

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD
XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

“Funcionalización bioquímica de miocitos *in vitro* como modelo para la evaluación de contaminantes ambientales”.

Prestador de servicio social:

Guillermo Alfonso Macario Colín.

Matrícula: 2162033876

Asesor Interno:



Escriba el texto aquí

Dr. Chamorro Ramírez Francisco Héctor.

No. Económico: 32000

Lugar y periodo de realización:

Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco durante:

1/ 06 /2022 a 28/ 02/ 2023.

1. Introducción

La célula fundamental del tejido muscular son los miocitos, que tienen vías de señalización y mecanismos de acción para realizar el proceso de contracción la cual se considera su principal función fisiológica (Braithwaite JP y col., 2022). Para evaluar efectos directamente en el miocito se han desarrollado varios modelos de estudios *in vitro* con diferentes aproximaciones teóricas basadas en la presencia o ausencia de contracción, los cuales variaran en células utilizadas, el modelo estructural necesario y nutrientes necesarios para el crecimiento, funcionalización y caracterización (Bono N. y col., 2016). Los modelos bidimensionales son otra alternativa más práctica debido a que no requieren equipo sofisticado, pero con limitantes mayores al momento de escalar en resultados de toxicidad, además de su incapacidad estructural de realizar contractibilidad espontánea (Dessauge F. y col., 2021; Matsui T. y col. 2019).

La tarea de funcionalización de dichos miocitos en un ambiente *in vitro*, independientemente de tratarse de un modelo 2D o uno 3D, tiene que ver con la maduración inducida de sus células precursoras, los mioblastos (Pawlowski M., y col., 2017). Para lograrlo, se requieren medios de cultivo específicos en función de trabajar con modelos 2D o 3D, los que normalmente son hidrogel, bio- tintas, matrigel, plasma sanguíneo y fibrina (Sun J.C. y col., 2022).

El potencial toxicológico de contaminantes ambientales a nivel de funcionalidad de los miotubos y su contractibilidad en músculo estriado, es un campo de la investigación poco estudiado hasta ahora (Najjar S. A. y col., 2020). Conocer el efecto tóxico/farmacéutico de moléculas de interés es clave en el desarrollo de técnicas que permitan la detección, cuantificación y evaluación de los efectos directos en células precursoras del miocitos y miocitos maduros funcionales (Welsh B. T. y col., 2021).

Este trabajo ofrece una revisión de literatura sobre la funcionalización bioquímica de miocitos *in vitro* y evaluar su eficacia como modelo experimental fisiológico con aplicación toxicológica para mejorar la inocuidad de las canales.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Realizar revisión de literatura sobre la funcionalización de miocitos *in vitro* bioquímicamente útiles como modelo experimental toxicológico.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la importancia del desarrollo de modelos *in vitro* de miocitos
- Comprender el funcionamiento biológico y químico de los miocitos en condiciones *in vitro*.
- Reconocer la utilidad de los miocitos en la evaluación de contaminantes ambientales.

- Evaluar las condiciones necesarias para el establecimiento de un cultivo de miocitos *in vitro*.

3. Metodología

Para la realización de este trabajo se utilizaron fuentes digitales de información como: Elsevier, BidiUAM, PubMed y JANE. Se utilizaron palabras clave en la búsqueda de artículos científicos tales como: skeletal muscle, toxicokinetics, toxicodynamics, myocyte, isolation, cell culture, two- dimensional, three- dimensional, physiopathology, pathway myosin contraction.

La información obtenida fue analizada y seleccionada con cuidado para mantener el enfoque principal de la investigación; se tomó en consideración la fecha de publicación de los artículos encontrados y de la bibliografía revisada para tener seguridad de la validez de los datos que mencione relacionados con la funcionalización de miocitos en modelos *in vitro*. La información, posteriormente se separó en procesos que se consolidaron para cumplir la meta de la investigación. Se analizaron los hallazgos de los diferentes autores y de este modo se obtuvieron la discusión y los resultados.

4. Actividades realizadas

- Obtención de información especializada a la funcionalización de miocitos *in vitro*.
- Análisis de información encontrada enfocada en la funcionalización de miocitos.
- Interpretación concluyente de la información de los autores con enfoque en la funcionalización de miocitos *in vitro* como modelo de contaminantes.

5. Meta alcanzada

Identificar las características más importantes de los modelos bidimensionales y tridimensionales para la obtención, desarrollo, proliferación y funcionalización de los miocitos *in vitro*.

6. Resultados y conclusiones

El tejido muscular está conformado por fibras musculares con funciones diferentes dependiendo del tipo de músculo que compongan y en el caso del músculo esquelético se compone de hebras multinucleadas, Braithwaite JP y col. en 2022 y Pérez Urías y col. en 2021 explican a cerca de las interacciones de actina y miosina. Su diferenciación celular en estudios *in vitro* es de 10 días, explicado por Pawlowski M., y col., (2017); Guo X. y col., (2014), lo que resulta fundamentalmente importante para conocer el proceso miogénico en modelos 2D y 3D.

Es durante la fase de contracción muscular que se da a nivel de actina y miosina para lograr la movilidad musculoesquelética, donde se ve involucrado el ion Ca^{+} para el proceso de despolarización de la membrana, y los autores Guyton A. y col. en 2016 y Salazar J. y col. en 2018 detallan el proceso, que resulta importante para describir la base del intercambio iónico durante el proceso contráctil de las fibras musculoesqueléticas. También Sanabria y col. (2017) explican la transmisión axónica

que se da como consecuencia de este impulso, mientras que autores como Reinoso T. y col. (2021) hablan en su estudio a cerca de la predisposición de la troponina a unirse con los iones Ca^{+} para llevar a cabo el proceso de contracción y relajación, aplicable a entornos *in vitro* sin importar si se trata de modelos bidimensionales o tridimensionales.

La capacidad motora de las fibras musculares y el intercambio iónico que permite la contracción es posible gracias a la interconexión que tienen las fibras musculares con las neuronas motoras, siendo fundamental para que dicho proceso contracción/relajación pueda existir y de este modo catalogar las fibras como “funcionales”, Lindsay M Biga y col. en 2019 detallan también que durante este proceso se ve involucrada la ACh, sus receptores, iones de sodio y la membrana de las neuronas. Las membranas, al ser despolarizadas y repolarizadas por los estímulos desencadenantes, componen un proceso conocido como “ciclo de puente cruzado” donde se lleva a cabo el golpe activo y donde Das A. y col. (2020) hablan de un alto consumo de energía para lograr finalmente el proceso de contracción y relajación muscular, por lo que en un modelo *in vitro* de cualquier naturaleza, es necesario tener la cantidad necesaria de energía para que las células puedan llevar a cabo este proceso funcional.

El proceso de miogénesis se puede resumir en dos etapas, la primera es embrionaria, mientras que la segunda surge posterior a un daño muscular para reparar el tejido afectado gracias a las células satélite en la periferia de las células musculares. La miogénesis embrionaria es la etapa en la que descrita por Wang Y. y col. (2019), se ve mayor influencia por factores tales como la temperatura y demás factores ambientales, aunque también hablan de variabilidad dependiendo la especie de la que se esté hablando. Por su parte Shi J. y col (2022) habla de somitas ubicadas justo a los costados de la notocorda, que permiten derivar células progenitoras en vertebrados y Chiallou T. y col. (2016), comentan en misma instancia sobre la importancia que adquiere la oxigenación de las células involucradas en este proceso de miogénesis, ya que influyen en la regulación directa del desarrollo celular; también mencionan respecto a ello, que el estímulo de oxígeno cercano al 3-6%, puede mejorar la respuesta del proceso miogénico en adultos (reparación muscular por injuria), proceso que Shi J., y col. explican en su estudio en 2022, argumentando que se comprende de 4 etapas fundamentales y cada una cumple una función específica. Las células satélites dan estructura regenerativa a las células musculares, por lo que en el desarrollo y proliferación de células funcionales debe haber una coexistencia multicelular, tal y como Dumont N. A. y col. lo explicaron en su trabajo de 2015, por ello el nivel de complejidad es alto, ya que incluso en modelos avanzados y muy completos 3D, no siempre es posible replicar la totalidad de tejidos y diversidad celular que experimentan en un ambiente *in vivo*.

Una de las alternativas más comunes en este tipo de modelos de estudio son los modelos bidimensionales, sin embargo, al tratarse de cultivos monocapa las deficiencias de “realidad simulada” son aún mayores, si bien tienen virtudes muy claras tales como no requerir equipo altamente especializado, ventajas económicas y menor capacitación por parte del equipo de trabajo, algunos autores tales como Bono N. y col.

(2016), y Matsui T. y col. en 2019 consideran desafortunadas las limitantes dadas por su misma simplicidad, adicional Dessauge F. y col. en 2021, quien habla sobre la incapacidad de funcionalizar células musculares bajo estos parámetros, por lo que los estudios toxicológicos se ven limitados. Por otra parte, al hablar de los modelos de estudio 3D, Urciuolo A. y col. (2020) mencionan que una de las maneras de trabajarlos, es mediante impresiones tridimensionales que faciliten la emulación de tejidos reales en un ambiente controlado *in vitro*. En este punto se debe elegir, que tipo de modelo es más útil para el estudio en concreto sopesando los pros y los contras de cada uno y de este modo tomar una decisión electiva hacia la alternativa que pueda brindar un mejor beneficio al estudio experimental.

Una vez elegido el modelo más adecuado para realizar el estudio se deben llevar a cabo los pasos de establecimiento de cultivo apropiados; para establecer el cultivo primario se han de cubrir ciertas condiciones específicas que faciliten el desarrollo de las células musculo esqueléticas, pasando por la recolección de las muestras mediante biopsia, y posteriormente la diferenciación de dichas células madre o células satélite, bajo los parámetros definidos por Choi K. H. y col. en 2021. Cuando el cultivo se inicia y la diferenciación celular está en proceso, se observa que las células se disponen en haces ordenados que darán lugar a los miotubos, donde Nakada S y col, (2022) y Vaughan Megan y col. (2019) coinciden en considerar óptimo el cultivo celular para ser expuesto a hormonas promotoras de la diferenciación, de mio blastos a miotubos funcionales. Adicional a ello, Chiallou T. y col. (2016), escriben que la proliferación de las células se verá aumentada o disminuida dependiendo del tipo de medio utilizado para el cultivo, ya que, en cada etapa explican la importancia del cambio de medio para alcanzar la mejor respuesta celular. En este punto, es propicio utilizar un microscopio óptico para la evaluación morfológica de las células cultivadas. La evaluación microscópica de las células del cultivo tiene como finalidad reconocer el grado de eficiencia que tendrá el modelo para el estudio concreto.

Según un estudio realizado por Röhrle O., y col. en 2019, la morfología de las células musculares esqueléticas puede evaluarse con base en el largo, ancho, longitud de proyecciones, el diámetro del núcleo y del nucleolo, el número de núcleos hallados, el número de nucleolos y la forma que presenta la célula en cuestión. Sin embargo, no solo se deben evaluar morfológicamente. Las mediciones bioquímicas son verdaderamente importantes dentro de los parámetros de evaluación para lo que se utiliza la técnica de cuantificación de lactato, descrita por Abdelmoez A. M. y col en 2020 y por Matus O. y col. en un estudio diferente del mismo año. Otra de las mediciones a considerar, explicada por Amezola H. y col. en 2021, corresponde a la absorción de glucosa, y la función interactiva de algunas interleucinas y proteínas en este proceso. Finalmente, la funcionalización de miotubos es la parte más compleja y fundamental de dichas evaluaciones, ya que comprende la parte de motricidad y capacidad contráctil de las células musculo esqueléticas para lo cual es imprescindible la inervación tal como lo mencionan Sebastián S. y col. (2015). En esta etapa final, son los factores de crecimiento en conjunto con andrógenos y anabólicos los encargados de finalizar la maduración celular del cultivo, explicado en 2021 por el estudio de Choi K. H. y col. En el mismo

estudio realizado por Sebastián S. y col. (2015) se definen determinadas características avanzadas que las fibras musculo esqueléticas deben poseer; la primera de ellas es el desarrollo sarcomérico evaluado por la presencia de estrías cruzadas, que corresponde básicamente a la composición estructural que deben poseer las fibras musculares para tener la capacidad de contracción, y pudiendo evaluarse mediante microscopía de fase permitiendo la observación de miotubos con patrones estriados entrecruzados; la segunda comprende la caracterización y el desarrollo de acoplamiento de excitación-contracción, que constituye la respuesta emitida por parte del músculo ante los potenciales de acción que se propagaron a través de las membranas de miofibrillas musculares y posteriormente la repolarización membranal que hace posible la relajación; la tercera y última es la contractibilidad espontánea y controlada eléctricamente donde se evalúa que los canales iónicos estén en correcto funcionamiento, por lo que un potencial de membrana en reposo estable es un buen indicativo, siendo que con todo lo anterior podríamos hablar de miotubos maduros electrofisiológicamente competentes.

El uso de modelos bidimensionales y tridimensionales en para el estudio de tóxicos tiende a facilitar pruebas de sustancias potencialmente nocivas, además de ayudar a conocer el grado de tolerancia que existe por parte de las células expuestas a dicha injuria, tal y como explican Najjar S. A. y col en 2020 y Welsh B. T. y col en 2021 respectivamente. Otros autores como Urciuolo A y col, en 2020, Shahin-Shamsabadi A. y col en 2020 y Pawlowski M. y col. en 2017, concuerdan en que el aprovechamiento de modelos tridimensionales tiene un abanico más amplio de posibilidades para llevar a cabo estudios toxicológicos significativos, debido a la complejidad de conexiones intercelulares que se puede llegar a manejar respecto a los modelos bidimensionales.

Al hablar de modelos de cultivo 2D y 3D de miocitos y miotubos, se comprende que las similitudes entre células progenitoras de fibras musculares y células satélite de musculo esquelético son altas, ya que ambas pueden activarse para ser prolíficas y diferenciadas hacia mioblastos, que continuarán su desarrollo hasta volverse células musculo esqueléticas funcionales con las características mencionadas anteriormente. Sin embargo, Sebastián S. y col. (2015) hablan a cerca de la dificultad actual de igualar una simulación de agentes externos que puedan alterar aleatoriamente las necesidades celulares tal como sería en un ambiente *in vivo*, al tener que haber hipertrofia, atrofia, regulación homeostática por la variabilidad de nutrientes en el medio, la capacidad metabólica de ser altamente oxidativas o un tipo de fibra glucolítica, etcétera. Por lo anterior, los cultivos de células musculares esqueléticas se hacen típicamente con miotubos inmaduros, teniendo una ventana de 3-7 días para su diferenciación.

Considerando que existe una variedad amplia de contaminantes, se utilizan diferentes alternativas para garantizar la mejor simulación de resultados respecto a una situación *in vivo*. Kumar P. y col. (2021) hablan sobre el control exhaustivo que se debe tener durante los procedimientos para la identificación de peligros y la aplicación de sistemas que regulen los estándares de contaminación en la carne y que esta se puede ver afectada por agentes biológicos que pusieran en riesgo la salud, según Chriki S. y col.

(2020) y Johne A. y col. (2021). Los agentes químicos como factores contaminantes también involucran hormonas añadidas, y enzimas que vuelven “poco limpios” los productos cárnicos, además de la contaminación por pesticidas, y prácticas inadecuadas de manejo farmacológico, tal y como explican Baéza E. y col. en 2022. Por ello, la cantidad de aplicaciones y la diversidad de utilidades que tienen los modelos de cultivo de miocitos tanto 2D como 3D son potencialmente altos en el estudio de contaminantes.

A pesar de que los modelos bidimensionales y tridimensionales para el estudio de contaminantes ha sido desarrollado ampliamente, sigue siendo considerado un campo de estudio por madurar, ya que las limitantes en diferentes modelos que han sido explorados aún son significativas y resultan difíciles de sortear. Los modelos tridimensionales pese a tener ventajas evidentes sobre los modelos 2D convencionales, no han sido utilizados consistentemente, debido a los costos que generan y la preparación que demandan con el manejo de equipo sofisticado. Los estudios más recientes mencionan que no es factible actualmente el uso de cultivos musculares esqueléticos *in vitro* para cubrir necesidades poblacionales no relacionadas con modelos de estudio, tal como pudiera ser una fuente de alimentación como alternativa a la carne *in vivo*, sin embargo, no es descartable esa posibilidad con una visión al futuro.

7. Referencias Bibliográficas

1. Abad Torrent Ana. (2012). Nuevas troponinas ultrasensibles en la detección del Síndrome Coronario Agudo (SCA). Figura 3. Recuperado: <https://anestesiari.org/2012/nuevas-troponinas-ultrasensibles-en-la-deteccion-del-sindrome-coronario-agudo-sca/>
2. Abdelmoez, A. M., Sardón Puig, L., Smith, J., Gabriel, B. M., Savikj, M., Dollet, L., Chibalin, A. V., Krook, A., Zierath, J. R., & Pilon, N. J. (2020). Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism. *American journal of physiology. Cell physiology*, 318(3), C615–C626. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00540.2019>
3. Amézola Herrera, P. L. ., Estrada Pacheco, K. ., Guerra Rosales, J. M. ., Marmolejo Murillo, L. G. ., & Sánchez Duarte, E. . (2021). Señalización de las mioquinas en músculo esquelético durante la diabetes. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 10. Recuperado a partir de <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3414>
4. Baéza, E., Guillier, L., & Petracci, M. (2022). Review: Production factors affecting poultry carcass and meat quality attributes. *Animal*, 16(Supplement 1). <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.animal.2021.100331>
5. Bono, N., Pezzoli, D., Levesque, L., Loy, C., Candiani, G., Fiore, G. B., & Mantovani, D. (2016). Unraveling the role of mechanical stimulation on smooth muscle cells: A comparative study between 2D and 3D models. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(10), 2254–2263. <https://doi.uam.elogim.com/10.1002/bit.25979>

6. Braithwaite JP, Al Khalili Y. Physiology, Muscle Myocyte. [Updated 2021 May 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544225/>
7. Brandon J. Gheller, Jamie Blum, Sharon Soueid-Baumgarten, Erica Bender, Benjamin D. Cosgrove, & Anna Thalacker-Mercer. (2019). Isolation, Culture, Characterization, and Differentiation of Human Muscle Progenitor Cells from the Skeletal Muscle Biopsy Procedure. *Journal of Visualized Experiments*, 150. <https://doi.uam.elogim.com/10.3791/59580>
8. Cartín-Rojas, A., & Ortiz, P. (2018). Ventajas y desventajas del cultivo de carne in vitro: perspectivas desde la seguridad alimentaria / Advantages and disadvantages of in vitro meat production: Food safety perspectives / Vantagens e desvantagens do cultivo de carne in vitro: perspectivas desde a seguridade alimentar. *Revista de Medicina Veterinaria*, 36, 135–144. <https://doi.uam.elogim.com/10.19052/mv.5179>
9. Chaillou, T., & Lanner, J. T. (2016). Regulation of myogenesis and skeletal muscle regeneration: effects of oxygen levels on satellite cell activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(12), 3929–3941. <https://doi.org/10.1096/fj.201600757R>
10. Chal, J., & Pourquié, O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Development (Cambridge, England)*, 144(12), 2104–2122. <https://doi.org/10.1242/dev.151035>
11. Choi, K., Yoon, J. W., Kim, M., Lee, H. J., Jeong, J., Ryu, M., Jo, C., & Lee, C. (2021). Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: A methodological review. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 20(1), 429–457. <https://doi.uam.elogim.com/10.1111/1541-4337.12661>
12. Chriki S and Hocquette J-F (2020). The Myth of Cultured Meat: A Review. *Front. Nutr.* 7:7. doi:10.3389/fnut.2020.00007
13. Das, A., Das, A., Das, D., Abdelmohsen, K., & Panda, A. C. (2020). Circular RNAs in myogenesis. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, 1863(4), 194372. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.02.011>
14. Dessauge, F., Schleder, C., Perruchot, MH. Et al. 3D in vitro models of skeletal muscle: myosphere, myobundle and bioprinted muscle construct. *Vet Res* 52, 72 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00942-w>
15. Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M. C., & Rudnicki, M. A. (2015). Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1027–1059. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140068>
16. Grifone, R., Xie, X., Bourgeois, A., Saquet, A., Duprez, D., & Shi, D. L. (2014). The RNA-binding protein Rbm24 is transiently expressed in myoblasts and is required for myogenic differentiation during vertebrate development. *Mechanisms of development*, 134, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2014.08.003>
17. Guo, X., Greene, K., Akanda, N., Smith, A., Stancescu, M., Lambert, S., Vandenberg, H., & Hickman, J. (2014). In vitro Differentiation of Functional Human Skeletal Myotubes in a Defined System. *Biomaterials science*, 2(1), 131–138. <https://doi.org/10.1039/C3BM60166H>
18. Guyton Aethur C., Hall John E. (2016). Tratado de Fisiología Médica. Decimotercera edición. Elsevier. Disponible:

<http://www.fmvz.uat.edu.mx/Libros%20digitales/Fisiolog%C3%ADa%20m%C3%A9dica%20-%20John%20E.%20Hall.pdf>

19. Hernández-Almaraz, Pablo, Lugo-Lugo, Orlando, Brassea-Pérez, Elizabeth, Gaxiola-Robles, Ramón, & Zenteno-Savín, Tania. (2022). Morphometric Characteristics of Human Skeletal Muscle Cells in Primary Culture. *International Journal of Morphology*, 40(2), 521-529. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022022000200521>
20. Hocquette J. F. (2016). Is in vitro meat the solution for the future?. *Meat science*, 120, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.036>
21. Iqbal, A., Ping, J., Ali, S., Zhen, G., Juan, L., Kang, J. Z., Ziyi, P., Huixian, L., & Zhihui, Z. (2020). Role of microRNAs in myogenesis and their effects on meat quality in pig - A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33(12), 1873–1884. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0324>
22. Jasmine Si Han Seah, Satnam Singh, Lay Poh Tan & Deepak Choudhury (2022) Scaffolds for the manufacture of cultured meat, *Critical Reviews in Biotechnology*, 42:2, 311-323, DOI: [10.1080/07388551.2021.1931803](https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1931803)
23. Johne, A., Filter, M., Gayda, J., Buschulte, A., Bandick, N., Nöckler, K., & Mayer-Scholl, A. (2021). Reprint of: Survival of *Trichinella spiralis* in cured meat products. *Veterinary Parasitology*, 297. <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.vetpar.2021.109544>
24. Kumar, P., Sharma, N., Sharma, S., Mehta, N., Verma, A. K., Chemmalar, S., & Sazili, A. Q. (2021). *In-vitro* meat: a promising solution for sustainability of meat sector. *Journal of animal science and technology*, 63(4), 693–724. <https://doi.org/10.5187/jast.2021.e85>
25. Matsui T., Miyamoto K., Yamanaka K., Okai Y., Pfeiffer E., Harada K., Wagoner M., Shinozawa T. 2019. Cell-based two-dimensional morphological assessment system to predict cancer drug-induced cardiotoxicity using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, volume 383. <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.taap.2019.114761>
26. Matus-Ortega, Genaro, Romero-Aguilar, Lucero, Luqueno-Bocardo, Oscar Ivan, Hernandez-Morfin, Katia, Guerra-Sanchez, Guadalupe, Matus-Ortega, Maura, Martinez-Montes, Federico, & Pardo-Vazquez, Juan Pablo. (2020). Las funciones metabólicas, endocrinas y reguladoras de la expresión genética del lactato. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 63(5), 7-17. Epub 05 de marzo de 2021. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.5.02>
27. Megan Vaughan, & Katja A. Lamia. (2019). Isolation and Differentiation of Primary Myoblasts from Mouse Skeletal Muscle Explants. *Journal of Visualized Experiments*, 152. <https://doi.uam.elogim.com/10.3791/60310>
28. Montalvo A. César E. (2011). Sistema Locomotor. Figura 1; Figura 2. Recuperado de: https://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/tejido_muscular_montalvo_2011.pdf
29. Musarò, A., & Carosio, S. (2017). Isolation and Culture of Satellite Cells from Mouse Skeletal Muscle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1553, 155–167. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6756-8_12

30. Najjar S. A., Smith, A. S. T., Long, C. J., McAleer, C. W., Cai, Y., Srinivasan, B., Martin, C., Vandeburgh, H. H., & Hickman, J. J. (2020). A multiplexed in vitro assay system for evaluating human skeletal muscle functionality in response to drug treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(3), 736–747. <https://doi.uam.elogim.com/10.1002/bit.27231>
31. Nakada, S., Yamashita, Y., Akiba, S., Shima, T., & Arikawa-Hirasawa, E. (2022). Myocyte Culture with Decellularized Skeletal Muscle Sheet with Observable Interaction with the Extracellular Matrix. *Bioengineering*, 9(7), 309. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9070309>
32. Nijholt, K. T., Meems, L., Ruifrok, W., Maass, A. H., Yurista, S. R., Pavez-Giani, M. G., Mahmoud, B., Wolters, A., van Veldhuisen, D. J., van Gilst, W. H., Silljé, H., de Boer, R. A., & Westenbrink, B. D. (2021). The erythropoietin receptor expressed in skeletal muscle is essential for mitochondrial biogenesis and physiological exercise. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 473(8), 1301–1313. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02577-4>
33. Pawlowski, M., Ortmann, D., Bertero, A., Tavares, J. M., Pedersen, R. A., Vallier, L., & Kotter, M. (2017). Inducible and Deterministic Forward Programming of Human Pluripotent Stem Cells into Neurons, Skeletal Myocytes, and Oligodendrocytes. *Stem cell reports*, 8(4), 803–812. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.016>
34. Pérez Urías D., O. Lugo-Lugo, P. Hernández-Almaraz y T. Zenteno-Savín. (2021). El músculo y su estructura. *Recursos Naturales y Sociedad*, 2021. Vol. 7 (1): 1-15. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2021.07.07.01.0001>
35. Reinoso, T. R., Landim-Vieira, M., Shi, Y., Johnston, J. R., Chase, P. B., Parvatiyar, M. S., Landstrom, A. P., Pinto, J. R., & Tadros, H. J. (2021). A comprehensive guide to genetic variants and post-translational modifications of cardiac troponin C. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 42(2), 323–342. <https://doi.org/10.1007/s10974-020-09592-5>
36. Röhrle, O., Yavuz, U. Ş., Klotz, T., Negro, F., & Heidlauf, T. (2019). Multiscale modeling of the neuromuscular system: Coupling neurophysiology and skeletal muscle mechanics. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 11(6), e1457. <https://doi.uam.elogim.com/10.1002/wsbm.1457>
37. Salazar J., Mejías J.C., Chávez-Castillo M., Chimbo Oyaque C.E., Chimbo Oyaque T.A., Zurita T. J., Bermejo A.M., Espinoza Diaz C.I., Morocho Zambrano A.A., Rojas J. (2018). Rabdomiólisis: bases moleculares y presentaciones clínicas. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, vol. 38, núm. 2. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55960422013>
38. Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., & Monge-Bonilla, C. (2017). Neurotransmisión Colinérgica Central: Aspectos Moleculares. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 18(2), 76–87. <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=124306417&lang=es&site=eds-live&scope=site>
39. Sass, F. A., Fuchs, M., Pumberger, M., Geissler, S., Duda, G. N., Perka, C., & Schmidt-Bleek, K. (2018). Immunology Guides Skeletal Muscle Regeneration.

- International journal of molecular sciences*, 19(3), 835.
<https://doi.org/10.3390/ijms19030835>
40. Sebastian, S., Goulding, L., Kuchipudi, S.V. *et al.* (2015). Extended 2D myotube culture recapitulates postnatal fibre type plasticity. *BMC Cell Biol* 16, 23
<https://doi.org/10.1186/s12860-015-0069-1>
 41. Shahin-Shamsabadi, A., & Selvaganapathy, P. R. (2020). A 3D Self-Assembled In Vitro Model to Simulate Direct and Indirect Interactions between Adipocytes and Skeletal Muscle Cells. *Advanced biosystems*, 4(6), e2000034.
<https://doi.org/10.1002/adbi.202000034>
 42. Shi, J., Li, W., Liu, A., Ren, L., Zhang, P., Jiang, T., Han, Y., & Liu, L. (2022). MiRNA sequencing of Embryonic Myogenesis in Chengkou Mountain Chicken. *BMC Genomics*, 23(1), 1–15. <https://doi.uam.elogim.com/10.1186/s12864-022-08795-z>
 43. Sitio web: bit.bio. (2022). Human iPSC-derived skeletal myocytes.
<https://www.bit.bio/myocytes>
 44. Spinazzola, J. M., & Gussoni, E. (2017). Isolation of Primary Human Skeletal Muscle Cells. *Bio-protocol*, 7(21), e2591.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2591>
 45. Sun J.C., Jo B., Morimoto Y. and S. Takeuchi. 2022. In Vitro Skeletal Muscle Tissue with Edible Hydrogel Toward Fabrication of Cultured Meat in Macroscopic Size. IEEE 35th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems Conference (MEMS), 2022, pp. 432-434. doi: [10.1109/MEMS51670.2022.9699606](https://doi.org/10.1109/MEMS51670.2022.9699606)
 46. Treich, N. (2021). Cultured Meat: Promises and Challenges. *Environmental & Resource Economics*, 79(1), 33–61.
<https://doi.uam.elogim.com/10.1007/s10640-021-00551-3>
 47. Urciuolo A, Serena E, Ghua R, Zatti S, Giomo M, Mattei N, et al. (2020) Engineering a 3D in vitro model of human skeletal muscle at the single fiber scale. PLoS ONE 15(5): e0232081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.023208>
 48. Voicu, V. A., Thiermann, H., Rădulescu, F. Ş., Mircioiu, C., & Miron, D. S. (2010). The Toxicokinetics and Toxicodynamics of Organophosphonates versus the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oxime Antidotes: Biological Consequences. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 106(2), 73–85.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00486.x>
 49. Wang, Y., Yan, X., Liu, H., Hu, S., Hu, J., Li, L., & Wang, J. (2019). Effect of thermal manipulation during embryogenesis on the promoter methylation and expression of myogenesis-related genes in duck skeletal muscle. *Journal of thermal biology*, 80, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.12.023>
 50. Welsh, B. T., Cote, S. M., Meshulam, D., Jackson, J., Pal, A., Lansita, J., & Kalra, A. (2021). Preclinical Safety Assessment and Toxicokinetics of Apitegromab, an Antibody Targeting Proforms of Myostatin for the Treatment of Muscle-Atrophiying Disease. *International Journal of Toxicology (Sage)*, 40(4), 322–336.
<https://doi.uam.elogim.com/10.1177/10915818211025477>

