: Comparación del porcentaje reducido de alamarBlue® en las distintas fuentes celulares a través del tiempo. *Significativamente distinto entre las fuentes celulares. $P < 0.001$.

La tasa de crecimiento menor de las CHSE-214 respecto a las otras fuentes celulares podría resultar en una reducción de alamarBlue relativamente baja o constante, y es lo que explica el porcentaje reducido en las células CHSE-214 ya que, el porcentaje reducido alcanzado a las 96h fue de 37.2 %, teniendo en consideración que se inocularon las placas con una densidad de siembra inicial de 10.000 células por pocillo, los datos están dentro del rango (alamarBlue® U.S. Patent No. 5,501,959). Al comparar el porcentaje de reducción de las células de peces estas muestras diferencias significativas al tercer día de medición alamarBlue®, ya que CHSE-214 solo se ha reducido 37,6% mientras que MSCz se redujo en un 50% pero este último disminuye a las 96 horas a un 47,3%. Luego del cuarto día todas las fuentes celulares tienen diferencias significativas y es que CHSE-214 mantiene sus valores por debajo de las otras células mientras que el crecimiento elevado de C2C12 al cuarto día entrega un porcentaje reducido de alamarBlue de 76,5% indicando que la cantidad de células en placa es mucho mayor que el resto.

Medir viabilidad celular con alamarBlue en vez del uso de MTT tiene sus razones y es que el ensayo se basa en que las células viables reducen el compuesto de bromuro (MTT) por la enzima mitocondrial que es succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado que es insoluble en medios de cultivo, formando cristales en las células (sales de formazan) (Mosmann, 1983), por lo que tiene que ser removido con DMSO antes de la medición de absorbancia. Esto puede generar un aumento en la desviación estándar. Otra razón es que MTT mide principalmente Deshidrogenasa (DH) mitocondrial, mientras que el ensayo con resazurina involucra más enzimas mitocondriales, volviéndolo una técnica mucho más sensible que el MTT (Xu et al., 2015).

4.3. Crecimiento en Adherencia en Andamios de *D. antarctica*

Como las células animales crecen adheridas, requieren de una superficie para poder adherirse, proliferar y diferenciarse, por lo que la estructura del andamio le permite anclarse a la matriz extracelular (ECM) con propiedades de elasticidad, porosidad y viscosa como lo es el andamio de *Durvillaea antarctica*.

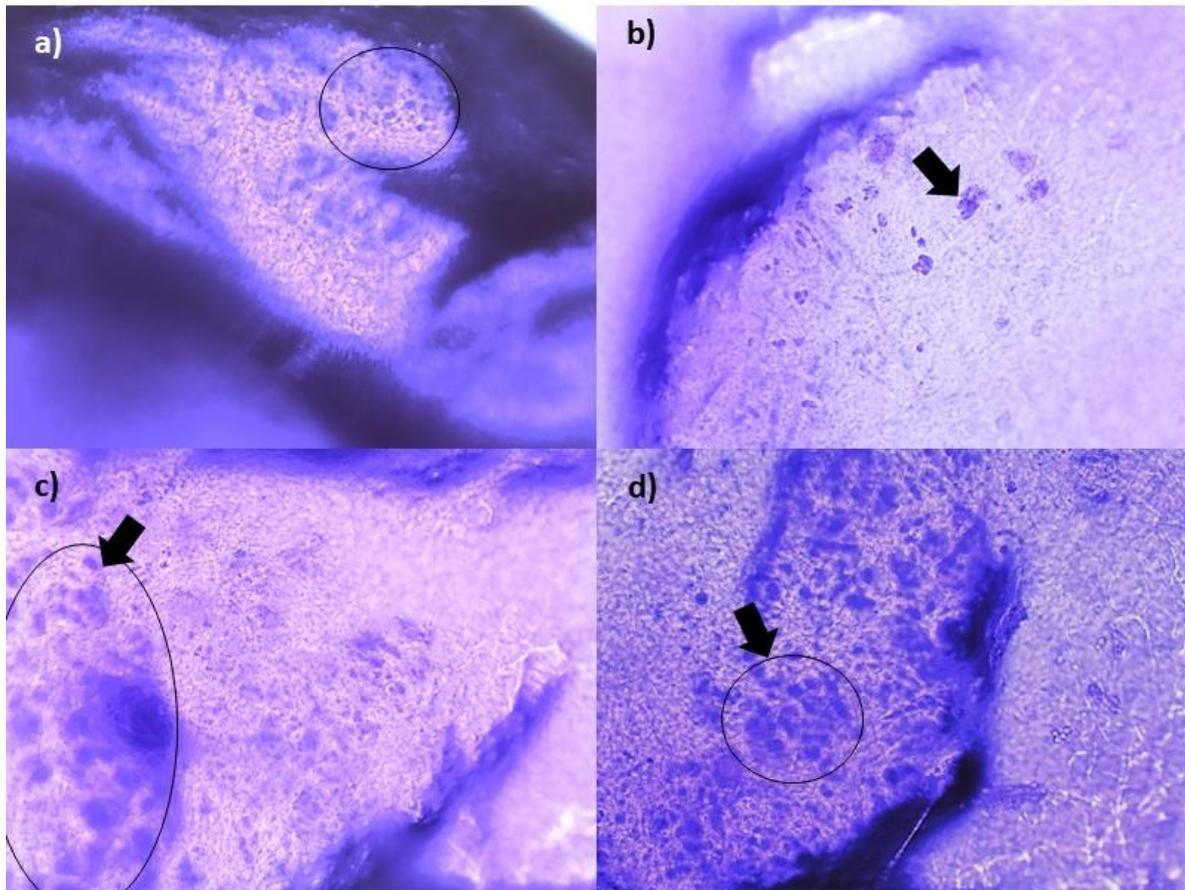


Figura 24: Cultivo de C2C12 en andamios de *Durvillaea antarctica* en spinners. **a)** 24 horas de cultivo x10. **b)** 48 horas de cultivo x10. **c)** 72 horas de cultivo x10. **d)** 96 horas de cultivo x10.

En la Figura 24, se observa el cultivo de C2C12 en andamios de *D. antarctica*, durante 4 días. En las primeras 24 horas de cultivo, se puede notar que ya hay presencia de células en los andamios de alga, debido a su estructura porosa e irregular. Transcurridas 48 horas desde la inoculación, se observa que hay agrupaciones de células en los andamios, esto se puede deber a la agitación constante dentro del spinner, que permite a las células profundir hacia el centro del andamio.

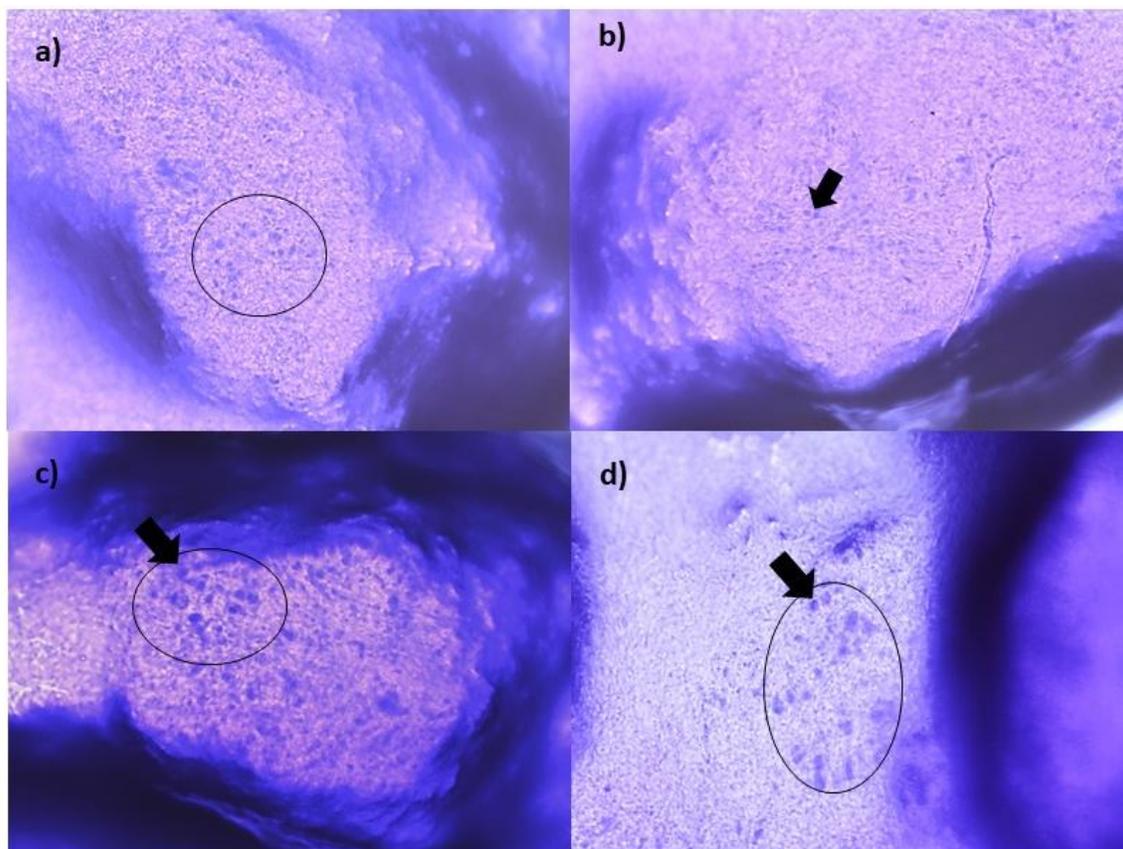


Figura 25: Cultivo de CHSE-214 en andamios de *Durvillaea antarctica* en spinners. **a)** 24 horas de cultivo x10. **b)** 48 horas de cultivo x10. **c)** 72 horas de cultivo x10. **d)** 96 horas de cultivo x10.

En la Figura 25, se observa el cultivo de CHSE-214 en andamios de *D. antarctica* durante 4 días. En las primeras 24 horas de cultivo, se puede presenciar la disponibilidad de células en el andamio, aunque en menor cantidad que las células C2C12 debido a su tasa de crecimiento celular y tiempo de duplicación menor que C2C12. Entre las 72 a 96 horas después de la siembra, se observan agrupaciones celulares, denotado por la concentración celular en sectores específicos del andamio de *D. antarctica*, lo que sugiere diferenciación por contacto. Estos resultados concuerdan con lo que indica (Zeltinger et al., 2001) de que un andamio debe generar estabilidad mecánica para generar tejidos y de permitir la unión y apoyar la proliferación celular (Enrione et al., 2017).

El recubrimiento utilizado si bien fue la Gelatina Tipo A (Sigma-Aldrich G1890), también se pudo haber ocupado Colágeno I o la asociación de Colágeno + Laminina, pero estos últimos dos no se llevaron a cabo debido a la hora de abaratar costos, ya que si se busca una eficiencia este debe tener menos costos posibles y es que el precio de la Gelatina piel de cerdo se encuentra a 42.600 CLP* los 100g, en cambio el Colágeno I de Gibco™ se encuentra en un valor aproximado de 251.528 CLP* los 20mL.

Sabiendo que el formato de la gelatina es en polvo este se puede diluir obteniendo más de 20mL en menor precio.

*precios actualizados desde página web www.sigmaaldrich.com y www.termofisher.com

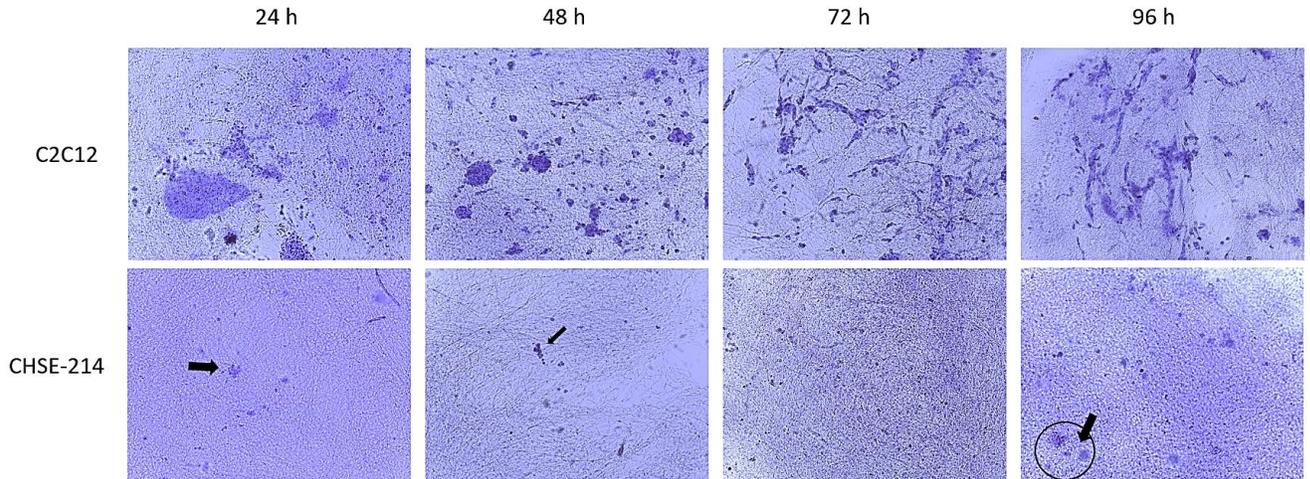


Figura 26: Microfotografía de los andamios de *D. antarctica* vistos mediante tinción con cristal violeta a través del tiempo en aumento 40X. Imágenes procedentes del programa LAS EZ. Flechas indican las células CHSE-214 y sus agrupaciones.

4.3.1. Porcentaje de reducción de alamarBlue® en 3D.

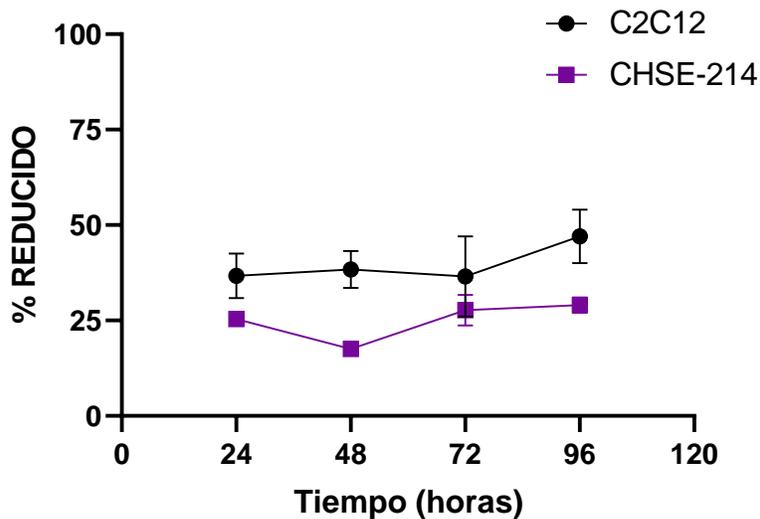


Figura 27: Comparación del porcentaje reducido de alamarBlue® de las dos líneas celulares (C2C12 y CHSE-214), creciendo en los andamios de cochayuyo. Sin diferencias significativas entre ambas curvas (S/N).

Pesé a que se inocularon $8,88 \times 10^6$ (células/mL) para el caso de las CHSE-214 y $15,68 \times 10^6$ (células/mL) para las C2C12 en los spinners, el porcentaje de reducción de alamarBlue de los andamios son más bajos que los cultivos en 2D, ya que, si comparamos los valores de la gráfica de la figura 28 con la de la figura 27 exceptuando las MSCz, el porcentaje de reducción alcanzado a las 96 horas es de 76,5% en 2D mientras que en el 3D es de 47% para las C2C12. Mientras el mismo

caso para las CHSE-214 con un porcentaje de reducción de alamarBlue de 37,2% a las 96 horas en cultivo 2D supera el porcentaje en cultivo 3D con un valor de 29%.

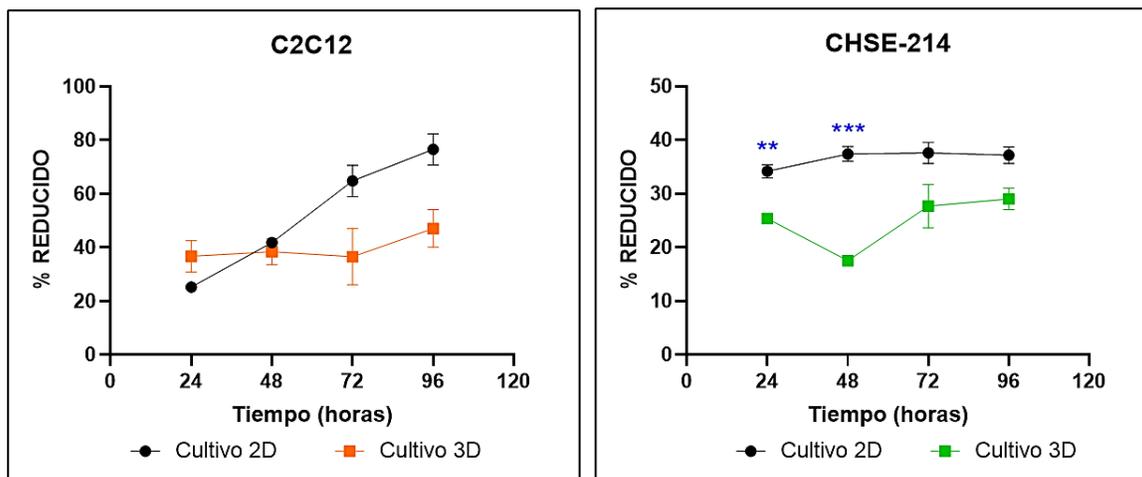


Figura 28: Comparación del porcentaje reducido de alamarBlue® en 2D y en cultivos 3D de las dos líneas celulares (C2C12 y CHSE-214). C2C12 (S/N). CHSE-214 ***Significativamente diferente. $p < 0,0001$.

4.4. Proyecciones futuras

Pese a que no se logró llevar a cabo el cultivo de células asociadas al músculo esquelético de *Danio rerio* en los andamios de *D. antarctica*, se logró mejorar la técnica de aislamiento del cultivo primario y por ende se puede replicar dicho procedimiento en otras especies de interés comercial como lo son aquellas que se encuentren en un estado sobreexplotado por la pesca por captura o que tengan restricciones como la veda, siendo uno de los candidatos la merluza (común, austal y/o de tres aletas) o salmónidos para el caso de la acuicultura. Tomando en consideración que obtener un cultivo celular estable que permita convertirse en una línea celular para su aplicación en carne *in vitro*, requerirá evaluar las condiciones nutricionales para las células, ya sea concentraciones de suero, temperatura, consumo de glucosa, entre otros.

Para considerar un cultivo de células específicamente asociadas al músculo esquelético estas deberían pasar por un ensayo de inmunoetiquetado, dado que la tinción con anticuerpos entrega resultados de marcaje de las células objetivo, para este caso la α -actinina que corresponde a una proteína de unión a actina especialmente abundante en los sarcómeros del músculos esquelético (Gasolina & Randazzo, 2022), en cambio, los fibroblastos se identifican molecularmente mediante marcadores inmunohistoquímicos como vimentina (Nakayama et al., 2022), por lo que realizar estos análisis de inmunoetiquetado es fundamental para establecer un cultivo celular de células musculares.

Además, compartir la idea de la empresa LUYEF con respecto a utilizar tecnologías libres de animales, como lo son los requerimientos para la mantención de células, es decir, la sustitución de suero bovino fetal proveniente de un origen animal a extractos vegetales como algas u hongos. Inclusive poder utilizar recubrimientos de matrices a partir de la extracción de un colágeno marino mediante los desechos como escamas, esqueletos que presentan las pesquerías o derechamente

utilizar reactivos provenientes de los mismos orígenes animales como una gelatina de pescado, en vez de cerdo para las células de peces.

Conclusión

Con esta investigación se ha logrado desarrollar un protocolo más robusto para la obtención de células musculares de ejemplares de pez cebra, ya sea viendo los tiempos de disgregación enzimática obteniendo un tiempo de 45 minutos de incubación, mejor enzima a utilizar siendo la combinación de colagenasa I con Dispasa II, mitigando posibles contaminantes en los cultivos, entre otros.

Como el cultivo de células de pez cebra se mantenían en el tiempo en vez de duplicarse debido a un tiempo de duplicación de 331,6 horas, esto imposibilitó la oportunidad de probar estas células en los andamiajes, pero el reemplazo por las C2C12 hizo que se obtuvieran resultados bastante prometedores sobre todo para el cultivo en los biorreactores, ya que si bien el tiempo medido fue de cuatro días (96 horas), se pudo seguir manteniendo el cultivo y quizás ver tendencia a la diferenciación con el pasar de los días, incluso el crecimiento de las CHSE-214 hubiera aumentado con un monitero de más días, ya que a diferencia de las C2C12 éstas crecen más lento en el tiempo.

Con el fin de evaluar el crecimiento celular en 2D vs el crecimiento celular en 3D se puede concluir que el crecimiento en los andamios recubiertos con proteína adhesión mostraron una tendencia similar de crecimiento que en placa y algo muy importante es que la utilización de andamios de *Durvillaea antarctica* de LUYEF como parte de un cultivo en adherencia tridimensional por la empresa mostraron “multiespecificidad”, al poder cultivar dos tipos celulares de distintas especies en este caso de ratón y salmón; C2C12 y CHSE-214 respectivamente.

De esta manera, también se indica que es factible crecer células en andamios recubiertos con gelatina o incluso con colágeno, dado que fueron el tipo de matrices que mostró un incremento de viabilidad en 2D y posteriormente poder diferenciarlos con cambios de medio suplementándolos con suero adulto en vez de bovino fetal.

En cuanto a las gráficas de los resultados por parte de las distintas mediciones con alamarBlue, se pueden mejorar las distribuciones replicando los experimentos al menos 3 veces y aumentando el número de muestras (n) de 5 a 8, esto para mejorar la media y desviación estándar en la distribución de los datos y por último no es posible rechazar o afirmar la hipótesis presentada dada las diferencias en cuanto a condiciones de cultivo en 2D vs 3D, ya que la siembra en placa es distinta a la inoculación de los spinners. pero si bien se logró evidenciar la adherencia de ambas líneas celulares en los andamios.

Bibliografía

Acevedo, C.A.; Díaz-Calderón, P.; Enrione, J.; Caneo, M.J.; Palacios, C.F.; Weinstein-Oppenheimer, C.; Brown, D.I. Improvement of biomaterials used in tissue engineering by an ageing treatment. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2015, 38, 777–785.

Alexander, P., Brown, C., Arneth, A., Dias, C., Finnigan, J., Moran, D., & Rounsevell, M.D.A. (2017). ¿Podría el consumo de insectos, carne cultivada o carne de imitación reducir el uso mundial de la tierra agrícola? *Seguridad alimentaria mundial*, 15, 22 - 32. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.04.001>

Alexander, M. S., Kawahara, G., Kho, A. T., Howell, M. H., Pusack, T. J., Myers, J. A., Montanaro, F., Zon, L. I., Guyon, J. R. y Kunkel, L.M. (2011). [Aislamiento y análisis del transcriptoma de células adultas de pez cebra enriquecidas para progenitores del músculo esquelético](#). *Nervio muscular* 43(5): 741-750.

Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod.* 2007 May;22(5):1304-9. doi: 10.1093/humrep/dem011. Epub 2007 Feb 16. PMID: 17307808.

Asakura, A., Komaki, M. & Rudnicki, M. A. (2001). Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*, 68(4-5), pp.245-253. doi: 10.1046/j.1432-0436.2001-680412.x.

Arora, M. (2013). Cell culture media: a review. *Mater Methods* 3:24. doi: 10.13070/mm.en.3.175

Baust JM (2007) Propiedades de las células y tejidos que influyen en el resultado de la preservación: bases moleculares de la muerte celular inducida por preservación. En: Baust JM (ed) Baust JG. CRC Press, Avances en biopreservación, pp 63-87

Baust, J.M., Buehring, G.C., Campbell, L. *et al.* Mejores prácticas en cultivo celular: una visión general. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 53, 669–672 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>

Benjaminson M. A., Gilchrist J.A. & Lorenz M. (2002). IN VITRO EDIBLE MUSCLE PROTEIN PRODUCTION SYSTEM (MPPS): STAGE 1, FISH. *Acta Astronautica* Vol. 51, No. 12, pp. 879–889, 2002

Bhat, Z. F. and Bhat, H. (2011b). Tissue engineered meat - future meat. *J. Stored Prod. Postharvest Res.* 2(1):1–10.

Bhat ZF, Kumar S, Bhat HF. In vitro meat: A future animal-free harvest. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017 Mar 4;57(4):782-789. doi: 10.1080/10408398.2014.924899. PMID: 25942290.

Bomkamp, C.; Skaalure, S.C.; Fernando, G.F.; Ben-Arye, T.; Swartz, E.W.; Specht, E.A. Scaffolding Biomaterials for 3D Cultivated Meat: Prospects and Challenges. *Adv. Sci.* 2021, 9, 2102908.

Cartín-Rojas & Ortiz P. (2018). 'Ventajas y desventajas del cultivo de carne *in vitro*: perspectivas desde la seguridad alimentaria'. *Revista de Medicina Veterinaria.* (36), pp. 135-144. Doi: 10.19052/mv.5179.

Chang KH, Liao HT, Chen JP. Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: in vitro and in vivo studies. *Acta Biomater.* 2013 Nov;9(11):9012-26. doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.046. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23851171.

Coppola D, Lauritano C, Esposito FP, Riccio G, Rizzo C, de Pascale D: Fish waste: from problem to valuable resource. *Mar Drugs* 2021, 19:116

Croisier, F. and Jérôme, C. (2013) Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *European Polymer Journal*, 49, 780-792. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>

Datar I. & Betti M. (2010). Posibilidades para un sistema de producción de carne *in vitro*. *Ciencia innovadora de los alimentos y tecnologías emergentes* 11, 13-22.

Davis AK, Garner JP, Chu DK, Felt SA. Propofol Immersion As a Euthanasia Method for Adult Zebrafish (*Danio Rerio*). *Comp Med.* 2022 Jun 1;72(3):204-209. doi: 10.30802/AALAS-CM-22-000050. Epub 2022 Jun 14. PMID: 35701076; PMCID: PMC9334005.

Diogo GS, Marques CF, Sotelo CG, Perez-Martin RI, Pirraco RP, Reis RL, Silva TH: Cell-laden biomimetically mineralized shark-skin-collagen-based 3D printed hydrogels for the engineering of hard tissues. *ACS Biomater Sci Eng* 2020, 6:3664-3672

Dobre, O., Oliva, M. A. G., Ciccone, G., Trujillo, S., Rodrigo-Navarro, A., Venters, D. C., Llopis-Hernandez, V., Vassalli, M., Gonzalez-Garcia, C., Dalby, M. J., Salmeron-Sanchez, M., A. Hydrogel Platform that Incorporates Laminin Isoforms for Efficient Presentation of Growth Factors – Neural Growth and Osteogenesis. *Adv. Funct. Mater.* 2021, 31, 2010225. <https://doi.org/10.1002/adfm.202010225>

Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials.* 2003 Nov;24(24):4337-51. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00340-5. PMID: 12922147.

Duran B. (2019). Cultura celular de mioblastos de peixes como um modelo para entender a regulação do desenvolvimento e crescimento muscular. Tese – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu 2019.

Durbeej M. (2010). Laminins. *Tejido celular Res* 2010; 339:259-68; PMID:19693542; <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-009-0838-2>

Edelman P.D., McFarland D.C., Mironov V.A., Matheny J.G. Commentary: In vitro-cultured meat production. *Tissue Eng.* 2005 May-Jun;11(5-6):659-62. doi: 10.1089/ten.2005.11.659. PMID: 15998207.

Enrione, J.; Blaker, J.J.; Brown, D.I.; Weinstein-Oppenheimer, C.R.; Pepczynska, M.; Olguín, Y.; Sánchez, E.; Acevedo, C.A. Edible Scaffolds Based on Non-Mammalian Biopolymers for Myoblast Growth. *Materials* 2017, *10*, 1404. <https://doi.org/10.3390/ma10121404>

FAO. (2020). Food and Agriculture Organization. The state of world fisheries and aquaculture. Sustainability in action. Rome: FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229e>

Feng XL, Zhang XF, Li SQ, Zheng YQ, Shi XN, Li F, Guo SB, Yang JM: Preparation of aminated fish scale collagen and oxidized sodium alginate hybrid hydrogel for enhanced fullthickness wound healing. *Int J Biol Macromol* 2020, *164*:626- 637.

Freshney, R. I. (2010). Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. 732p, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Ganassi, M., Zammit, P. S. y Hughes, S.M. (2021). Aislamiento de miofibras y cultivo de células madre musculares de peces cebra adultos. *Bioprotocol* 11(17): e4149. DOI: [10.21769/BioProtoc.4149](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4149).

Gasilina, A. and Randazzo, P. A. (2022). *In vitro* Fluorescence Imaging–based Actin Bundling Assay. *Bio-protocol* 12(18): e4518. DOI: [10.21769/BioProtoc.4518](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4518).

Gaydhane M. K., Mahanta U., Sharma C. S., Khandelwal M. & Ramakrishna S. (2018). Cultured meat: state of the art and future. *Biofabrication Reviews*, *3*(1), p.1. doi: 10.1007/s40898-018-0005-1.

Hafidz, R.M.R.N.; Yaakob, C.M.; Amin, I.; Noorfaizan, A. Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *Int. Food Res. J.* 2011, *18*, 787–791.

John L Fryer y CN Lannan. “Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes”. En: *Journal of Tissue Culture Methods* 16.2 (1994), págs. 87-94.

Johnston, I. A., Bower, N. I. and Macqueen, D. J. (2011). Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J. Exp. Biol.* *214*, 1617–28.

Kerschbaum HH, Tasa BA, Schürz M, Oberascher K, Bresgen N. Trypan Blue - Adapting a Dye Used for Labelling Dead Cells to Visualize Pinocytosis in Viable Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2021 Jun 23;55(S1):171-184. doi: 10.33594/000000380. PMID: 34156175.

Kinth, P., Mahesh, G., and Panwar, Y. (2013). Mapping of zebrafish research: a global outlook. *Zebrafish* *10*, 510–517.

Kokabu S, Nakatomi C, Matsubara T, Ono Y, Addison WN, Lowery JW, Urata M, Hudnall AM, Hitomi S, Nakatomi M, Sato T, Osawa K, Yoda T, Rosen V, and Jimi E: The transcriptional co-repressor TLE3

regulates myogenic differentiation by repressing the activity of the MyoD transcription factor. *J Biol Chem* 292: 12885-12894, 2017

Kortesmaa J., Yurchenco P., Tryggvason K. (2000). Recombinant laminin-8 (alpha (4), beta1) gamma (1)). Production, purification, and interactions with integrins. *J Biol Chem.* 19;275(20):14853-9. doi: 10.1074/jbc.275.20.14853. PMID: 10809728.

Levicán, J., Miranda-Cárdenas, C., Soto-Rifo, R. *et al.* Infectious pancreatic necrosis virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis. *Sci Rep* 7, 3068 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03036-w>

Li SH, Liao X, Zhou TE, Xiao LL, Chen YW, Wu F, Wang JR, Cheng B, Song JX, Liu HW. Evaluation of 2 Purification Methods for Isolation of Human Adipose-Derived Stem Cells Based on Red Blood Cell Lysis With Ammonium Chloride and Hypotonic Sodium Chloride Solution. *Ann Plast Surg.* 2017 Jan;78(1):83-90. doi: 10.1097/SAP.0000000000000953. PMID: 27941495.

Listrat A., Lebret B., Louveau I., Astruc T., Bonnet M., Lefauceur L., Picard B., Bugeon J. (2016). "How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality". *The Scientific World Journal.* Article ID 3182746, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2016/3182746>

Liu S., Lau C.S., Liang K., Wen F., Teoh S.H. Marine collagen scaffolds in tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 74, 2022, Pages 92-103, ISSN 0958-1669, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.10.011>.

Lund DK, Cornelison DD. Enter the matrix: shape, signal and superhighway. *FEBS J.* 2013 Sep;280(17):4089-99. doi: 10.1111/febs.12171. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23374506; PMCID: PMC3659178.

LUYEF. 2023. Welcome. [en línea] [Luyef – Cultivating The Future](#) [consulta: 21 de Abril de 2023].

MacQueen, L.A., Alver, C.G., Chantre, C.O. *et al.* Muscle tissue engineering in fibrous gelatin: implications for meat analogs. *npj Sci Food* 3, 20 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41538-019-0054-8>

MATELUNA, C., FIGUEROA, V., ORTIZ, J. y AGUILERA, J.M., 2020. Effect of processing on texture and microstructure of the seaweed *Durvillaea antarctica*. *Journal of Applied Phycology*, vol. 32, no. 6, pp. 4211–4219. ISSN 15735176. DOI 10.1007/s10811-020-02259-1.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.

Muzzarelli, R. A. A. (2012). Nanochitins and nanochitosans, paving the way to eco-friendly and energy-saving exploitation of marine resources. In K. Matyjaszewski, & M. Möller (Eds.), *Polymer science: A comprehensive reference (Vol.10)* (pp. 153–164). Amsterdam: Elsevier B.V.

Nakayama, J., Makinoshima, H. and Gong, Z. (2022). Gastrulation Screening to Identify Anti-metastasis Drugs in Zebrafish Embryos. *Bio-protocol* 12(19): e4525. DOI: [10.21769/BioProtoc.4525](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4525).

Oestbye, T. K., and Ytteborg, E. (2018). Preparation and culturing of atlantic salmon muscle cells for *in vitro* studies. *Myogenesis* 1889, 319–330. doi: 10.1007/978-1-4939-8897-6_19

Orzechowski A. (2015). ¿Carne artificial? Enfoque factible basado en la experiencia de estudios de cultivo celular. *Revista de Agricultura Integrativa* 14, 217–22.

Oyarzún Ebensperger, Enrique. (2005). Células Madre: Nuevas Fronteras para la Medicina. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 70(4), 211-212. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262005000400001>

Post M. J. (2012). 'Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects'. *Meat Science*, 92(3), pp. 227-301. Doi: 10.1016/j.meatsci.2012.04.008.

Potter G., Smith A., Nguyen T.K. Vo, Muster J., Weston W., Bertero A., Maves L., Mack D., Rostain A. (2020). A More Open Approach Is Needed to Develop Cell-Based Fish Technology: It Starts with Zebrafish. *One Earth*, 3, Issue 1, pp 54-64. ISSN 2590-3322, <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.06.005>.

Ramshaw JA, Werkmeister JA, Glattauer V. (1996). Collagen-based biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 13:335-82. doi: 10.1080/02648725.1996.10647934. PMID: 8948117.

R.D. MacDonald, J.C. Kennedy, Infectious pancreatic necrosis virus persistently infects chinook salmon embryo cells independent of interferon, *Virology* 95 (1) (1979 May 1) 260e264.

Riederer I, Bonomo AC, Mouly V, Savino W. Laminin therapy for the promotion of muscle regeneration. *FEBS Lett.* 2015 Nov 14;589(22):3449-53. doi: 10.1016/j.febslet.2015.10.004. Epub 2015 Oct 10. PMID: 26459029.

Rubio N., Datar I., Stachura D., Kaplan D. and Krueger K. (2019) Cell-Based Fish: A Novel Approach to Seafood Production and an Opportunity for Cellular Agriculture. *Front. Sustain. Food Syst.* 3:43. doi: 10.3389/fsufs.2019.00043

Sánchez Felipe. Estudio de Andamiajes y Análisis de Escalamiento del Cultivo de Células Satélites para la Producción de Carne Cultivada. Memoria para optar al Título de Ingeniero Civil en Biotecnología e Ingeniero Civil Químico. Universidad de Chile. 2022

Smith, J.M.B.; Bayliss-Smith, T.P. Kelp-plucking: Coastal erosion facilitated by bull-kelp *Durvillaea antarctica* at subantarctic Macquarie Island. *Antarct. Sci.* **1998**, *10*, 431–438.

Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M. and De Haan, C. (2006). *Livestock's long shadow: Environmental issues and options* (Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. xxi). Available at: www.virtualcentre.org/en/library/key/pub/longshad/A0701E00.pdf.

Varela-Ortega C, Blanco-Gutiérrez I, Manners R, Detzel A. Life cycle assessment of animal-based foods and plant-based protein-rich alternatives: a socio-economic perspective. *J Sci Food Agric.* 2022

Sep;102(12):5111-5120. doi: 10.1002/jsfa.11655. Epub 2021 Dec 3. PMID: 34791663; PMCID: PMC9546073.

Vargas-Vargas, Rafael Antonio. (2017). Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia en México*, 29(Supl. 1), 86-96.

Welin, S. (2013). Introducing the new meat. Problems and prospects. *Nordic J. Appl. Ethics* 7:24–37

Xu M, McCanna DJ, Sivak JG. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2015 Jan-Feb;71:1-7. doi: 10.1016/j.vascn.2014.11.003. Epub 2014 Nov 15. PMID: 25464019.

Yaffe D and Saxel O: Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725-727, 1977

YourGenome (2014). Why use the zebrafish in research?. <https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-zebrafish-in-research>.

Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Müller R, Griffith LG. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng*. 2001 Oct;7(5):557-72. doi: 10.1089/107632701753213183. PMID: 11694190.

Zhang G, Zhao X, Li X, Sun X, Zhou J, Du G, Chen J. [Application of cell culture techniques in cultured meat-a review]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2019 Aug 25;35(8):1374-1381. Chinese. doi: 10.13345/j.cjb.190138. PMID: 31441608.

Anexo

Con el fin de hacer que la ciencia sea replicable y colaborativa, el traspaso de información como protocolos debe seguirse de manera correcta y prudente cuando hay acuerdos de confidencialidad. Pero si tengo la oportunidad de compartir mis conocimientos y lo aprendido esta es la instancia.

Recetas

1. Etanol al 70%

A partir de alcohol etílico al 96% se prepara una solución del 70% de alcohol y 30% de H₂O destilada.

2. PBS con/sin Ca²⁺ y Mg²⁺

Phosphate Buffered Saline o Tampón fosfato salino se emplea como vehículo neutro para las células, ya que no modifica el perfil y funcionamiento celular. Es muy común para lavar células.

a. Disolver en 800mL de H₂O destilada.

- 8.0 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 1.44 g Na₂HPO₄
- 0.24 g KH₂PO₄

Para PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺, complementar con:

- 0.133 g CaCl₂ x 2H₂O
- 0.10 g MgCl₂ x 6H₂O

b. Ajustar el pH a 7.4 con HCl.

c. Ajustar el volumen a 1L con H₂O destilada.

d. Esterilizar en autoclave.

3. PBS – P/E

Preparar una solución de limpieza para tejidos de penicilina/estreptomicina al 10% vol/vol en PBS.

4. Medio L-15

El medio Leibowitz's (L-15) permite el crecimiento de células y explantes primarios de tejidos embrionarios y adultos.

a. Añadir en 1 litro de medio L-15.

- SBF 10%
- 2mM Glutamina
- 0.8mM CaCl₂
- 100µg/ml P/E (antibiótico)

b. Esterilizar mediante filtración con una unidad de baja unión a proteínas.

5. DMEM

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) se utiliza ampliamente como un medio basal para fomentar el crecimiento de diferentes células.

- a. Añadir en un litro de DMEM
 - SBF 20%
 - 1% P/E
 - 10µg/ml Gentamicina
- b. Esterilizar mediante filtración con una unidad de baja unión a proteínas.

6. Colagenasa Tipo I

Obtenida de la bacteria *Clostridium histolyticum* es única entre las proteasas por su capacidad de degradar las fibrillas de colágeno de triple hélice que se encuentran en los tejidos conectivos.

¿Cómo preparo la solución madre a partir de colagenasa en polvo?

- a. Agregar 1ml de HBSS (con calcio y magnesio) directamente a un vial de 1g de colagenasa.
 - Utilizando suavemente vortex para asegurar la disolución completa.
 - Transferir a un tubo limpio.
- b. Determinar el volumen de HBSS necesario para llevar la solución a 100 U/µL (1000X solución madre)
 - Suponiendo que el lote tiene una actividad específica de 215 U/mg, este lote tendrá 215.000 U/ml cuando se reconstituya la colagenasa en HBSS a 1g/ml.
 - Para diluir 215.000 U/ml a 100.000 U/ml, se debe **diluir 2,15 veces** la solución enzimática de 1g/ml.
 - Enjuagar el vial con ese volumen (1,15ml) de HBSS y combinar.
- c. Esterilizar por filtración la solución madre con una unidad de filtración de baja unión a proteínas (0,22µm).
- d. Dispensar en alícuotas y almacenar a -20°C protegido de la luz.
- e. Descongele en hielo antes de usar. Evitando múltiples ciclos de congelación y descongelación.



7. RBC lysis buffer

El Red Blood Cell Lysis Buffer o Tampón de lisis de glóbulos rojos es recomendable para minimizar la presencia de eritrocitos en el cultivo primario de células musculares.

- a. Disolver en 800mL de H₂O destilada.
 - 0.15 M NH₄Cl
 - 1mM NaHCO₃
 - 0.1mM EDTA
- b. Ajustar a pH 7.2 – 7.4 con 1M HCl
- c. Esterilizar por filtración con una unidad de baja unión a proteínas.
- d. Almacenar a una temperatura entre 2 a 8°C.

8. Colágeno I

El colágeno es la principal proteína estructural en la matriz extracelular muscular. Siendo el colágeno tipo I y V los principales tipos en el músculo de pescado.

- Colocar el colágeno I, con PBS 10X, agua destilada y NaOH 1N estéril en hielo.
- Para determinar la concentración y el volumen final de colágeno necesario para la experimentación se requiere el siguiente cálculo:

$$(V_1) \text{ Volumen de colágeno necesario} = \frac{(\text{Conc. final de colágeno}) \times V_t}{\text{Conc. inicial de colágeno}}$$

V_t = Volumen total de gel de colágeno deseado

- Para determinar la cantidad de reactivos necesarios para que el colágeno sea a la concentración deseada con normal osmolalidad y pH neutro se requiere lo siguiente:

$$(V_2) \text{ Volumen de PBS } 10x = \frac{V_t}{10}$$

$$(V_3) \text{ Volumen de } 1N \text{ NaOH} = V_1 \times 0.025$$

$$(V_4) \text{ Volumen de Agua destilada} = V_t - (V_1 + V_2 + V_3)$$

- Mezclar el H₂O destilada, 1N NaOH y PBS 10x en un tubo estéril.
- Agregar lentamente el colágeno en el tubo y pipetear suavemente.
La mezcla resultante debe alcanzar un pH de 6.5 a 7.5 (óptimo= 7.0)
- Dispensar el colágeno en las placas deseadas inmediatamente y guardarlos en hielo. **¡Puede ocurrir gelificación a temperatura ambiente!**
- Incubar a 37°C en una incubadora humidificada durante 30 – 40 minutos o hasta que se forme un gel firme.
- Enjuague el gel con PBS 1x estéril o medio de cultivo celular antes de sembrar las células.

Ejemplo de cálculo: para un gel firme de 1mg/ml en un volumen total de 2.4mL.

$$(V_1) = \frac{\left(\frac{1mg}{ml}\right) \times 2.4ml}{\frac{3mg}{ml}} = 0.8ml \text{ de Colágeno}$$

$$(V_2) = \frac{2.4ml}{10} = 0.24ml \text{ de PBS } 10x$$

$$(V_3) = 0.8ml \times 0.025 = 0.02ml \text{ de } 1N \text{ NaOH}$$

$$(V_4) = 2.4ml - (0.8 + 0.24 + 0.02)ml = 1.34ml \text{ de H}_2\text{O destilada}$$

Tabla V: Volúmenes de recubrimiento por placa.

Placa de Cultivo (Superficie)	Recubrimiento delgado	Recubrimiento grueso
6 pocillos (10cm ²)	0.5ml	2ml
12 pocillos (4cm ²)	0.2ml	0.8ml
24 pocillos (2cm ²)	0.1ml	0.4ml
35-mm (10cm ²)	0.5ml	2ml
60-mm (20cm ²)	1ml	4ml
100-mm (60cm ²)	3ml	12ml

9. **Laminina** (Gibco™, número de catálogo: 23017-015)

- a. Descongele el vial de laminina lentamente entre 2 y 8°C, mezclar por trituración suave y preparar alícuotas en tubos de polipropileno. **¡Se puede gelificar si se descongela muy rápidamente a temperatura ambiente!**



Almacenar alícuotas a -20°C.

- b. Para recubrir los pocillos de una placa de 6; se debe agregar una alícuota de 300µL de laminina en un tubo cónico de 15ml que contenga 12ml de PBS que contenga calcio y magnesio.
- Resuspendiendo suavemente mediante pipeteo la dilución de laminina hacia arriba y hacia abajo. (Dilución 1:40, concentración 2.5 µg/ml)
- c. Agregar 2ml de la solución de laminina diluida a cada pocillo de la placa (12ml total).
- Cuando se utiliza para recubrir una placa de 6 pocillos a 2ml/pocillo, la concentración de recubrimiento final será de 0.5 µg/cm².
- d. Incubar las placas a 37°C, con 5% de inyección de CO₂ durante 2 horas para un eficiente revestimiento.

Nota: Alternativamente la placa se puede recubrir a una temperatura de 2 a 8°C durante la noche. No permita que el recipiente de cultivo se seque. Antes del uso, precalentar la placa de cultivo a temperatura ambiente.

- e. Aspire la solución de laminina y deséchela. No es necesario enjuagar el pocillo después de retirar la laminina. Las células se pueden pasar directamente al recipiente de cultivo.

10. Gelatina Tipo A (Sigma-Aldrich G1890)

La gelatina es una mezcla heterogénea de proteínas hidrosolubles de elevado peso molecular, presentes en el colágeno, componiéndose principalmente de glicina, prolina e hidroxiprolina. El Tipo A se deriva de la digestión ácida del tejido.

- a. Pesar 160mg para 2mL de tinta.
Pesar 800mg para 10mL de tinta.
- b. Hidratar con PBS
 - Incorporando 2 o 10mL al polvo.
- c. Homogeneizar en un baño termostático a 37°C.
- d. Cargar en un tubo de 15mL.
- e. Centrifugar a 4000rpm durante 2:30 minutos.
- f. Cargar la jeringa con la ayuda de una espátula.



11. Ensayo de alamarBlue

- a. Cosechar las células cuando estén en la fase logarítmica de crecimiento y hacer conteo celular cuando sean confluentes.
- b. Sembrar las células en una placa de 24 pocillos a una densidad celular de 4×10^4 células por pocillo de modo que alcance una confluencia del 70-80% después de un par de días.
- c. Mantenga la placa sembrada en una incubadora a la temperatura óptima de las células, para facilitar el crecimiento y adherencia de las células a las superficies que tiene la placa.
- d. Agregar alamarBlue asépticamente en una cantidad igual al 10% volumen del pocillo ($\sim 40\mu\text{L}$)
- e. Incubar durante 2-4 horas.
- f. Realizar la medición;
 - Absorbancia a 570nm (referencia = 600nm)
 - Excitación / Emisión = 560 / 590nm

Nota: Los medios completos sin células, incluido alamarBlue, deben considerarse en blanco.

Resumen del proceso de obtención de células del cultivo primario.

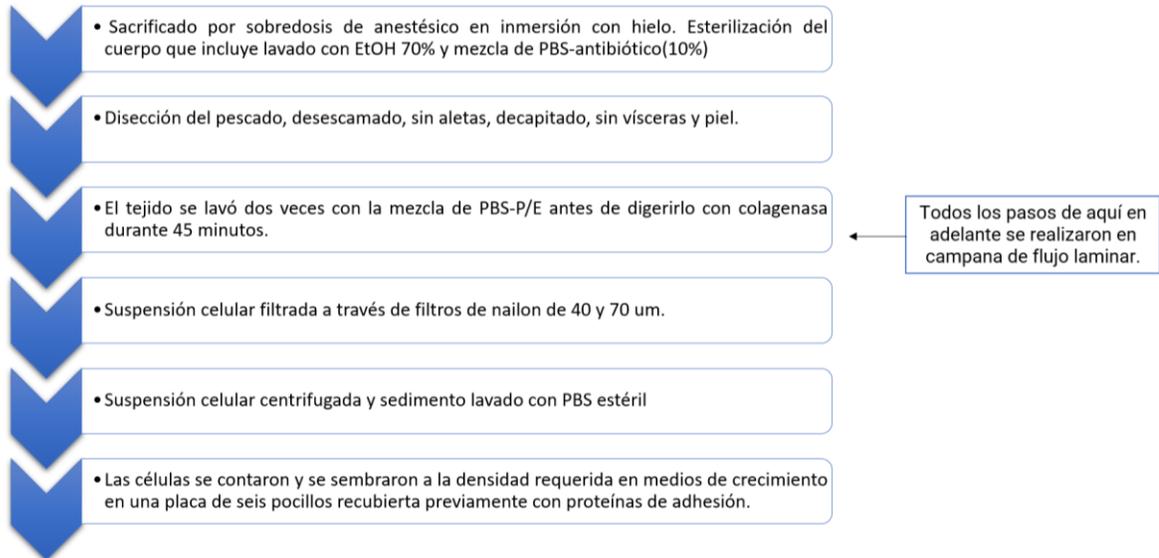


Figura 29: Diagrama de flujo del aislamiento de células asociadas al músculo esquelético de *Danio rerio* adulto.

Anexo del Conteo Celular



Figura 30: Cuadrante del hemocitómetro utilizado para recuento de células. Células viables se muestran con flechas negras dentro de los cuadrantes. Células no viables se muestran en círculo teñidas de azul.

Ejemplo de cálculo:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = 27,7 \times 10^4 \times 2 = 554.000$$

$$\text{Células total en frasco} = 554.000 \frac{\text{células}}{\text{ml}} \times 6\text{ml} = 3.324.000$$

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{277 - 31}{277} \times 100 = 88,8\%$$

Datos para el cálculo de Porcentaje de Reducción

Tabla VI: Coeficientes de extinción molar para alamarBlue.

Longitudes (λ)	ϵ_{red}	ϵ_{ox}
570 nm	155,677	80,586
600 nm	14,652	117,216

Ejemplo de cálculo:

$$\% \text{ Reducido} = \frac{(117,216) \times (0,389) - (80,586) \times (0,394)}{(155,677) \times (0,385) - (14,652) \times (0,35)} \times 100$$

$$\% \text{ Reducido} = \frac{(45,597) - (31,751)}{(59,936) - (5,128)} \times 100$$

$$\% \text{ Reducido} = \frac{(13,846)}{(54,808)} \times 100 = 25\%$$

Con el fin de que los datos puedan ser analizados de manera estadística la figura 30 presenta un ejemplo de los datos para ser llevados a un ANOVA.

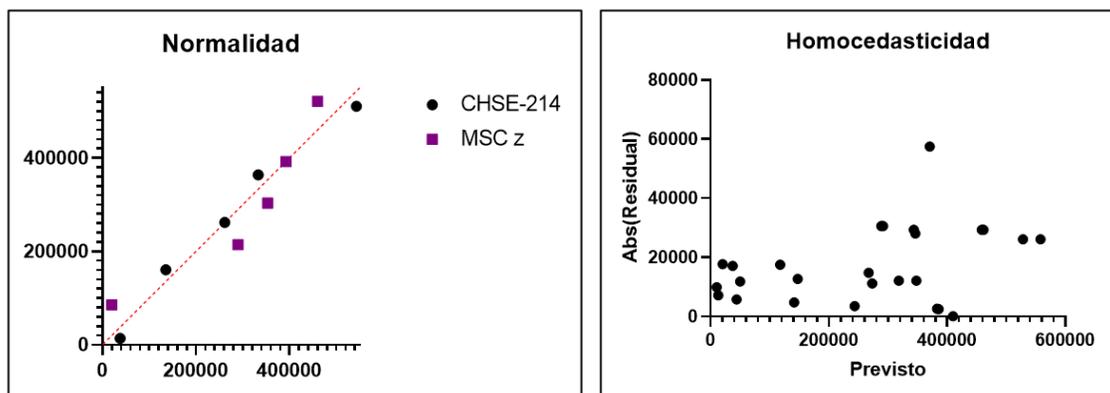
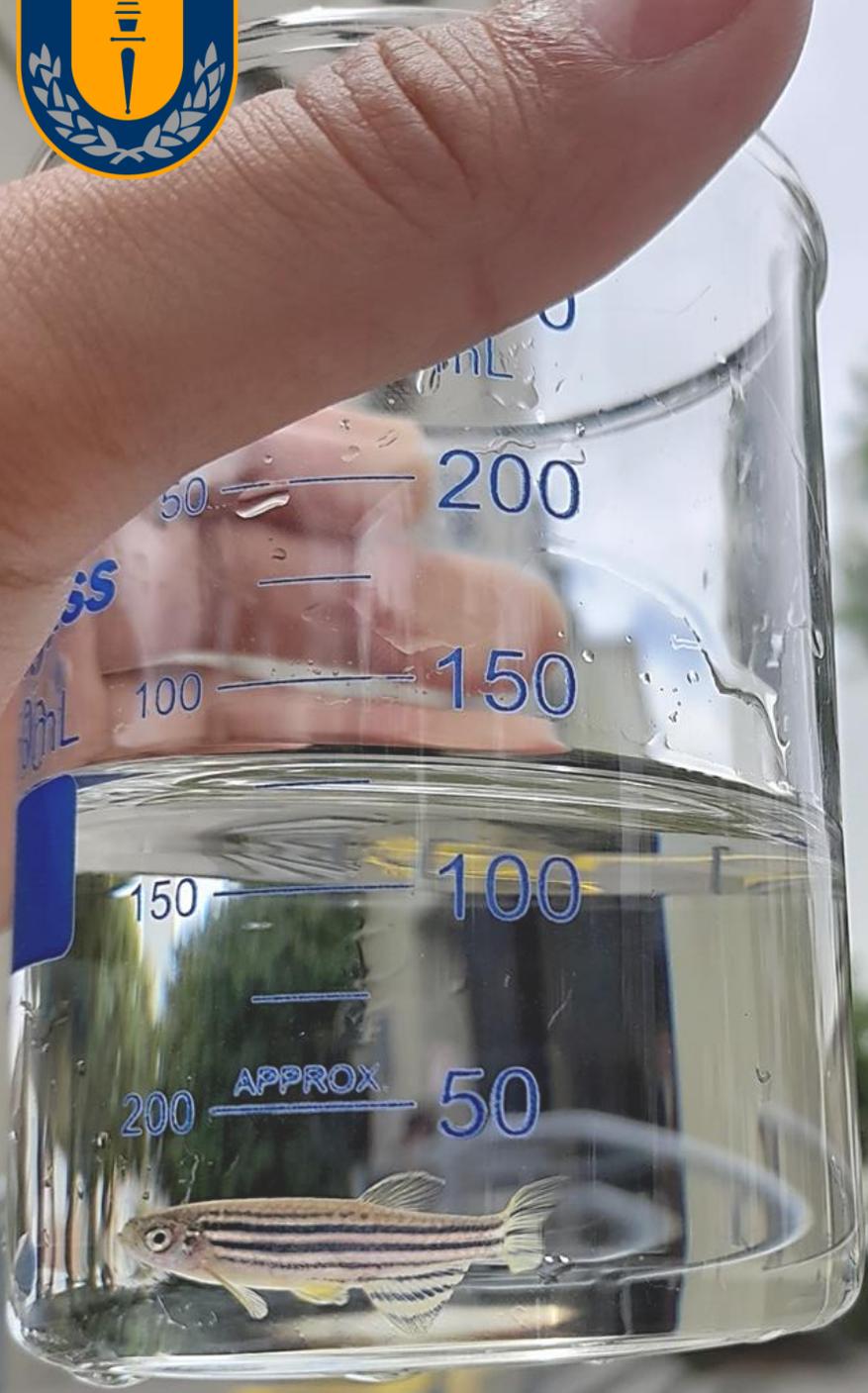


Figura 31: Normalidad y Homocedasticidad de los datos de la curva de crecimiento de las células de peces.

"Debemos escapar de lo absurdo que es criar un animal entero para comer sólo una porción de su biomasa, y sustituirlo por el crecimiento de estas partes por separado en un medio adecuado."

-Winston Churchill, 1931-



luyef



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS UDEC

