

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
CÉLULAS MADRE BOVINAS Y SU ANÁLISIS EN EL
MERCADO**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

**Cecilia Casarotti - 216488
Sofia Dietrich - 199851**

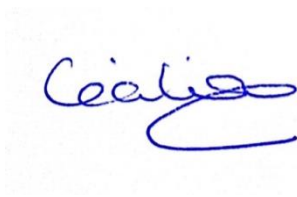
**Tutor: Inés Tiscornia
Co-tutor: Fabiana Rey**

2022

Declaración de la autoría

Nosotras, Sofia Dietrich y Cecilia Casarotti, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizamos el proyecto final de la carrera Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente que fue contribuido por otros, y que fue contribuido por nosotros;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



María Cecilia Casarotti Gaminara



Sofía María Dietrich Caramés

10 de Agosto de 2022

Agradecimientos

En primer lugar, quisiéramos agradecer a nuestra tutora Inés Tiscornia y co-tutora Fabiana Rey por la dedicación brindada en todo momento. Por su paciencia, disposición y entrega a lo largo de toda la tesis.

A Latitud (Fundación del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU) por su colaboración a lo largo de todo el transcurso de este proyecto y también por su confianza en nosotras para llevar a cabo el proyecto.

A la Universidad ORT Uruguay y a sus colaboradores que siempre se mostraron dispuestos a ayudarnos. En especial a Ana Paula Mulet, quien nos ha acompañado durante todo el proceso y a su vez nos ha dado soporte en todo momento.

A todos los que se involucraron y nos permitieron acceder a las muestras requeridas en el proyecto, como: PhD. Darío Caffarena de Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, Gerardo Decia del Frigorífico Sirsil S.A, Carlos Baraibar de Frigorífico Inaler S.A. - Marfrig Group y Patricia Speck de Frigorífico Las Moras.

A nuestros compañeros de carrera que transitaron con nosotros a lo largo de todo el proceso académico.

Por último, un agradecimiento especial a nuestras familias y amigos, que estuvieron incondicionalmente durante todo este proceso. Por saber acompañarnos en los momentos difíciles y por celebrar con nosotros nuestros logros. ¡Gracias totales!

Resumen

En los últimos tiempos, se ha oído hablar acerca de la carne sintética o carne cultivada. Ésta se produce por medio de un cultivo de células en un laboratorio, y posee características muy similares a la carne tradicional, en cuanto a su apariencia, sabor y textura. Existen aproximadamente 100 *start-ups* interesadas en abordar la producción de carne sintética. Estas también reciben inversiones de otras empresas grandes las cuales se han visto motivadas a invertir debido al incremento esperado en la demanda de proteína animal, la huella ambiental de los sistemas ganaderos tradicionales y la disminución significativa del número de animales sacrificados. Dicha producción se lleva a cabo a partir de una materia prima primordial que son las células madre satélite (CMS) (1).

Las células madre satélite son células indiferenciadas capaces de promover la regeneración tisular y con una alta capacidad de inmunomodulación. Además, se pueden extraer de manera sencilla a partir de animales adultos, y poseen la capacidad de diferenciación hacia linaje muscular (2).

El objetivo del presente estudio fue extraer y caracterizar las CMS aisladas desde diferentes músculos vacunos. Estas fueron aisladas en base a su adherencia al plástico a partir de muestras de tejido muscular bovino (n=8) y posteriormente cultivadas *in vitro* bajo condiciones de esterilidad por un periodo de 15-20 días. Se procesaron muestras de diferentes orígenes: biopsia y animales faenados, y se evaluaron dos métodos para la obtención de las CMS. Se realizaron ensayos para caracterizar las células obtenidas, morfología y adherencia al plástico, curva de crecimiento e inmunomarcación de Pax7.

Los resultados obtenidos dan indicio a que las células aisladas mediante el uso de filtros de tipo *cell strainers* se tratarían de células madre satélite. Esto se puede observar tanto en su morfología, su comportamiento hacia la diferenciación, su alta viabilidad y la presencia de Pax 7 en el núcleo celular (3).

Palabras clave

Carne sintética, células madre satélite, mioblastos, *cell strainers*, Percoll®, pax7, inmunofluorescencia, cultivo celular, consumo de glucosa, viabilidad celular, plan de negocios.

Abreviaciones

CMS: Célula madre satélite

CS: Célula satélite

CM: Célula madre

PBS: del inglés, *Phosphate-buffered saline*

ETOH: Etanol

DMEM: del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

SFB: Suero fetal bovino

FAO: del inglés, *Food and Agriculture Organization*

EEUU: Estados Unidos de América

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

INAC: Instituto Nacional de Carnes

PDT: del inglés, *Population doubling time*

UNEP GEAS: del inglés, *United Nations Environmental Program, Global Environmental Alert Service*

DMSO: del inglés, *Dimethyl sulfoxide*

rpm: Revoluciones por minuto

Tamb: Temperatura ambiente

Índice

1. Introducción	9
1.1. Carne vacuna: Consumo y mercado	9
1.1.1 Consumo	9
1.1.2. Mercado interno	9
1.1.3. Mercado Global	10
1.2. Alternativa a la carne vacuna	10
1.2.1. Necesidad de nuevas fuentes de alimento	10
1.2.2. Impacto ambiental de la producción de carne	11
1.2.3. Carne sintética como complemento a la carne tradicional	11
1.2.4. Impacto en la sociedad	12
1.2.5. Ventajas y desventajas	12
1.2.6. Ética.....	13
1.3. Generalidades de las células madre	14
1.3.1. Células madre satélite.....	15
1.3.2. Aplicaciones de células madre.....	15
1.3.3. Cultivo de células madre	15
1.3.4. Caracterización de células madre satélite	16
1.4. De célula madre a carne sintética	18
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo general.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. Materiales y métodos	20
3.1. Toma de muestra de tejido muscular bovino	20
3.2. Extracción y aislamiento de células madre bovinas	21
3.3. Mantenimiento de células madre bovinas en cultivo	21
3.4 Evaluación de morfología celular	22
3.5. Inmunofluorescencia para Pax7	22
3.6. Curva de crecimiento y viabilidad celular.....	23
3.7. Congelado de células.....	24
3.8. Descongelado de células.....	24
3.9. Consumo de glucosa	24
4. Resultados y discusión	26
4.1. Extracción de células madre satélites.....	26
4.1.1. Evaluación de extracción a partir de muestras de diferentes orígenes	26
4.2. Evaluación de dos metodologías de aislamiento celular: filtración y centrifugación en gradiente de <i>Percoll</i> ®	32
4.3. Evaluación de la extracción y aislamiento celular dependiente del músculo de partida	33
4.4. Caracterización del cultivo celular	35

4.4.1. Morfología y adherencia.....	35
4.4.2. Inmunofluorescencia Pax7	38
4.5. Ensayo de evaluación de crecimiento y viabilidad celular	41
4.6. Rendimiento celular de una extracción a partir de tejido bovino.....	42
4.7. Consumo celular de glucosa.....	43
5. Plan de negocios	46
5.1. Introducción	46
5.2. Análisis FODA	47
5.3. Validación del plan de negocios	48
5.4. Marketing Mix.....	51
5.4.1. Producto	51
5.4.2. Precio	52
5.4.3. Publicidad	52
5.4.4. Plaza.....	52
5.5. Proyección del mercado	52
5.6. Análisis financiero.....	54
5.7. Estrategia de comercialización	55
5.8. Mercado <i>target</i>.....	55
5.9. En qué momento hacer el procedimiento	55
5.10. Riesgos identificados.....	56
6. Conclusiones y perspectivas a futuro	57
6.1. Conclusiones	57
6.2. Perspectivas a futuro	58
7. Referencias bibliográficas.....	59
8. Anexos.....	63
8.1. Anexo 1	63
8.2. Anexo 2	67

1. Introducción

1.1. Carne vacuna: Consumo y mercado

1.1.1 Consumo

En el 2019, la *bbc* realizó un análisis del consumo de carne vacuna global. Se detectó que el consumo de carne aumentó casi cinco veces más que a principios de la década del 60. Desde 70 millones de toneladas a más de 330 millones de toneladas en el 2017. Esto se debe a que la población mundial se duplicó durante ese periodo pasando de 3000 millones de personas a 7600 millones.

En el 2013, se registraron los datos de la FAO y de *Our World in Data* y según esta información, los cuatro países que encabezaron la lista de consumo cárnico en el mundo eran EEUU, Australia, Nueva Zelanda y Argentina teniendo un promedio de consumo de 100 kg per cápita anuales.

La mayoría de los países de Europa occidental consumen entre 80 y 90 kg de carne por persona por año. De lo contrario, el promedio en Etiopía es de 7kg, de Ruanda de 8kg y de Nigeria de 9kg, siendo diez veces menor que el promedio europeo.

Según este análisis, se puede concluir que el consumo de carne está vinculado a la situación socioeconómica del país.

Por estos motivos mencionados anteriormente, es que muchas empresas están interesadas en lograr producir carne en mayor cantidad y a un menor precio con el fin de abastecer a toda la población mundial (4).

1.1.2. Mercado interno

En Uruguay, se consume una alta cantidad de carne, principalmente de origen bovino, lo que diferencia a la población uruguaya del resto de los consumidores de carne a nivel mundial. El consumo mundial cárnico está liderado por carne porcina seguida por la aviar, en tercer lugar, se encuentra la carne vacuna. Esto se explica ya que ya que la carne bovina es la de mayor precio comparado al resto de las carnes analizadas. La misma ha tenido una dinámica particular, con claras diferencias entre los mercados en desarrollo y desarrollados. Se vuelca al mercado interno aproximadamente el 25% de la producción total del país de carne bovina. Cabe destacar, que la producción de carne hace de la gastronomía uruguaya un monopolio cárnico, predominando los alimentos derivados de la ganadería bovina. Según estudios realizados, se detalló que el consumo promedio de carne bovina per cápita en el 2021 se ubicaba en 46,6 kg por año (5).

El mercado interno se posicionó como un mercado clave para la industria frigorífica en donde las empresas del sector cárnico lograron mayor rentabilidad como consecuencia de la combinación del mercado interno y el externo.

En el 2021 se concluyó con una facturación récord en cuanto a la comercialización de carnes producidas en Uruguay, considerando que se superaron los 4000 millones de dólares que se desglosan

en 2900 millones de dólares por los ingresos por exportaciones y 1200 millones de dólares por comercialización en el mercado interno.

Por otro lado, se ha detectado que en comparación con el 2020, el consumo de carne bovina en Uruguay ha aumentado un 2,3%. Cabe destacar, que también aumentó el precio de la carne en comparación con el 2020, un 21,5% según datos del INAC (6).

1.1.3. Mercado Global

Los principales mercados a los que Uruguay exporta carne vacuna son: China, Estados Unidos, Japón, Corea y la Unión Europea.

Con respecto a Estados Unidos, en el 2021 se detectó que el mercado cárnico se encontraba en un momento “muy interesante” porque subió el precio de la comida y el consumo de alimentos llegó a niveles récord.

En cuanto a China, se ha definido como que es el mercado más resuelto y trabajado debido al arancel manejable. Por otro lado, la demanda cárnica se mantiene en el tiempo y las acciones de marketing son cada vez más fuertes. Con perspectivas de crecimiento, se ve un mercado con mucha firmeza y estabilidad.

Por último, en el caso de Japón y Corea del Sur, se consideran mercados muy similares con acceso ilimitado. Lo arancelario es más complicado y la demanda desafiante. Uruguay es el sexto mayor exportador en Japón, por lo que significa un 1% del mercado.

Con respecto a la exportación al mercado europeo, se sabe que es un mercado desafiante, pero de todas formas se han observado aumentos tanto en volumen como en valor en el 2021 (7).

El sector cárnico seguirá creciendo en el mundo. En el 2021 se consideró el mejor desempeño histórico en cuanto a la producción cárnica (aviar, porcino, bovino) (8). De acuerdo con datos preliminares del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), el saldo productivo del 2022 alcanza los 58 millones de toneladas, lo que significa un crecimiento del 1% anual mientras que la necesidad de importación prevista para este año ascendería a 10 millones de toneladas (7).

Con respecto a las exportaciones globales de carne vacuna, en el 2021 se detectaron las más altas de la historia, con un valor de 11 millones de toneladas, un 2% más que en el 2022 según la USDA (9).

1.2. Alternativa a la carne vacuna

1.2.1. Necesidad de nuevas fuentes de alimento

Debido a la importancia nutricional y la popularidad sostenida de la carne como alimento, el sector ganadero se ha ido expandiendo exponencialmente, con un consumo promedio actual de carne de 42 kg por año a nivel mundial (UNEP GEAS 2012).

Estudios de la FAO que plantean perspectivas del sector agrícola hacia el 2030 prevén que se dará un crecimiento del 14% en cuanto al consumo de proteínas cárnicas para esta fecha. Este aumento significativo se atribuye precisamente al crecimiento poblacional, aumento de la riqueza y urbanización. El crecimiento exponencial del sector cárnico ganadero plantea un desafío a la sostenibilidad del sistema de producción de alimentos.

Por estos motivos es que se está profundizando cada vez más en el tema de la carne sintética, con el fin de satisfacer las necesidades de la población mundial otorgando seguridad alimentaria, sostenibilidad ambiental y salud (10).

1.2.2. Impacto ambiental de la producción de carne

Los investigadores ambientales han estado analizando el impacto ambiental que tiene la carne en nuestra salud y en el ambiente. Los mismos, están convencidos que la disminución en el consumo de la carne es indudablemente el camino no solo para mejorar nuestra salud, sino también la del planeta. Se ha detectado que las emisiones del sector ganadero (que incluye vacas, cabras, ovejas, cerdos y aves) son responsables del equivalente a 7,1 gigatoneladas de dióxido de carbono anuales, aproximadamente el 14,5 por ciento de las emisiones causadas por humanos. Esas son las estimaciones de la FAO, que además señala que el 65 por ciento de las emisiones del sector están relacionadas con la producción de carne y lácteos. Pero las emisiones de la industria ganadera no son el único problema para el planeta. La cría de animales domina tres cuartos de la tierra de cultivo, contamina el agua y lleva a la deforestación, particularmente en la selva amazónica (11).

Se ha demostrado que la creciente demanda cárnica impulsa la producción de soja, lo que lleva a la deforestación.

La producción de carne está siendo desafiada cada vez más por la necesidad de frenar el cambio climático debido al efecto invernadero (12).

1.2.3. Carne sintética como complemento a la carne tradicional

Existen tres aspectos claves que determinarán el futuro de la población mundial.

El primero consiste en el número de habitantes y la demanda alimentaria. Según datos de la FAO y la ONU, 1100 millones de personas están hambrientas, 3000 millones malnutridas, 1400 millones obesas, 2400 millones en condiciones de peso más o menos correctas. Estos datos señalan una situación geoeconómica insostenible.

Siguiendo la línea de lo mencionado anteriormente, los recursos finitos también cumplen un rol muy importante dentro de la problemática alimentaria. A modo de comparación, en 1970 había 0,38 hectáreas de superficie agrícola útil disponible por cada habitante, mientras que en 2050 se estiman que serán tan solo 0,15 hectáreas por habitante. Esto significa que generar alimento para toda la población mundial será sumamente desafiante.

Por último, la escasez de agua dulce será uno de los problemas más severos al que se enfrentará la sociedad. Se dice que las guerras o enfrentamientos serán por la superficie agrícola útil y por el agua,

no por el petróleo ni por un posicionamiento geopolítico. El origen de esta crisis es que se están gestionando de manera incorrecta los recursos hídricos.

Por estos motivos es que hoy en día se buscan nuevas alternativas a la producción de alimentos ricos en proteína que participen de procesos más amigables con el medio ambiente, como son los productos *plant-based*, con las famosas hamburguesas de la compañía *Beyond Meat* que lograron entrar al mercado alimentario generando un gran impacto. La producción de estos alimentos requiere menor cantidad de agua, de tierra y de energía que las vías tradicionales de generación de proteína según afirma la empresa (13). A su vez se están estudiando nuevas vías de producción masiva de carne creada en el laboratorio. De más está decir, que los cambios tecnológicos conllevan ciertas consideraciones éticas y morales, pero es importante la rápida adaptación a estos cambios. La carne producida en el laboratorio contendrá fibras musculares, tejido conjuntivo, grasa, pero no hueso. Es un producto distinto, pero de la misma familia, una proteína de origen animal. Se pretende mezclar la misma con grasa animal sintética o ingredientes como la sal, jugo de remolacha, colorante, hierro, entre otros.

Inevitablemente una vez que salga al mercado, el producto va a ser demandado y lo lógico es que el sector cárnico lidere esta oportunidad porque es quien tiene el conocimiento del mercado cárnico. Se estima que su relación calidad-precio sea muy competitiva con la de la carne tradicional. Cabe destacar que dicho consumo será una decisión de cada uno, cada persona decidirá si quiere comer carne animal de granja o carne sintética. No sustituirá a la carne natural, pero si la complementará y la superará cuantitativamente logrando abastecer a una mayor porción de la población mundial (14).

1.2.4. Impacto en la sociedad

Además de los desafíos éticos y de aceptación del consumidor que presenta la potencial industria de carne sintética, existen aspectos sociales, políticos e institucionales que juegan un rol muy importante dentro de este nuevo proceso de producción. Variadas narrativas a favor de la carne sintética han enfatizado la capacidad de estos nuevos alimentos de superar los impactos negativos asociados con la producción ganadera convencional. De todas maneras, es necesaria una evaluación continua de los impactos que puedan surgir a partir de la carne sintética, tanto positivos como negativos, y cómo estos pueden contribuir o reconfigurar las economías políticas ya existentes en el sistema alimentario mundial (15).

1.2.5. Ventajas y desventajas

Como todo producto innovador, la carne sintética ha traído una serie de debates y discusiones acerca de su forma de producción, su textura, su sabor, y su impacto en el ambiente y en la salud.

Las personas que están a favor de la carne producida en el laboratorio, sostienen que la misma es un producto innovador que revoluciona la cadena de producción alimenticia y supone mejorar la dieta y la salud de la población.

Por otro lado, también fomenta los valores de cuidado del planeta y la recuperación del ecosistema.

Su forma de producción ayuda a mitigar varios de los efectos nocivos de la ganadería intensiva y extensiva. Su rol sería principalmente el de disminuir el sacrificio de los animales y la cantidad de tierra destinada para la producción ganadera.

Cabe destacar que la carne producida en el laboratorio ayudaría a reducir entre el 15 y el 20% las emisiones de gases de efecto invernadero, minimizando el consumo de agua utilizada en la producción de alimentos y evitando la deforestación de grandes terrenos.

Por otro lado, las aguas subterráneas dejarían de ser contaminadas con microorganismos parásitos y restos de fertilizantes y medicamentos administrados masivamente al ganado.

Con la producción de carne sintética, se disminuirían los riesgos de la inseguridad alimentaria advertidos por la FAO, para el año 2050 habrá más de 9000 millones de personas en el planeta lo que incrementa la demanda global de alimentos cárnicos.

A su vez, permite un mayor control sobre la cantidad de ácidos grasos, grasas saturadas, proteínas y micronutrientes como el hierro y por ende la reducción de riesgo de intoxicaciones o enfermedades asociadas al consumo de la carne tradicional.

Por último, para la producción de carne sintética se parte de una biopsia de tejido animal y ésta se logra aumentar hasta unas 500 veces en volumen.

Con respecto a las desventajas de la carne sintética, se podría decir que se excluyen un significativo número de vitaminas y micro-minerales presentes en el animal.

Para la elaboración de la carne, haría falta un 98% menos de personal en comparación con el sistema de producción tradicional. Esto haría desaparecer múltiples negocios ganaderos.

Algo a destacar, es que este tipo de productos implican altos costos tanto del proceso de investigación como de producción.

De más está decir, que aún no hay garantías de que sea un producto saludable para el consumo humano ya que no se ha consumido de manera masiva por un largo periodo de tiempo.

Los retos de la producción de carne sintética son, por un lado, reducir los costos a tal punto de que sean competitivos con los de la carne tradicional. Por otro lado, la apariencia y el sabor. Aunque las pruebas de la carne sintética han resultado en características similares a la de la carne tradicional, aún no se ha logrado igualarla.

Por último, no menos importante, está la aceptación de los consumidores. Es sumamente importante la habilidad y tecnología empleada por los investigadores. Estos tienen la responsabilidad de quitar la idea de que todo lo creado en laboratorio es “malo” (16).

1.2.6. Ética

Hasta el momento, el impacto mayor que ha tenido esta nueva metodología de producción de carne a nivel social ha sido la ética y la aceptación del consumidor. Estos siguen siendo desafíos importantes que requieren seguimiento.

La evidencia científica indica que el consumo cárnico ha formado parte importante de la psicología humana y el comportamiento poblacional (17). Por este motivo, no es conveniente quitar el producto

del mercado, sino buscar alternativas de producción que hagan de este más amigable con el ambiente y tenga un mayor alcance.

La reducción de la mortalidad animal y de la cantidad de animales requeridos es la razón moralmente más destacada para apoyar la investigación y producción de carne sintética.

De todas formas, cualquier desarrollo tecnológico se encontrará con objeciones. Existen ciertas preocupaciones éticas sobre la producción de carne sintética. El aumento del canibalismo al aumentar la escala de producción cárnica, además se podrá producir una dependencia de las personas hacia las tecnologías y las grandes industrias, aun no se sabe los efectos que podrá provocar en la salud de las personas, por último, la producción de carne sintética posee un elevado costo de producción. Si bien estas son relevantes, ninguna es suficiente para fundamentar una oposición al desarrollo de este producto. Los aspectos positivos de este tipo de producción se destacan frente a sus objeciones éticas, siendo estos la disminución del sacrificio animal, de la contaminación y la posibilidad de una disminución de costos. Estos factores son lo suficientemente significativos como para demostrar que se debe apoyar a la investigación continua y producción de la carne sintética. De más está decir, que este producto podría coexistir con la producción de carne para reducir al máximo las prácticas industriales y otras prácticas agrícolas poco éticas (18).

Como se mencionó anteriormente, hoy en día existe la carne alternativa, elaborada en base a plantas. La comercialización de esta está siendo liderada por la empresa *beyond meat* y su sabor y textura se asemeja al de la carne producida de manera tradicional.

Otro tipo de carne sintética que se encuentra en fase de investigación, es la carne sintética creada a partir del cultivo de células madre que derivan en músculo o en tejido adiposo. Pudiendo luego generar productos procesados como hamburguesas o salchichas elaboradas a partir de fibras de tejido muscular que se generan tras el cultivo de células madre, o también se encuentra en fases de investigación la impresión 3D de cortes de carne partiendo también de células madre.

1.3. Generalidades de las células madre

Las células madre son las células no especializadas, que pueden diferenciarse en uno o varios tipos celulares de un organismo. Estas células existen tanto a nivel embrionario como en tejidos adultos.

Las células madre pueden clasificarse de diferentes maneras, una de ellas es según el nivel de potencialidad. Las células madre unipotentes van a derivar en un solo tipo celular como es el caso de las células madre satélite. Las células madre pluripotentes pueden derivar en más de un tipo celular como las células madre mesenquimales. También se encuentran las células que derivan a varios tipos celulares pudiendo generar un órgano en su totalidad a partir de una única célula madre, estas se llaman células madre multipotentes. Y por último se encuentran las células madre totipotentes que pueden diferenciarse a todos los tipos celulares del organismo, como el caso de un cigoto (19) (20).

1.3.1. Células madre satélite

Las células madre satélite (SC) son células que se ubican en el músculo y participan en el proceso de crecimiento y regeneración muscular. Las mismas se encuentran naturalmente inactivas hasta que se envía una señal de activación del entorno local para que posteriormente estas participen en la auto renovación y miogénesis. Las SC inactivas expresan el factor transcripcional Pax7. Luego de una señal de activación, las células se logran activar mediante el control transcripcional regulatorio Pax3/Pax7, los cuales conducen una cascada de activación y proliferación induciendo la expresión de factores transcripcionales específicos del músculo. Por otro lado, cabe mencionar que el proceso de diferenciación de las SC se asocia con una disminución en los niveles de Pax7 (21).

Debido a lo mencionado anteriormente, se podría decir, que las SC son la principal fuente de progenie miogénica en el músculo adulto ya que una vez que las células satélites se cultivan y proliferan, las células resultantes se denominan progenie miogénica.

Las células satélites se pueden visualizar mediante microscopía electrónica y óptica. En particular, la expresión específica del factor de transcripción de Pax7 mediante el uso de un anticuerpo para la inmunodetección de esta proteína permite identificar las células en su conformación nativa en una variedad de especies (22).

1.3.2. Aplicaciones de células madre

Las células madre están en la mira de muchos investigadores de diferentes áreas de la ciencia. Por un lado, están teniendo un gran papel en lo que son los avances de la medicina (23). Por otro lado, las células madre también están siendo protagonistas de una nueva alternativa de producción de alimentos, donde se busca desarrollar carne u otros productos que se componen de materia prima animal a partir de las mismas.

La aplicación de estas es muy amplia y puede responder a varias problemáticas de la actualidad, es por esto que conocerlas, lograr extraerlas y diferenciarlas se vuelve cada vez más atractivo.

1.3.3. Cultivo de células madre

1.3.3.1. Cultivo primario

Las células que forman un cultivo primario son células de mamíferos que se extraen directamente de tejidos animales. Estas se procesan en condiciones de cultivo optimizadas con el fin de lograr simular el estado *in vivo*. Se utilizan frecuentemente para estudiar la fisiología y bioquímica de las células (metabolismo, viabilidad, señalización, etc) así como también los efectos de los fármacos y compuestos tóxicos en las mismas. Las células primarias tienen una vida útil limitada y tienen un número de división celular limitado, así como también pueden ser difíciles de cultivar manteniendo su esterilidad (24).

Estas células se diferencian de las líneas celulares ya que las últimas han adquirido la capacidad de proliferar indefinidamente ya sea a través de mutaciones aleatorias, así como también mediante

modificación deliberada. Lo cual se presenta a su vez como una desventaja, al alterar las propiedades fisiológicas de las células dejando de representar el estado *in vivo* de las mismas, dependiendo de las mutaciones involucradas.

1.3.3.2 Extracción y aislamiento de las células madre satélite

El cultivo de las SC comienza luego de una disgregación mecánica y enzimática del tejido original. Se ha demostrado que las SC se adhieren al plástico de los recipientes de laboratorio, esto se volvió una característica de estas células que se puede observar luego de la disgregación del tejido.

La digestión enzimática es sumamente efectiva a la hora de aislar las células del tejido, de todas formas, también tiene el potencial de dañarlas. La enzima más utilizada para este fin debido a su capacidad de romper los enlaces de colágeno es la colagenasa. La concentración óptima de esta y el tiempo de incubación adecuado deben ser monitoreados con detenimiento durante el aislamiento.

Se observan diversos protocolos de aislamiento, proliferación y caracterización de SC. El más común se basa en la adherencia al plástico durante las primeras 72 horas del cultivo y el mismo se debe a la heterogénea población de células presentes en el cultivo. Como se mencionó anteriormente, las SC tienen la capacidad de expandirse ilimitadamente en cultivo manteniendo su potencial crecimiento y su plasticidad con una tasa de duplicación dependiente del tejido de origen y de la densidad inicial cultivada.

Para que las SC logren sobrevivir, proliferar y diferenciarse *in vitro*, el sistema de cultivo debe imitar las condiciones *in vivo* de las células en su tejido original. Las mismas se deben mantener en una estufa con 5% CO₂ para mantener el pH del medio y a la temperatura óptima de la especie de origen. El suero fetal bovino se utiliza en el medio de cultivo como fuente de factores de crecimiento y de nutrientes que potencian la proliferación y la adherencia al plástico de estas células.

Cabe destacar que en las instancias de investigación inicial se suele trabajar bajo el uso de antibióticos teniendo en cuenta el contexto del cultivo primario a partir de una muestra que no está estéril con el fin de proteger de cualquier tipo de contaminación y evitar que las células pueden estar expuestas. El antibiótico más utilizado es penicilina-estreptomicina (25).

1.3.4. Caracterización de células madre satélite

Existen numerosas estrategias de caracterización de las células madre.

En primer lugar, es importante lograr observar la adherencia al plástico por parte de estas células.

También se debe verificar que las mismas tengan morfología redondeada inicialmente y luego que empiezan a diferenciarse se puede observar una morfología fibroblastoide

A su vez se podría realizar una citometría de flujo o inmunofluorescencia. Se ha determinado el perfil inmunofenotípico en las SC derivadas de tejido muscular a través de señal fluorescente, esto permite visualizar y analizar la variación de los marcadores celulares durante el desarrollo del cultivo (26). La emisión fluorescente se da gracias al anticuerpo secundario IgG Alexa Fluor 488 policlonal. El mismo se une específicamente al anticuerpo monoclonal de ratón anti Pax 7. Luego de confirmar la presencia

de Pax7 en el núcleo de las células y complementar dicha información con la morfología celular se podría confirmar la presencia de células madre satélite.

Otra manera de verificar que las células obtenidas son células madre satélite es a través de la diferenciación de estas. A medida que pasan los días de cultivo, se puede notar una diferencia en cuanto a la morfología de estas células. De esta manera, se puede concluir que este cambio de morfología representa la diferenciación espontánea de dichas células.

Una alternativa a estas metodologías es el diseño de una PCR que permite amplificar marcadores específicos de las células satélites en estudio, en este caso bovinas. Para esto se debe conocer la secuencia codificante para los marcadores de los tejidos de los diferentes animales que pueden ser estudiados (27).

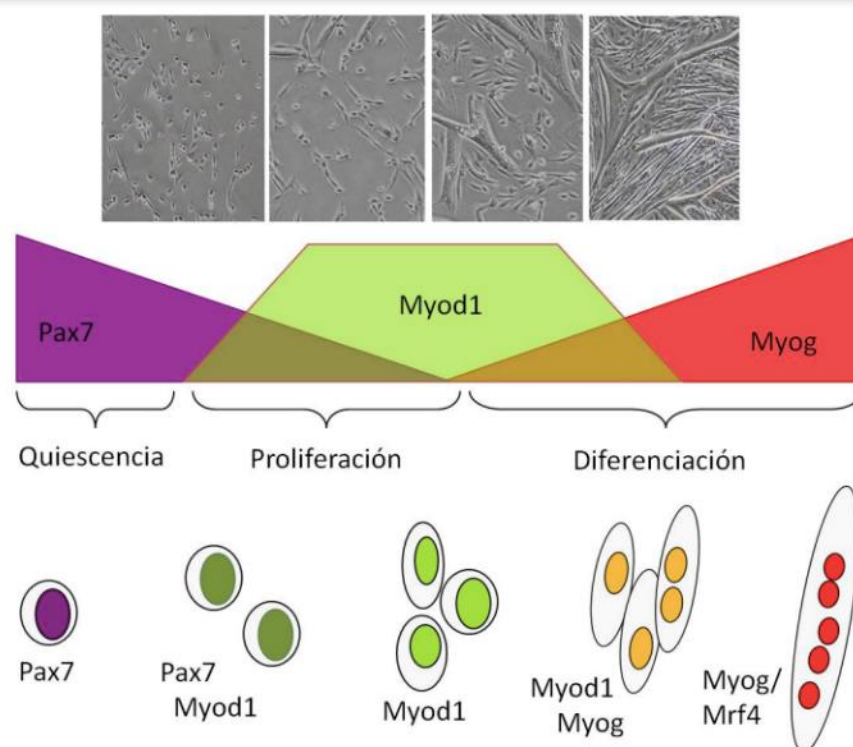


Figura 1: Cultivo de CMS en el correr de los días y la evolución en la expresión de los factores de transcripción en cada fase. Primeras etapas de expresión de Pax7 en células madre satélite de aspecto redondeado, luego se diferencian a mioblastos mediante el factor de diferenciación Myod resultando en miotubos tras la expresión de Myog. Imagen extraída del estudio realizado por Osta Pinzolas (28).

Como se puede observar en la Figura 1, los factores de transcripción más utilizados para la caracterización de CS son Pax7, Myod1 y Myog dependiendo del tiempo transcurrido del cultivo en estudio. Estas proteínas activan la transcripción y diferenciación de mioblastos en miotubos.

En primer lugar, al momento en que las células se encuentran en su estado nativo, se observa la presencia de Pax7. Luego a medida que estas células comienzan a proliferar, también se puede comenzar a identificar la expresión genómica de Myod1 a medida que la expresión de Pax 7 disminuye. Por último, en el momento de la diferenciación celular, los marcadores expresados mayoritariamente son Myod1, Myog y Mrf4, específicos de mioblastos (28).

1.4. De célula madre a carne sintética

A continuación, se puede ver un resumen extraído del artículo de *McKinsey* de los pasos involucrados en el proceso de producción de carne sintética.

Cultivated meat has the potential to replicate the taste, texture, smell, nutritional composition, and appearance of conventional meat.

Production process for cultivated meat

Cultivated meat is made by taking a small sample of animal cells and growing them in a controlled environment.

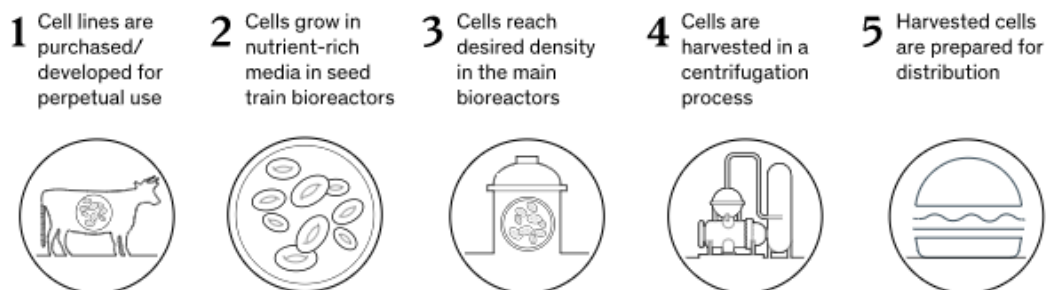


Figura 2: Pasos generales para la producción de carne sintética obtenido a partir del artículo elaborado por la consultora *McKinsey*

En primer lugar, se procede a la extracción de las células a partir del animal de origen. Se realiza una pequeña biopsia al animal en una zona determinada y se transportan las células extraídas en medio de cultivo adecuado para luego continuar el proceso de aislamiento en el laboratorio.

A continuación, se crecen las células en un medio de cultivo rico en nutrientes con el fin de adaptar las células al ambiente en que se encuentran y simular el entorno *in vivo*.

El crecimiento de las células se da en biorreactores y se efectúa hasta alcanzar la densidad celular deseada.

Luego las células son sometidas a una centrifugación para lograr obtener las células separándolas del medio de cultivo.

Por último, las células se preparan para su distribución mediante procesos que varían según el producto final deseado. Cabe destacar que se pueden agregar aditivos para contribuir con la textura, forma y con el sabor (29).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Extraer, aislar y caracterizar células madre satélites en el laboratorio de biotecnología de la Universidad ORT Uruguay para su posible utilidad como materia prima para la producción de carne sintética.

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- Evaluar diferentes opciones de toma de muestra para la extracción celular.
- Realizar ensayos a partir de diferentes tejidos musculares vacunos.
- Probar diferentes metodologías de extracción celular.
- Analizar el crecimiento y la viabilidad de las células madre satélite obtenidas.
- Caracterizar por diversos métodos el cultivo de manera de poder determinar la presencia/ausencia de CMS.
- Analizar el rendimiento celular de una extracción a partir de tejido bovino.

3. Materiales y métodos

El medio de cultivo DMEM (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) low Glucose utilizado, y el Suero Fetal Bovino (SFB) empleado para suplementarlo son de Capricorn Scientific.

Los filtros empleados se adquirieron de la empresa Greiner bio-one (Alemania). Mientras que el *Percoll*® y la colagenasa I son de la empresa Merck (Alemania).

Además, para el análisis de caracterización del cultivo se utilizaron dos anticuerpos obtenidos de antibodies-online Inc. (EUA). Los mismos son anticuerpo primario anti Pax7 de ratón y IgG Alexa Fluor 488 policlonal

El azul de tripán, al igual que la Tripsina-EDTA (0,05% Tripsina, 0,02% EDTA en PBS) y la solución de Penicilina-Estreptomicina (10.000 unidades/mL de Penicilina y 10mg/mL de Estreptomicina) pertenecen a la empresa Sigma-Aldrich (US).

En primer lugar, se prepararon los reactivos a ser utilizados ya sea el SFB, el PBS, el medio de cultivo y la colagenasa.

El medio de cultivo se preparó con DMEM, 10% SFB y 1% antibiótico penicilina-estreptomicina.

La colagenasa I se preparó a una concentración de 2 mg por mL. Se prepararon alícuotas de 4 mL y se conservaron en el freezer.

3.1. Toma de muestra de tejido muscular bovino

Se realizaron extracciones de diferentes orígenes: Carnicería, frigorífico y biopsia.

Carnicería: se obtuvo una muestra de la carnicería "Morengo Carnes" y otra muestra del mostrador del frigorífico Santa Clara.

Frigorífico: Se obtuvieron muestras de diferentes tejidos y se registró la información de raza y edad del animal.

Biopsia: Se realizó en colaboración con la Unidad académica salud de los rumiantes, Departamento de producción y salud de los sistemas productivos de la Facultad de veterinaria (UdelaR). Se asistió al campo experimental 2 ubicado en Libertad. Se usaron animales jóvenes que estaban destinados a otra investigación interna de la facultad de veterinaria de UdelaR. El veterinario PhD. Darío Caffarena realizó la biopsia de músculo semimembranoso. Se tomaron 3 muestras de aproximadamente 5 gramos de la parte trasera de tres animales. Se trabajó de acuerdo a las normas éticas para el manejo de animales de experimentación, dado que los animales estaban destinados a otros ensayos de la

Facultad de Veterinaria. Las muestras se depositaron en un tubo conteniendo medio de cultivo preparado anteriormente en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT.

3.2. Extracción y aislamiento de células madre bovinas

Luego de la toma de muestra, se deben extraer y aislar las células de interés ya que, al partir de un cultivo primario, se obtiene una población heterogénea de células

En primer lugar, las muestras de tejido fueron lavadas una vez con ETOH 70% y tres veces con PBS 1X.

Luego, se llevó a cabo la ruptura mecánica, es decir, se cortó el tejido con bisturí y pinza estéril. A continuación, se incubó el tejido con colagenasa I (0,1 mg/mL) por 1 hora a 37°C en baño termostarizado.

A continuación, se emplearon dos técnicas diferentes para aislar las células de interés. Por un lado, una centrifugación en gradiente de Percoll® y por otro lado filtración.

Para la primera opción, luego de ser filtradas a través de una gasa estéril, las muestras se sometieron a una centrifugación por gradiente tomando como referencia el ensayo realizado por *Miersch et al.* (30). Las concentraciones de Percoll® empleadas en este caso fueron: 25, 50 y 70%.

En primer lugar, se genera un stock de percol diluido en PBS al 10X y a partir del mismo se generan las diferentes concentraciones mencionadas anteriormente con PBS 1X. Luego se realizó una centrifugación de 30 minutos a 1752 g. Cabe destacar que se trabajó en todo momento en hielo.

Luego de la centrifugación, se tomaron las células de la interfaz 50-70% y se realizó un lavado con medio de cultivo. Las células fueron sembradas en placa de 6 pocillos conteniendo medio de cultivo.

Para la filtración, se trabajó con *cell strainers*, realizando dos filtraciones, primero a través de poros de 100 µm y luego de 40µm.

Por último, se realizaron tres lavados con medio de cultivo (DMEM, 10% SFB y 1% Antibiótico) centrifugando a 300 g por 5 minutos a 4°C. El *pellet* obtenido se resuspendió en medio de cultivo compuesto por DMEM bajo en glucosa, suplementado con 20% SFB y 1% antibiótico penicilina-estreptomicina. Por último, se incubó el cultivo en botellas T25 en estufa a 37°C 5% CO₂ en atmósfera húmeda.

3.3. Mantenimiento de células madre bovinas en cultivo

Las células cultivadas fueron controladas diariamente al microscopio y se realizó cambio de medio cada 2 días. Una vez alcanzada una confluencia cercana al 80%, se realizó subcultivo empleando Tripsina-EDTA. Para ello, en primer lugar, se procedió a quitar el medio de cultivo de las botellas y se lavó con PBS 1X. Luego se retiró el PBS y se añadieron

20µL por cm² de la 22 superficie de cultivo de tripsina-EDTA y se incubaron durante al menos 5 minutos en la estufa a 37°C, 5% CO₂. Pasado este tiempo se comprobó el estado de las células al microscopio, y una vez que se observó que se encontraban despegadas, rápidamente se neutralizó con 1 volumen

de medio (DMEM suplementado con 10% SFB) para evitar que estas se dañen. Se tomó una pequeña alícuota de la solución celular para realizar el conteo y evaluar a su vez la viabilidad del cultivo. Finalmente, la suspensión celular se transfirió a 2 botellas T25 para continuar la amplificación.

3.4 Evaluación de morfología celular

Tal y como se mencionó anteriormente, una de las metodologías de caracterización celular es a través de la visualización y seguimiento de la morfología.

En el caso de las CMS, es visible la diferencia en la morfología de las células antes y después de la diferenciación. Es por esto, que se realizó seguimiento y se obtuvieron fotos diarias de la visualización a través del microscopio con el fin de analizar el comportamiento de las células y evaluar si la morfología celular a medida que pasan los días coincide con la establecida por bibliografía.

3.5. Inmunofluorescencia para Pax7

La caracterización de las CMS se llevó a cabo evaluando el crecimiento en adherencia de las células y la inmunofluorescencia de las mismas al incubarlas con un anticuerpo específico (anti Pax 7).

En primer lugar, se procedió a la esterilización de los vidrios porta células exponiéndolos a luz UV por 30 minutos luego de ser lavados con ETOH 70%. Una vez esterilizados, se sembraron las células en los mismos dentro de una placa de 24 pocillos.

Luego del sembrado de las células, se realizó la fijación con PFA 4% durante 20 minutos a 4°C. El mismo se preparó trabajando en campana calentando a 60°C la solución de PBS 1X con PFA 4% para lograr la homogeneidad de la solución. Luego se agrega NaOH de a gotas hasta que se obtenga una solución transparente. Por último, se ajusta el volumen final con PBS 1X y se alícuota para conservarlo en freezer a -20°C.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos a T_{amb} . A continuación, se permeabilizaron las células con 200 uL de Tritón 0.3% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados rápidos con PBS 1X. Previa a la incubación con el anticuerpo primario, se bloquearon las células en 200 uL de BSA 5% a 1 hora en T.A. A algunos de los pocillos se les agregó HCl y a otros no. El HCl permite la detección nuclear celular, y debido a que Pax7 es una proteína nuclear, se esperaría detectarla bajo el tratamiento de HCl 2M. El mismo fue añadido previo al bloqueo de las células.

Se probaron 2 concentraciones de anticuerpo primario anti Pax7: 0,5 ug/mL y 1 ug/mL y se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos a T_{amb}

Por último, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario en BSA 5%. Anticuerpo secundario IgG Alexa Fluor 488 policlonal [1 mg/mL]_{stock}

Se probaron 2 diluciones de estos anticuerpos: 1:500 y 1:1500 y se realizaron los lavados correspondientes. Se incubaron 200 uL por 2 horas a T.A.

Con el fin de hacer un seguimiento diario de la expresión de la proteína Pax7 en el núcleo celular, se procedió a realizar el proceso de inmunofluorescencia mencionado anteriormente todos los días durante una semana. En una placa de 24 pocillos se sembraron las células sobre los vidrios estériles colocados previamente en cada pocillo.

Se probaron tres condiciones: Control de inespecificidad (solo AC secundario), control negativo (Sin ACs) y por último la muestra con anticuerpo primario y secundario.

Durante una semana, se fijaron las células pocillo por pocillo, día a día. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo del pocillo, luego se procedió al lavado con PBS (2 veces) y por último se incubaron las células con PFA 4% durante 20 minutos a 4°C. Luego de la incubación, se hizo un lavado con PBS 1X tres veces y se incubaron a TA.

Al finalizar la semana, se procedió a realizar la permeabilización, el bloqueo y la tinción de las células obtenidas en los 7 pocillos en estudio

3.6. Curva de crecimiento y viabilidad celular

Se sembraron las células en una placa de 24 pocillos trabajando bajo las mismas condiciones que en los ensayos anteriores.

Cada día, se despegaron 2 pocillos empleando Tripsina-EDTA y se realizó recuento en cámara de Neubauer mediante el método de exclusión con Azul de Tripán 0,5% en PBS y se analizó a su vez la viabilidad de los cultivos. El método empleado permite distinguir entre células vivas (refractivas) y muertas (azules) ya que éstas últimas presentan su membrana comprometida e incorporan el colorante.

Los valores obtenidos fueron utilizados en la siguiente ecuación para calcular la concentración celular:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de cél}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ de células vivas contadas} * 10.000 * \text{inversa de la dilución}}{\text{cantidad de cuadrantes contados}}$$

Para la viabilidad celular se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{viabilidad (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ de células vivas}}{n^{\circ} \text{ de células totales}} * 100$$

Por último, el sobrenadante de cultivo se almacenó a -20°C, previa centrifugación a 1200 rpm por 5 minutos.

3.7. Congelado de células

Para el congelado de las células, se retiró el medio de cultivo, se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se despegaron las mismas utilizando el reactivo tripsina-EDTA. Luego, se procedió al conteo de las células para conocer la cantidad y viabilidad de células a congelar en el criotubo. A continuación, se centrifugó la suspensión celular a 18928 g durante 5 minutos y se resuspendieron en 1 mL de medio de congelación compuesto por 90 % SFB y 10% DMSO. Por último, el criotubo se congeló a -80°C utilizando el *Mr.Frosty* que al contener isopropanol permite el congelado gradual de las células evitando dañarlas. Una vez alcanzada la temperatura deseada, los criotubos se conservan en nitrógeno.

3.8. Descongelado de células

El proceso de descongelado de células se basa en termostatar rápidamente los crioviales conteniendo 1 mL de células en un baño de agua a 37°C. Luego se procedió a añadir 1 mL de medio de cultivo correspondiente, previamente termostatizado a 37 °C y luego se transfirió la solución a un tubo cónico conteniendo 5mL de medio de cultivo a 37 °C. A continuación, se centrifugaron las células a 260 g durante 5 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL medio de cultivo suplementado con SFB y antibiótico. Se contaron las células en cámara de Neubauer utilizando azul de tripán y por último se llevó la suspensión celular a un volumen de medio de cultivo adecuado para plaquear y así incubarlas en la estufa a 37°C, 5%CO₂ (31).

Para ello se realizó un conteo celular diario por 12 días, sin cambio de medio, evaluando la morfología de las células.

3.9. Consumo de glucosa

Para determinar los niveles de glucosa, día a día se tomó el medio de cultivo de los pocillos y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos. Luego se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se congelaron los sobrenadantes a -20°C. Luego de transcurridos 12 días se procedió a realizar la cuantificación de glucosa utilizando un kit específico mediante un método enzimático-colorimétrico de glucosa oxidasa/peroxidasa.

La determinación del consumo celular de glucosa se realiza siguiendo el protocolo indicado por el kit "Glicemia enzimática AA" (Wiener Lab).

En primer lugar, se preparó la curva estándar, tal como lo indica el inserto del kit, con concentraciones de glucosa de entre 0 y 600 µg/µL . Luego se procedió a la preparación de las muestras. Para esto, se tuvo en cuenta que las muestras de cultivos celulares deben mantener la linealidad de la curva hasta la concentración de 500 µm/mL. Para ello se realizaron diluciones 1/10 con agua destilada y se procedió a pipetear en placa de 96 pocillos 10 µL de cada uno de los estándares por duplicado y cada una de las muestras a testear.

Luego se agregaron 100 μL de reactivo A por pozo, se mezcló evitando la generación de burbujas y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Se leyó la absorbancia a 450nm en un lector de placa y se graficó absorbancia en función de concentración de glucosa.

4. Resultados y discusión

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, la producción de carne actual posee ciertas desventajas como son el impacto ambiental que la misma genera, la demanda creciente y la desigualdad en el consumo cárnico. Actualmente existen alternativas a la carne consumibles por la población mundial en base a vegetales. En Uruguay, la producción de carne es muy importante en términos económicos, disponer de la opción de cultivos celulares capaces de producir carne sintética obtenidas a partir de estas especies vacunas brindan un nuevo mercado para continuar bien posicionados y ofrecer nuevos productos.

La principal ventaja de este modelo es la productividad a gran escala de proteína, ya que partiendo de una biopsia se pueden obtener toneladas de carne (12). Sumado a esto, otra gran ventaja que posee este nuevo modelo de producción de carne es la disminución en la superficie productiva y en el sacrificio animal. Además, con este modelo se evitan las emisiones de GEI asociadas al ganado, en especial en el sistema *feedlot*.

Para lograr la producción de carne sintética, las empresas deben de contar con la principal materia prima que son las células madre bovinas. Debido a esto, se propone aislarlas para luego comercializarlas y proveer a las empresas de estas para facilitar a las mismas en cuanto a la producción.

4.1. Extracción de células madre satélites

Las células madre satélite son células no diferenciadas procedentes del músculo. Su origen es lo que causa gran interés dentro del negocio de la carne sintética ya que las mismas se diferencian de manera espontánea en mioblastos.

4.1.1. Evaluación de extracción a partir de muestras de diferentes orígenes

Se realizaron extracciones de diferentes orígenes: Carnicería, frigorífico y biopsia.

La metodología más utilizada según bibliografía para la extracción de células madre animales es la biopsia en animales machos jóvenes, ya que en esta etapa hay mayor presencia de estas células y se encuentran en una etapa de ciclo replicativo más acelerada. Esto se debe a la tensión muscular que presenta el animal vivo (32).

Debido a la complejidad para la obtención de muestras de biopsia, se evaluaron otras fuentes para la toma de muestra de tejido muscular bovino. Estos tejidos no se procesan en condiciones de esterilidad, por lo que el riesgo de contaminación de los cultivos celulares es alto. Además, la obtención de células viables en tejidos obtenidos luego de la faena del animal puede ser variable. En la Tabla 1, se visualizó el % de contaminación de los cultivos celulares a partir de las diferentes muestras, en las muestras de

biopsia, el 67% se contaminó, en el caso de frigorífico el 10% de las botellas obtenidas resultaron contaminadas y en las muestras de carnicería el 100%. En cuanto a la viabilidad celular se podría decir que las tomas de muestra realizadas a partir de carnicería no tuvieron éxito ya que el % de viabilidad es de 0. Por otro lado, las tomas de muestras realizadas en frigoríficos presentaron una alta viabilidad celular, contando con un 90%. Esto también se debe a que fue el evento de extracción más repetido. Por último, en el caso de la biopsia realizada, de 3 muestras solamente una resultó viable durante 40 días. Esto abarca un 33% de viabilidad. Cabe destacar, que el % de viabilidad hace referencia a la viabilidad de las células durante 40 días. Ya que dentro de ese rango las mismas o se congelaron o se procedieron a teñir para ser observadas bajo microscopio de epifluorescencia.

Tabla 1: Expresa el éxito obtenido a partir de las extracciones realizadas a partir de los 3 orígenes diferentes de muestras.

	Cantidad de extracciones	% de contaminación	% de viabilidad
Biopsia	1	67	33
Frigorífico	4	10	90
Carnicería	2	100	0

Como se puede observar en la tabla 1, el mayor número de eventos de extracción se ha llevado a cabo en distintos frigoríficos. Esto se dio debido a que los resultados han demostrado ser prometedores en comparación con los obtenidos a partir de muestras de carnicería, considerando la viabilidad celular y la esterilidad de los cultivos. Por otro lado, la coordinación de la biopsia no fue para nada sencilla, por lo que se accedió solamente una vez a este tipo de extracción. En suma, el tiempo dedicado a la hora de realizar la biopsia es mucho mayor que el dedicado para la extracción en los frigoríficos por lo cual también resultó siendo una ventaja para esta metodología.

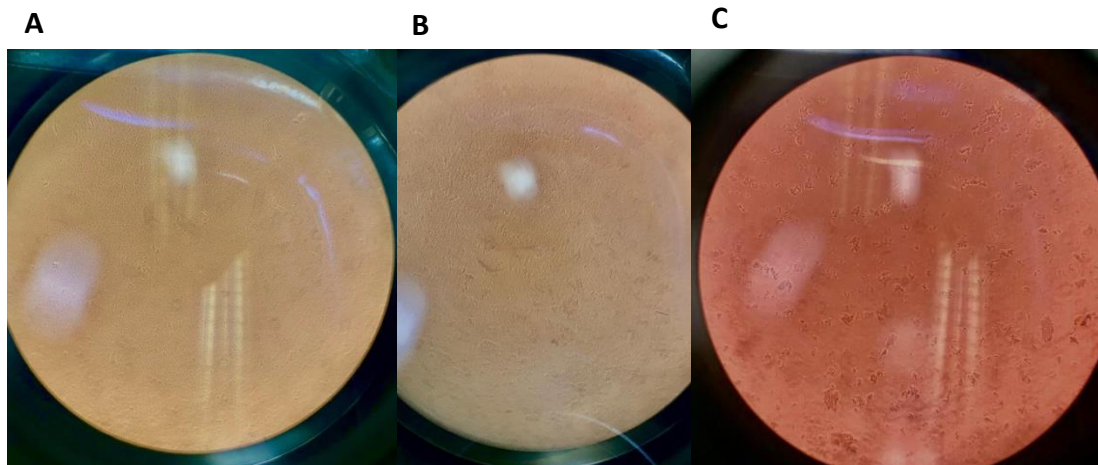


Figura 3: Microscopía Óptica 100X que representa la morfología de cultivos de células bovinas extraídas de un corte de cuadril obtenido de carnicería. Las imágenes A,B y C representan los cultivos a los días 2,6 y 9 respectivamente. Se visualiza un aumento en las partículas contaminantes a medida que pasan los días hasta llegar a la imagen C, donde la placa fue descartada.

En la Figura 3 se pueden observar las fotos tomadas en el transcurso del cultivo realizado a partir de la primera extracción celular. Como primer ensayo se decidió partir de carne de carnicería para afinar la manipulación y comenzar a poner a punto el protocolo, para luego experimentar con carne extraída del animal *in vivo*.

Se puede observar que desde el día 2 se logró identificar una contaminación por bacterias. La misma se logró identificar debido a su morfología de “bacilos” alargados. Se decidió proseguir con el ensayo para luego confirmar si efectivamente se trataba de contaminación o si eran residuos de la ruptura mecánica que no habían sido extraídos en la centrifugación por gradiente. Esto se puede confirmar en las imágenes de los días 6 y 9 ya que no se observan las células redondas y brillantes tal y como se describen en bibliografía, sino que se observan células de morfología alargada y más pequeña y al noveno día se distingue turbidez en el medio de cultivo lo cual también es característico de la contaminación bacteriana (33).

En la segunda instancia de extracción a partir de carne de carnicería las muestras se vieron nuevamente contaminadas. En esta ocasión se trabajó con 2 cortes de carne diferentes, los cuales tenían aproximadamente 72hs de faenados, los mismos se obtuvieron de la sección de venta al público del Frigorífico Santa Clara.

Teniendo en cuenta que todos los pocillos o botellas que se obtuvieron de extracciones de carne de carnicería se vieron contaminados, se puede concluir que la cantidad de CMS presentes en el tejido luego de la faena disminuyen con el transcurso de los días, esto lleva a que predomine el crecimiento de otras células que no son las de interés. A su vez, la carne obtenida de carnicería cuenta con más días desde la faena (aproximadamente 3) en comparación con las tomas de muestra *in-vivo* o a partir de frigoríficos. Esto resulta en una disminución en la viabilidad celular viéndose reflejado en los resultados de la Tabla 1.

Por otro lado, se encuentran las extracciones realizadas partiendo de muestras de Frigorífico. En esta instancia se contactó con el Frigorífico Sirsil S.A, Frigorífico Inaler S.A. - Marfrig Group y Frigorífico Las Moras. En total se accedió a 4 instancias de toma de muestra en frigoríficos.

Las principales ventajas de partir de muestras de frigorífico son además de conocer exactamente el músculo utilizado, la trazabilidad del origen de la muestra, la edad, la raza y el tiempo transcurrido desde el momento de la muerte del animal.

En todos los casos de procesamiento de muestras se obtuvieron cultivos libres de contaminación con los que se pudo trabajar y posteriormente proceder al análisis de las células cultivadas para conocer más sobre el resultado de la extracción.

En la Figura 4 se pueden ver los resultados de una extracción representativa y su evolución a lo largo de los días.

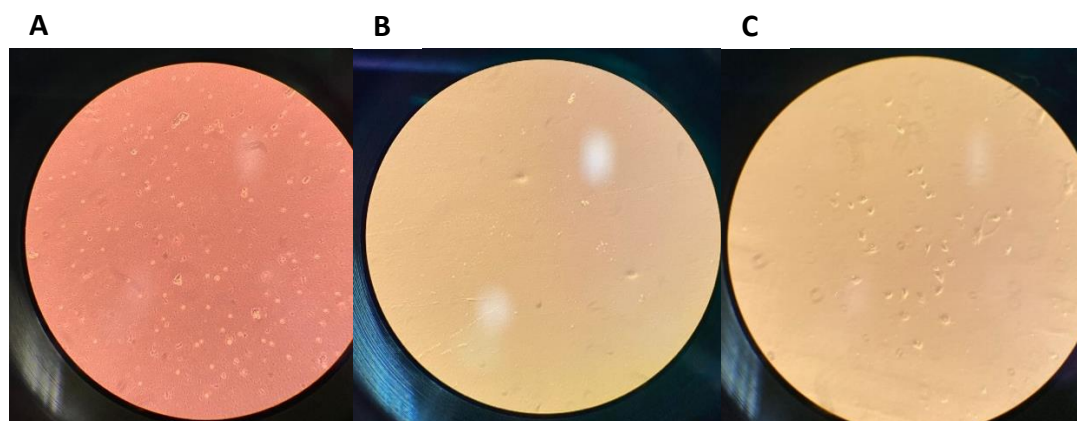


Figura 4: Microscopía 100X que representa la morfología de cultivos de células bovinas provenientes de entraña vacuna (Frigorífico Sirsil). Las imágenes A, B y C representan los cultivos a los días 1,5 y 10 respectivamente. Se visualizan células que van variando su morfología con el transcurso de los días de cultivo.

Por último, se encuentran la toma de muestra realizada *in vivo*, metodología de referencia según bibliografía. Se estableció contacto con la Dra. Cecilia Cajarville De la Facultad de Veterinaria, quién facilitó la asistencia al campo experimental para la extracción muscular *in vivo* del animal. El Veterinario Darío Caffarena muy amablemente realizó una biopsia a tres terneros del tejido semimembranoso, el cual según bibliografía posee alta cantidad de células madre satélites y nos permitió asistir al procedimiento (Figura 1) (32).



Figura 5: Sutura del corte realizado por el Vet. Darío Caffarena al animal en la parte posterior de la pata para la extracción de un trozo de tejido muscular de 1cm x 1cm aproximadamente.

Como se comentó anteriormente, una de las ventajas de este sistema de producción cárnica planteada es la disminución en el sacrificio animal. En la Figura 5 se puede observar el pequeño corte realizado al animal y cabe destacar que a partir de ese corte se logra producir una cantidad significativa de carne vacuna. El animal fue tratado con anestesia para no sentir dolor y luego de realizado el corte por una semana se le realizó seguimiento y se le suministró antibiótico de manera preventiva.

A continuación, se pueden observar las microscopías realizadas de las células extraídas.

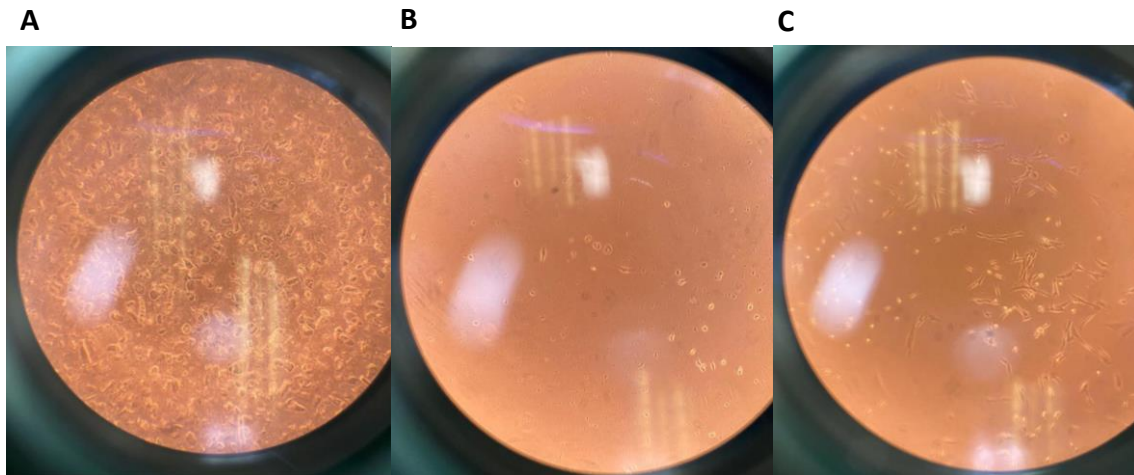


Figura 6: Microscopía óptica 100X que representa la morfología de cultivos de células bovinas provenientes de la biopsia *in vivo* realizada con la FVet. Las imágenes A, B y C representan los cultivos a los días 1,3 y 8 respectivamente. Siendo (A) las células del día 1, presenciándose una gran cantidad de restos celulares. (B) las células del día 3, redondeadas y (C) se puede ver mayor cantidad de células al día 8 de cultivo y de morfología alargada.

En esta instancia se obtuvo con éxito un cultivo celular que pasados los días tomó aspecto fibroblastoide y se comportó de manera esperada, tal como se presenta en el estudio realizado por *Danoviz et al.* (21).

Al comparar la Figura 6 en el día 8 y la imagen 4 en el día 10 se puede notar que la extracción realizada *in vivo* parece presentar un mayor rendimiento, ya que se ve una mayor cantidad de células y a su vez un aumento en la tasa de diferenciación celular en un menor lapso de tiempo. A su vez se trabajó con diferentes músculos para la extracción, lo que puede diferir en la cantidad de células satélites iniciales, como se muestra en el estudio realizado por *Kwang-Hwan Choi et al.* donde extraen células madre satélites de diferentes tejidos de porcinos y muestran que el músculo semimembranoso posee una alta cantidad de las mismas (32). Estos dos resultados son comparables ya que las condiciones de trabajo fueron similares, tanto el tamaño de muestra de partida como el protocolo empleado.

Si bien los días requeridos para alcanzar entre un 90 y 100% de confluencia en el cultivo obtenido a partir de la muestra provenientes de la FVet fue menor a los días requeridos para las extracciones realizadas a partir de muestras de frigorífico, este ensayo se realizó de manera única, por lo que no se podría determinar si una extracción de tejido de un animal *in vivo* es realmente más exitosa que la de un animal recién faenado.

De todas maneras, si se puede afirmar que las extracciones a partir de animales en pie requieren un mayor esfuerzo ya que demandan del cuidado del animal a posteriori, además del tiempo y estrés que este proceso puede generarle al animal, por lo que para este ensayo se prefirió el trabajo bajo muestras de frigorífico siendo estas las más estudiadas.

4.2. Evaluación de dos metodologías de aislamiento celular: filtración y centrifugación en gradiente de *Percoll*®.

A la hora de diseñar el protocolo inicial a seguir en este ensayo se identificaron diferentes metodologías de aislamiento para las CM, dentro de las cuales se encuentran la centrifugación zonal y el uso de filtros de 40 y 100 μm .

La centrifugación zonal se basa en el agregado de la muestra problema sobre un gradiente de densidades, formado en este caso gracias a una solución conteniendo partículas de sílica (*Percoll*®), que luego de una centrifugación permiten la separación de las partículas dependiendo de su masa (34).

Para separar las células de interés de los restos de tejido y de otras células de diferentes tamaños, se formaron 3 densidades distintas de *Percoll*®, 25, 50 y 70%, esperando que las células de interés se encuentren en la interfaz del 50 y 70% (30). Luego de realizar la disgregación mecánica y enzimática del tejido, la suspensión celular se sembró en el gradiente y se centrifugó a X g con partida lenta y sin freno. La muestra no pudo penetrar el gradiente y separarse según las diferentes densidades.

Para comprobar que el gradiente se estaba formando correctamente se realizó una prueba con 2 líneas celulares de diferente tamaño y morfología (*GNFS60* y *A549*)



Figura 7: Separación de 2 líneas celulares mediante una centrifugación en gradiente con *Percoll*®

Como se muestra en la Figura 7, las dos líneas celulares se lograron separar con éxito, se puede visualizar cómo se logra la separación en función de la densidad de las partículas en la solución. En este caso se distinguen 2 anillos, uno no logra casi penetrar el *Percoll*® y el otro en la interfaz del gradiente 40% - 80%. Las células se recuperaron del gradiente y se volvieron a cultivar en botellas para evaluar la viabilidad luego del proceso. Se controlaron diariamente en el microscopio evidenciando crecimiento celular.

Se realizó una nueva prueba con una muestra de cuadril obtenida del Frigorífico Inaler S.A. - *Marfrig Group*, siguiendo las mismas condiciones experimentales realizadas con las líneas celulares. Se sembró la muestra en diferentes volúmenes (para disminuir la densidad celular). Como se puede ver

en la Figura 8 la suspensión celular no logró penetrar el *Percoll*® en ninguna de las dos condiciones evaluadas.

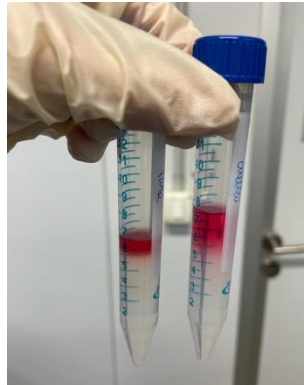


Figura 8: Prueba de centrifugación zonal con muestras previamente digeridas del frigorífico de la cadena Marfrig.

Para futuros ensayos, es importante evaluar la idea de resuspender las células en PBS previamente para disminuir la viscosidad.

Para el método de filtración se utilizaron *cell* strainers, una vez finalizada la incubación con colagenasa I, se filtró con el filtro de tamaño de poro de 100 μm y luego con el de 40 μm . Luego de la filtración, se obtuvieron células que fueron sembradas en botellas T25 o en alguno de los casos en placas (para realizar ensayos de viabilidad, presencia de Pax7 y evaluación del consumo de glucosa)

4.3. Evaluación de la extracción y aislamiento celular dependiente del músculo de partida

Se han evaluado los resultados obtenidos a partir de distintos tejidos musculares en los múltiples casos de extracción y se han visto algunas diferencias en cuanto al rendimiento celular que En el caso de la extracción realizada con muestra proveniente del Frigorífico Marfrig se ha trabajado con tejido muscular obtenido del cuello bovino y células del posterior de la pata.

A continuación, se puede observar la morfología de las células en el transcurso de los días.

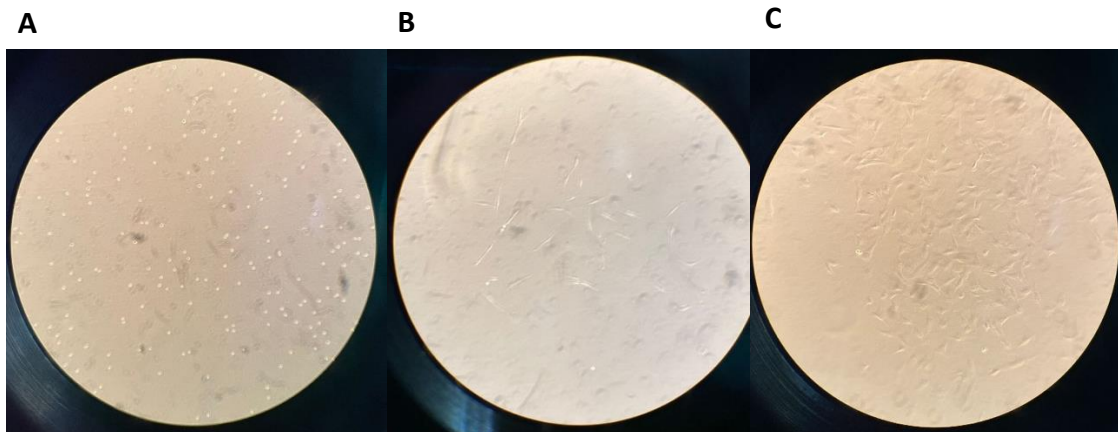


Figura 9: Microscopía óptica 100X que representa la morfología de cultivos de células bovinas proveniente del posterior del animal. Las imágenes A, B y C representan los cultivos a los días 3, 7 y 14 días respectivamente. En la imagen (A) se observa una gran cantidad de células redondeadas y brillantes. En la imagen (B) se observa el comienzo de cambio en la morfología celular. En la imagen (C) se visualizan las células de morfología alargada con una confluencia que ronda el 60%.

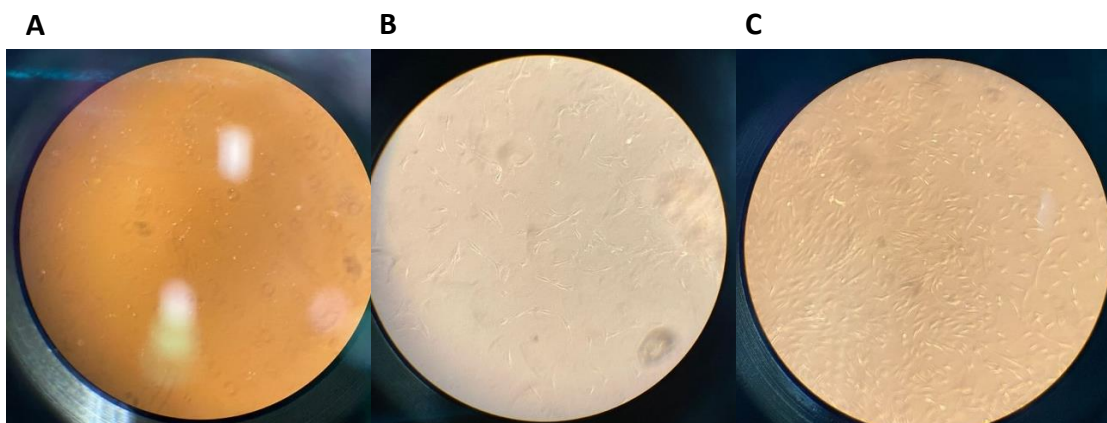


Figura 10: Microscopía que representa la morfología de cultivos de células bovinas proveniente del cuello del animal. Las imágenes A, B y C representan los cultivos a los días 5, 10 y 14 días respectivamente. En la imagen (A) se observan células redondeadas y brillantes. En la imagen (B) se observa un 40% de confluencia de células de morfología alargada. En la imagen (C) se visualizan las células de morfología alargada con una confluencia que ronda el 90%.

En las Figuras 9 y 10 se puede observar la morfología tanto de las células provenientes del posterior bovino como las provenientes del cuello del animal. En ambos casos se logró el aislamiento de las células con morfología fibroblastoide por lo que la extracción en esta primera instancia de cultivo ha resultado exitosa.

Cabe destacar que en el caso de las células extraídas del cuello bovino se logra ver una mayor confluencia en comparación con aquellas provenientes del posterior. Esto podría significar una mayor concentración de células satélite en la zona del cuello por lo que podría ser un músculo de interés para futuros ensayos de esta índole. Al tener un acceso limitado a los frigoríficos y al no poder optar el músculo a trabajar en la mayoría de

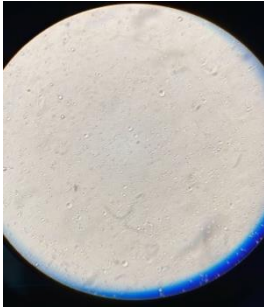

los casos, no se ha podido repetir el ensayo con tejido proveniente del cuello para confirmar esta tendencia.



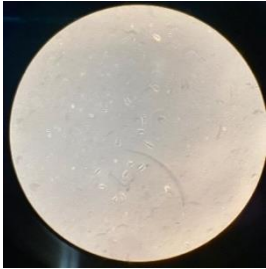

4.4. Caracterización del cultivo celular



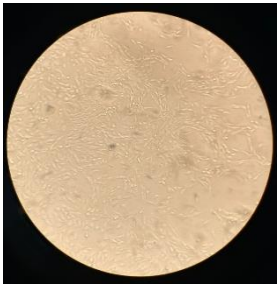
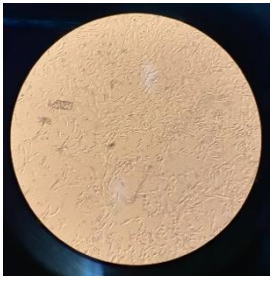
4.4.1. Morfología y adherencia

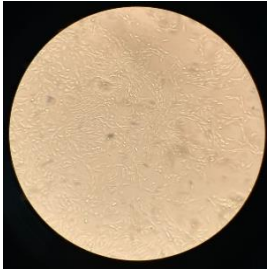
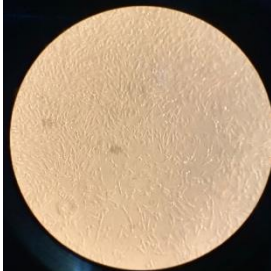
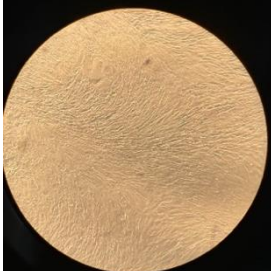
Con el fin de analizar la morfología celular, se procedió a observar las células diariamente durante 20 días. De esta manera se pudo observar el proceso en el cambio de morfología de las células en cultivo y se evaluó la confluencia y viabilidad celular.

Tabla 2: Imágenes de los pocillos utilizados para el ensayo de viabilidad con su cantidad de células y la evolución día a día.

Día	Morfología	N° células /mL
1		180.000
2		400.000

3		460.000
6		1.030.000
7		1.280.000
8		1.210.000

9		2.080.000
10		1.750.000
13		2.050.000
14		2.365.000

15		3.120.000
16		2.900.000
20		3.820.000

Al visualizar la tabla x se logra ver la evolución en la morfología y cuantificación celular a lo largo del tiempo.

En cuanto a la morfología celular, en los primeros pocillos se pueden ver restos de tejidos que al realizar los lavados con PBS se van removiendo, logrando obtener un cultivo homogéneo. A su vez, en los primeros días se pueden observar células pequeñas, redondeadas y brillantes que luego del día 6 comienzan a cambiar su morfología. Esta diferencia representa el evento de diferenciación espontánea celular que deriva a la formación de mioblastos los cuales se representan mediante una morfología fibroblastoide.

4.4.2. Inmunofluorescencia Pax7

Tal y como se mencionó anteriormente, la familia de genes Pax corresponde a los factores de transcripción nucleares compuesta por nueve componentes, los cuales se activan durante la embriogénesis con el fin de regular la diferenciación celular. Dicho conjunto de genes se encuentra presente en las células satélite cultivadas (35).

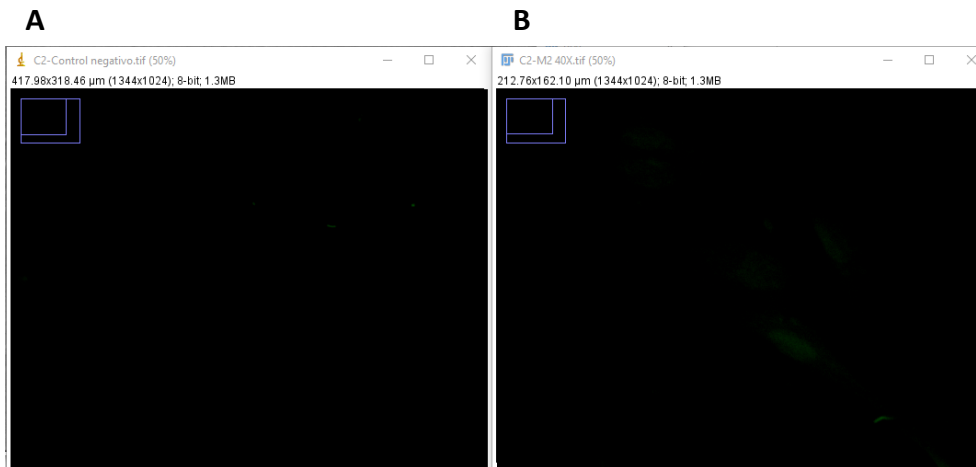


Figura 11: Microscopía de epifluorescencia. (A) representa la morfología conteniendo el control negativo (conteniendo únicamente anticuerpo secundario). (B) representa la morfología conteniendo las células provenientes de la biopsia con la FVet. Se setea la configuración para el control negativo y se mantiene la misma configuración para el análisis de la muestra de manera de evitar la presencia de fluorescencia inespecífica.

Para analizar las imágenes obtenidas a partir de la microscopía de epifluorescencia realizada en el Instituto *Pasteur* del Uruguay, se utiliza el programa *ImageJ*. Es importante a la hora de verificar la presencia o ausencia de Pax7 en las células en estudio, setear la configuración del programa para evitar el análisis de falsos positivos.

Para el estudio de la presencia de Pax7 en las células, se utilizaron controles negativos para evaluar si se observa fluorescencia nativa de las células. Por otro lado, se realizaron controles donde se incubó únicamente con el anticuerpo secundario con el fin de evaluar la adherencia inespecífica del mismo y así asegurar que las señales analizadas en las muestras de interés no correspondan a un falso positivo. En la Figura 11 se distingue una diferencia en la emisión de color verde en el canal FITC, correspondiente a la fluorescencia del anticuerpo secundario IgG Alexa Fluor 488 policlonal. El mismo se une específicamente al anticuerpo monoclonal de ratón anti Pax 7 con los cuales se realizó la tinción de las células en cuestión. A su vez se puede reconocer una emisión con más intensidad en los núcleos. Esto es de esperarse teniendo en cuenta que la proteína Pax 7 es de expresión nuclear, y se encuentra en grandes concentraciones en el núcleo de las CS durante el estado de quiescencia y en menor cantidad en el estado de proliferación de estas como se muestra en la Figura 12

Teniendo en cuenta que la proteína se expresa en el núcleo, se procedió a tratar las células con HCl de manera de facilitar el acceso del anticuerpo al núcleo y así interactuar con la proteína Pax7.

A continuación, se presentan las imágenes correspondientes a la microscopía de epifluorescencia observándose las células obtenidas a partir de las muestras del Frigorífico Sirsil.

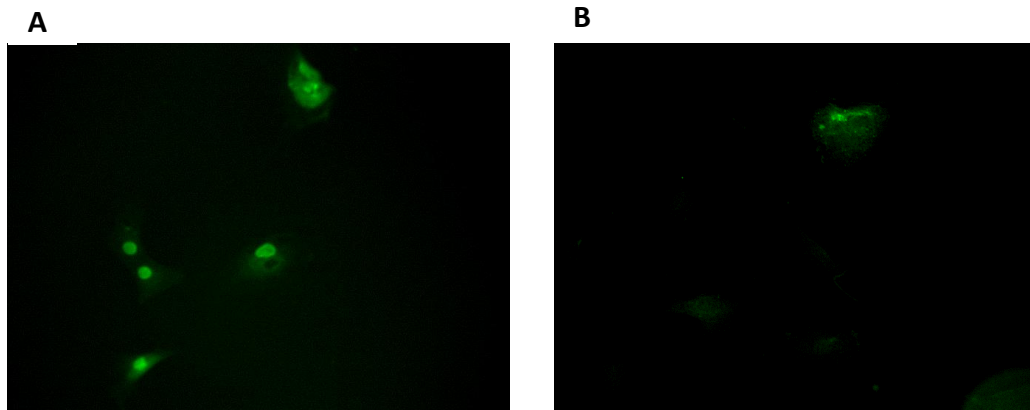


Figura 12: Microscopía de epifluorescencia. (A) representa la morfología conteniendo las células tratadas con HCl provenientes de muestras obtenidas en el Frigorífico Sirsil. (B) representa la morfología conteniendo las células sin tratar con HCl provenientes de muestras obtenidas en el Frigorífico Sirsil

Con respecto al tratamiento de las células con HCl, se logra confirmar la interacción exitosa del anticuerpo con la proteína nuclear Pax7. Si se compara la imagen A con la imagen B de la Figura 12, se observa que el anticuerpo logra penetrar mejor el núcleo celular distinguiéndose una mayor emisión en esta organela que en el resto de la célula, es por esto que, para las siguientes tinciones se decidió trabajar con el agregado de HCl.

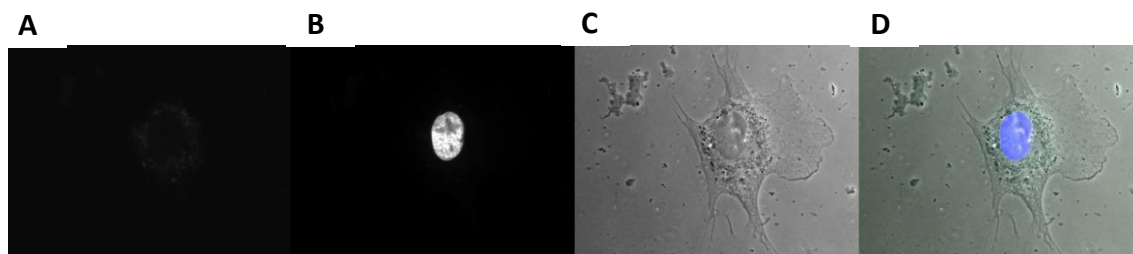


Figura 13: Representación de microscopía de epifluorescencia. (A) representa el canal de FITC. (B) representa el canal de DAPI. (C) representa el canal de campo claro y (D) representa el conjunto de todos los canales.

Una vez que se comprobó la presencia de Pax7 en las células y una vez realizada la puesta a punto del protocolo de tinción celular, se realizó un ensayo de evaluación día a día de la expresión de esta proteína. Esto permite evaluar la disminución en la presencia de esta proteína a lo largo de los días tal y como se indica en bibliografía, sabiendo que al darse la diferenciación espontánea de estas células, la expresión de esta proteína disminuye aumentando la expresión de otros factores tales como Myod y Myog.

En cuanto a los resultados obtenidos, no se ha logrado obtener la emisión de fluorescencia esperada debido a posibles errores en la manipulación durante la tinción.

En la Figura 13, se pueden ver las imágenes obtenidas a partir de la visualización de la muestra tomada el día 6.

Las cuatro imágenes representan los distintos canales configurados en el programa. En el canal 2 se puede ver claramente la presencia del DAPI, por lo cual damos por sentado que dicho reactivo no se vio afectado y por lo tanto se logró la tinción del núcleo con éxito. Por otro lado, en el canal 3 se debería ver la presencia de la emisión de la interacción del anticuerpo con Pax 7, pero de lo contrario, no se visualiza dicha emisión. Esto podría deberse a fallas en alguno de los pasos de incubación del anticuerpo, teniendo en cuenta que en otras instancias de tinción, si se logró ver la emisión esperada.

4.5. Ensayo de evaluación de crecimiento y viabilidad celular

Se realizó una curva de crecimiento celular durante 20 días en donde se analizó la viabilidad, la cantidad de células, la morfología celular y el consumo de glucosa.

Para este experimento se trabajó en placas de 24 pocillos con 500uL por pocillo. Se realizaron cambios del medio de cultivo cada 2 días, realizando en los primeros días lavados con PBS 1X con 1% de antibiótico de manera de eliminar restos de tejido de la extracción.

Se realizó un conteo diario con azul de tripán en cámara de Neubauer, una vez alcanzada una confluencia del 100% se dio por finalizado el experimento.

En la Figura 14 se visualizan la curva de crecimiento y viabilidad celular. Con respecto al número de células que se obtuvo, se observó un comportamiento exponencial obteniendo una densidad celular máxima de $3,82 \times 10^6$ cel/mL. en el día 20. Se observó un 100 %de confluencia en el pocillo a partir del día 20.

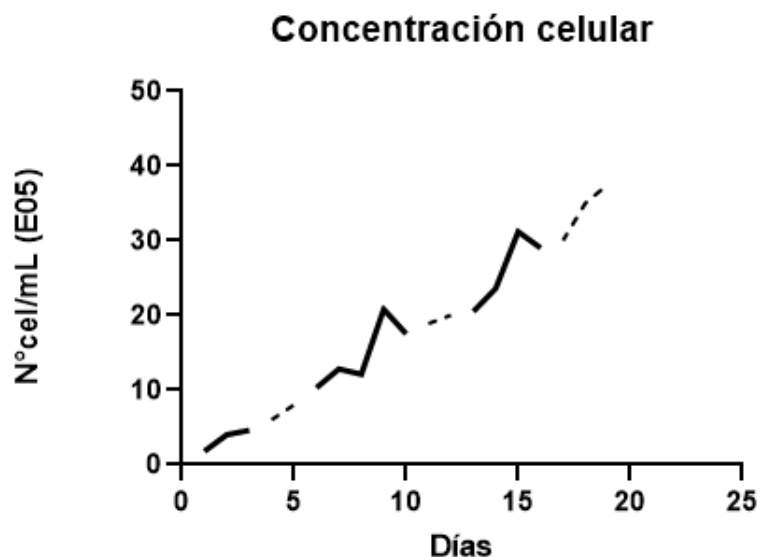


Figura 14: Gráfico representando el crecimiento celular pasados los 20 días de cultivo. Se observa el aumento de células por mL, teniendo en cuenta que los días 4, 5, 11, 12, 17, 18 y 19 no se realizó conteo ya que fueron días sábado y domingo y las instalaciones de la Universidad ORT Uruguay permanecen cerradas.

En cuanto a la viabilidad, se mantuvo superior al 80% en todos los días evaluados. Considerando la gráfica de la Figura 15, se puede notar una disminución en la viabilidad celular en los primeros días de cultivo. Esto se podría corresponder a la presencia de la colagenasa y de extractos de cultivo primario. Luego, se mantiene superior a 90% entre los días 7 y 20.

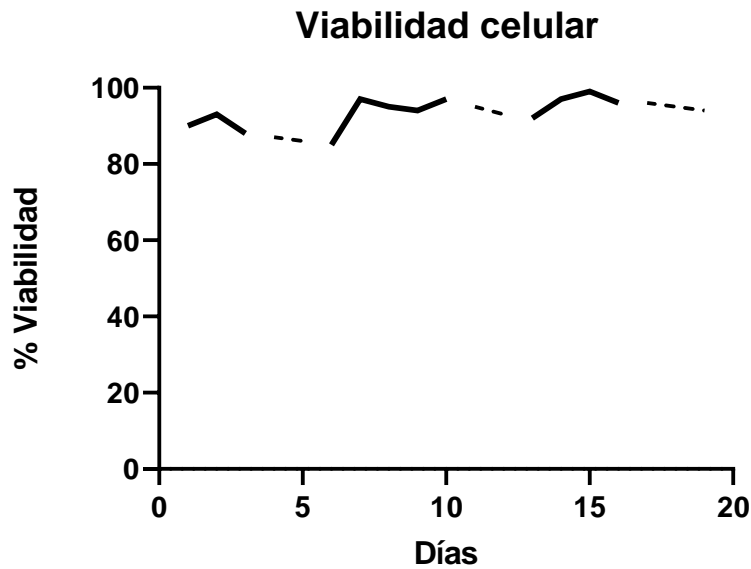


Figura 15: Gráfico representando la viabilidad celular pasados los 20 días de cultivo, siempre se encuentra por arriba del 80%. Los días 4, 5, 11, 12, 17, 18 y 19 no se realizó conteo ya que fueron días sábado y domingo y las instalaciones de la Universidad ORT Uruguay permanecen cerradas

Estos resultados son muy interesantes ya que se traducen en el potencial de crecimiento que estas células presentan como materia prima para la producción de carne sintética.

4.6. Rendimiento celular de una extracción a partir de tejido bovino

De manera de analizar el rendimiento celular a partir de la extracción y aislamiento de CMS bovinas, se toma en cuenta la cantidad de muestra inicial y el número de células obtenidas.

Tabla 3: Representación del rendimiento celular

Cantidad de tejido de partida	Volumen de medio de cultivo	Día de cultivo	Número de células en placa
(1x1 cm)	10,5 mL	15	$(2,9 \times 10^6 \times 21 \text{ pocillos}) = 6,1 \times 10^7$

Tal y como se indica en la tabla 3, a partir de una muestra cárnica de 1x1 cm, se obtiene un número de células de $6,1 \times 10^7$ células. Se sembraron las células durante 15 días en 21 pocillos (placa de 24 pocillos) y en cada pocillo se obtuvieron $2,9 \times 10^6$ células.

Por otro lado, se analizó la estabilidad del cultivo con el correr de los pasajes, tanto en morfología y como en viabilidad. En este proyecto se estimó un máximo de 7 pasajes por extracción, lo que permitiría amplificar considerablemente los cultivos obtenidos. En la Tabla 4, se pueden observar los valores de recuento y viabilidad celular obtenidos en cada pasaje.

Tabla 4: Recuento y viabilidad celular al momento de realizar los repiques de las células provenientes de la muestra obtenida en el Frigorífico Las Moras.

Pasaje botella extracción frigorífico Las Moras	Número de células al momento de hacer el pasaje (cel/mL)	Viabilidad
1	28.330.000	97%
2	30.400.000	94%
3	32.600.000	95%
4	21.500.000	89%
5	30.600.000	92%
6	31.200.000	93%
7	40.200.000	92%
8	21.800.000	71%

Como se puede ver en la tabla 4, las células satélites presentan una alta viabilidad hasta el pasaje 7, ya que luego de dicho pasaje la viabilidad cae por debajo del 80%.

Conocer el rendimiento de las extracciones de carne analizadas bajo el protocolo diseñado en este proyecto es de suma importancia para poder proyectar la potencial capacidad de producción de las células de interés y así poder proyectar el mercado involucrado y analizar la posibilidad de entrar al mismo.

4.7. Consumo celular de glucosa

Con el fin de determinar el perfil metabólico celular a medida que pasan los días, se procedió al descongelado de un vial de células provenientes de la toma de muestra realizada en el frigorífico Sirsil y la realización del ensayo de glucosa utilizando un kit comercial.

Las células fueron sembradas en placa de 48 pocillos y se cosechó el sobrenadante diariamente durante 14 días.

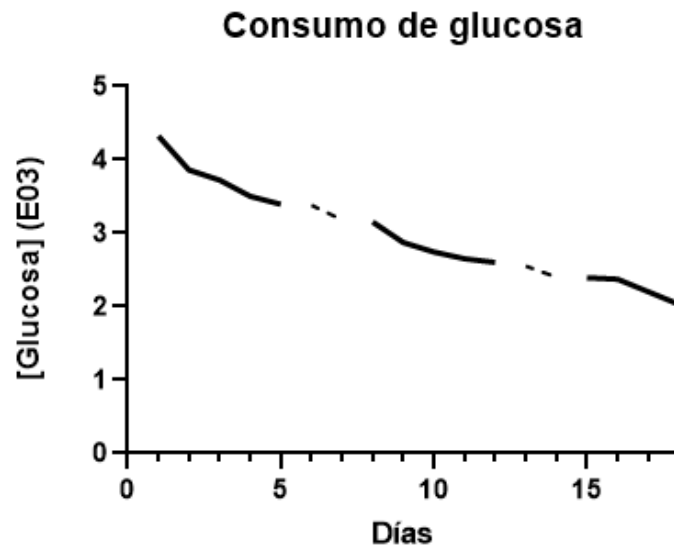


Figura 16: Grafica de consumo de glucosa diario en placa de 48 pocillos luego del descongelado de un vial de la extracción del frigorífico Sirsil.

Como se puede observar en la Figura 16, la concentración de glucosa bajó progresivamente a medida que pasaron los días. Esto a su vez, se ve relacionado con la disminución en la viabilidad celular (ver Figura 17). A medida que se consume la glucosa en el medio de cultivo, la mortalidad celular aumenta. Esto se puede confirmar mediante el estudio realizado por *Naito et al.* en donde estudian el efecto de la Inhibición glucolítica por resveratrol (RSV) para evitar la mortalidad celular por falta de glucosa en el medio (36).

Cabe destacar, que las células fueron congeladas luego de 40 días de cultivo. Las mismas fueron sometidas a 2 pasajes. Se podría decir, según lo observado en el comportamiento de estas células, que las mismas al ser congeladas ya habían sido diferenciadas a mioblastos. Por este motivo, al descongelarlas, se realiza el ensayo de glucosa sobre las células diferenciadas.

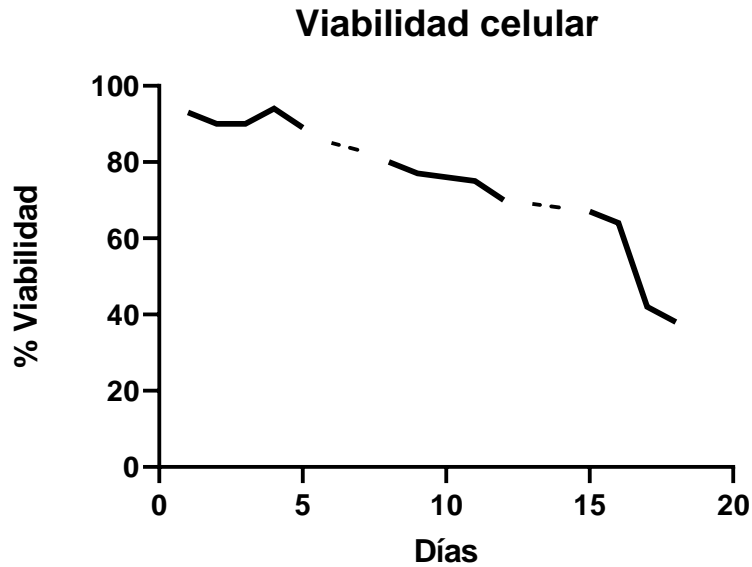


Figura 17: Grafica de viabilidad celular calculada diariamente de células sembradas en placa de 48 pocillos luego del descongelado de un vial de la extracción del frigorífico Sirsil.

Es importante tener en cuenta que la viabilidad celular se ve afectada a medida que pasan los días no solo por la disminución en la concentración de glucosa, sino también por el consumo de otros nutrientes del medio de cultivo. A su vez, el cambio de pH en el medio también resultó ser un factor que se vio afectado ya que se pudo observar un cambio en el color del medio de cultivo hacia el amarillo al pasar los días indicando la acidificación del mismo. Este cambio se notó principalmente luego del día 10 del cultivo. Si se observa la Figura 17 se observa que luego del día 10 la caída en la viabilidad se ve más acentuada, por lo que la acidificación del medio influyó directamente en el desempeño del cultivo.

5. Plan de negocios

5.1. Introducción

Se estima que la población aumentará hasta 9.700 Millones para el 2050, lo que dificultará la accesibilidad de alimentos. En 2019 alrededor de 690 Millones de personas padecieron hambre crónica según el *Global Hunger Index*. Estos datos aumentarán drásticamente con el aumento de la población mundial si no se buscan alternativas de producción y distribución de alimentos.

Para evitar el aumento de la malnutrición en los siguientes años, se deben tomar medidas que permitan el acceso a legumbres, frutas y vegetales, pero también productos lácteos y cárnicos.

La producción de carne, principalmente la cría intensiva de ganado vacuno, va de la mano con grandes producciones de gases de efecto invernadero, grandes niveles de consumo de agua y de su contaminación, como también de deforestación.

Esto no permite que otras disciplinas como la agricultura se expandan, limitando la superficie destinada a la producción de vegetales, frutas y legumbres.

Es por esto que se están desarrollando nuevas técnicas de producción de alimentos. Como es la carne sintética.

El presente proyecto se ha elaborado a fin de responder a la necesidad de desarrollo de nuevas fuentes de alimento, atacando a su vez a la problemática del impacto ambiental que conllevan las prácticas tradicionales. Con respecto a la contaminación, los datos afirman que hoy en día la producción de carne tiene un gran impacto ambiental a nivel mundial. El 8% del agua potable es utilizada para la producción de carne y lana, el 18% de los gases de efecto invernadero provienen de la industria ganadera, y el 33% de las tierras cultivadas son destinadas a la alimentación ganadera.

Si bien en Uruguay la ganadería no afecta severamente a la contaminación ambiental, debido a sus prácticas no intensivas, en otros países desarrollados sí, ya que no hay pasturas suficientes para la cantidad de ganado que habita. En Uruguay, el 90% de la producción ganadera se basa en pasturas naturales. No se deforesta para colocar ganado. Pero en países como Estados Unidos, o sin ir tan lejos, Paraguay las prácticas ganaderas tienen grandes emisiones de gases de efecto invernadero, gran consumo de agua y a su vez descuidan de manera más grave el bienestar animal.

Dicho proyecto propone crear una base operativa que garantice la mejora en las acciones de producción de carne sobre todo para aquellos países en los que la ganadería es intensiva.

5.2. Análisis FODA



Figura 21: Análisis FODA. Representación de las fortalezas, debilidades, oportunidades y amenazas del proyecto en cuestión.

El análisis FODA es una técnica que permite identificar las fortalezas, las debilidades, las oportunidades y amenazas, tal como indica la sigla.

- Fortalezas:
Dentro de esta categoría encontramos que sería un producto único, amigable con el medio ambiente que posee una tecnología de vanguardia ya que no hay productos similares a este en el mercado y que es fácilmente escalable.
- Oportunidades:
Este producto es nuevo en el mercado, así como también estimula a generar una mayor conciencia ambiental debido a los factores mencionados anteriormente.
Al ser un producto que se almacena a bajas temperaturas y su vida útil bajo estas condiciones es muy prolongada, el producto puede ser comercializado a diferentes regiones, sobre todo a los mercados protagonistas en el desarrollo de nuevos productos, como Estados Unidos, Europa o Japón. El desarrollo y avance de las tecnologías involucradas permitirá la baja de precios y optimización de procesos, volviéndolo cada vez más interesante.
- Debilidades:
Actualmente no hay regulaciones por parte de los entes regulatorios de mayor renombre, como lo es la FDA. Al haber falta de experiencia en el mercado, la venta de este producto no será de carácter inmediato.
- Amenazas:
Al ser un producto con elementos nuevos, esto puede generar cierto rechazo por parte del público consumidor. El mercado de las células madre satélite para la producción de carne sintética depende directamente de la aceptación de este producto en la sociedad.

La siguiente barrera luego de la aceptación del público es la de la competencia. Teniendo en cuenta el alto número de *start-ups* involucradas en la producción de carne sintética, es de esperarse el aumento de las empresas encargadas de proveerles a estas la materia prima necesaria para llevar a cabo la producción a gran escala.

5.3. Validación del plan de negocios

A modo de comprender la necesidad en el mercado de un nuevo producto como es la carne sintética, se plantea una validación donde se evalúa el problema, el cliente y la solución.

Para esto, se realizaron investigaciones de escritorio, con el fin de estudiar la situación actual a nivel mundial de los desarrollos que involucran la producción de carne sintética. Por otro lado, se realizaron encuestas para conocer la opinión de los potenciales consumidores finales de este producto.

Para que la comercialización de las células satélite tenga éxito dentro del mercado, es necesario corroborar la aceptación de la carne sintética y su necesidad dentro del mercado.

Tabla 5: Validación del plan de negocios

	Hipótesis	Objetivo de validación	Ejercicio de validación	Métrica o indicador de éxito
Del problema	Teniendo en cuenta el aumento de la población para el 2030 y por ende el crecimiento en la demanda cárnica, se estima que no se podrá abastecer el consumo de proteína de origen animal.	Confirmar la problemática y evaluar las características de la misma para poder generar una solución valiosa	Investigación de escritorio.	> 30 fuentes confiables bibliográficas que afirmen la necesidad de desarrollo de nueva fuente proteína a gran escala.
Del cliente	Futuros consumidores de carne sintética	Evaluar si existe población de Uruguay que consuma carne y esté dispuesta a probar nuevos productos	Encuesta	> 20% personas encuestadas interesadas en consumir este tipo de alimento.
De solución	Producción de proteína de origen animal, que se	Evaluar el interés de los	Encuesta	> 20% personas encuestadas creen

	puede producir a gran escala sin impactar de forma negativa en el medioambiente y simulando el producto actualmente consumido.	consumidores activos de carne en probar carne sintética		que la producción de carne sintética podría llegar a ser una solución.
--	--	---	--	--

En primer lugar, fue necesario definir un parámetro que permita confirmar la existencia de una problemática a futuro con el crecimiento de la población mundial y la capacidad de generar alimento para abastecerla. Para ello se estableció un límite de 30 artículos científicos o publicaciones de alta fiabilidad, que aseguraran que es necesaria la búsqueda de nuevas tecnologías para la producción de alimento, como lo es la carne cultivada.

Es importante destacar que se logró cumplir con la métrica, encontrando dentro de los artículos de mayor impacto; *The future of food and agriculture: Trends and challenges*, de la FAO (37); *How to Sustainably Feed 10 Billion People by 2050* del *World Resources Institute* (38) y *Growing at a slower pace, world population is expected to reach 9.7 billion in 2050 and could peak at nearly 181 billion around 2100*, del departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas (39).

A su vez importantes protagonistas del mundo de la tecnología como William Henry Gates III, popularmente conocido como “Bill Gates” (desarrollador, inversor, autor y filántropo estadounidense) decidió invertir en el desarrollo de las tecnologías que permiten la producción de carne sintética, incentivando a muchos otros interesados a conocer sobre la temática en cuestión (40).

Con respecto a la validación del cliente, se ha realizado una encuesta donde respondieron 225 personas. Una de las preguntas de la encuesta es: ¿Consumirías carne sintética? y las as respuestas disponibles son: “Sí”, “No”, “Tal vez”. Era de esperarse que la respuesta más popular fuese la del “Tal vez” abarcando un 40,4 % como se puede ver reflejado en la Figura 18 dado el desconocimiento que hay hoy en día sobre este tipo de productos y la incertidumbre que esto genera.

Consumirías carne sintética?

225 responses

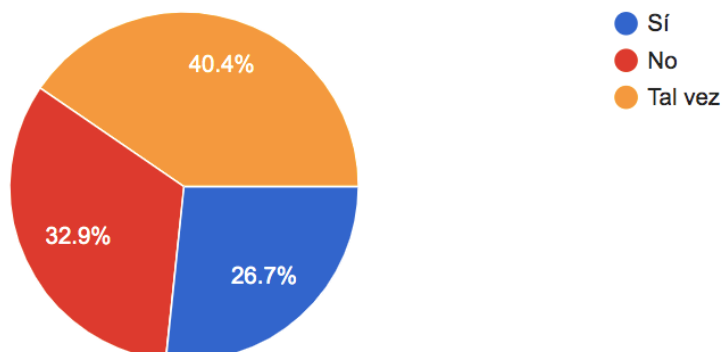


Figura 18: Resultados obtenidos de la encuesta realizada con el fin de validar la aprobación de este producto por parte de la población. El 26,7% de los encuestados afirman que estarían dispuestos a consumir carne sintética mientras que el 32,9% afirman que no lo harían. La mayoría con un 40,4% se presenta indeciso frente al consumo de este producto.

Con respecto al consumo de la carne sintética, el 27% de las personas respondieron que si la consumirían. Esto indica en primer lugar, el cumplimiento de la métrica de validación del cliente (>20%). En segundo lugar, es importante tener en cuenta que dicho producto es nuevo, no existe aún en el mercado y la mayoría de las personas lo desconocen (ver Figura 19). Por este motivo, y sumando que la encuesta fue dirigida a un segmento de la población uruguaya, se podría decir que el principal desafío que presenta este producto es la aprobación del mismo por parte de la población local. Uruguay, al ser un país agrícola-ganadero y el mayor porcentaje de sus exportaciones esta dirigido al sector ganadero, no presenta la necesidad de producir este producto. De todas formas, considerando este producto como un complemento a la ganadería tradicional para aquellos países que no posean de las tierras adecuadas para practicar la ganadería, sería una gran solución la producción de carne sintética. Por todo lo mencionado anteriormente, se concluye que un 26,7% de aprobación sumado a un 40,4% de "Tal vez" se consuma, resulta ser un valor sorpresivo y motivador para continuar por este camino de innovación y desarrollo.

Teniendo en cuenta la necesidad de nuevas fuentes de alimento, crees que la carne sintética es una buena alternativa?

225 respuestas

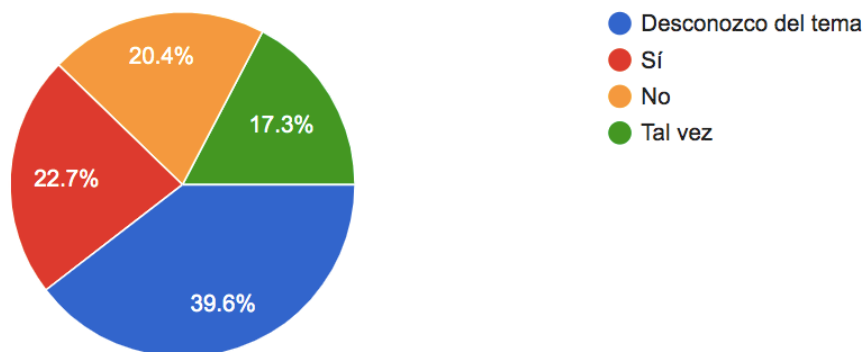


Figura 19: Resultados obtenidos de la encuesta realizada con el fin de validar la solución propuesta en este trabajo. El 39,6% de los encuestados afirman que desconocen el producto en cuestión. El 22,7% piensa que dicho producto solucionaría la problemática planteada mientras que el 20,4 opina lo contrario. Por último, el 17,3% de los encuestados no se sostienen con ninguna postura.

Según los datos que se ven reflejados en la Figura 19, se plantea la validación de la solución. El 39,6% de las personas encuestadas refieren a que desconocen el tema, por lo que no pueden confirmar si creen que es una buena solución o no. De todas formas, el 22,7% respondió que si cree que es una buena opción. Estos resultados son importantes para confirmar que se plantea una solución viable y efectiva para la problemática propuesta. De más está decir que para llevar a cabo la producción de carne sintética, es sumamente crítico invertir en publicidad y lograr comunicarles a las personas acerca del producto y su origen.

5.4. Marketing Mix

A continuación, se describen los cuatro elementos principales para abordar la estrategia de Marketing: producto, precio, publicidad y plaza.

5.4.1. Producto

Tabla 6: Especificaciones del producto a comercializar

Producto	Unidad	Cantidad
Células satélite diferenciadas	Vial congelado a -80°C	3 millones de células viables por vial

Se plantea la comercialización de células madre satélites diferenciadas, para la generación de un producto de alto valor nutricional, presentando como valor diferencial la genética del ganado vacuno uruguayo. El mismo será certificado por normas de calidad para que el mismo pueda ser

comercializado en el mercado internacional por empresas especializadas en la venta de alimentos de consumo masivo de alta tecnología.

5.4.2. Precio

Para la fijación del precio unitario de los viales a comercializar se toman en cuenta tanto los costos fijos y variables de producción y ventas como también el precio establecido en el mercado.

Al tratarse de un mercado en vías de desarrollo, se establece un precio menor al fijado por las empresas que ya se encuentran comercializando células satélites, siendo este un 20% inferior.

5.4.3. Publicidad

Teniendo en cuenta que en un inicio las ventas se plantean hacia el exterior, se identifica como una pieza fundamental la publicidad a través de los medios digitales. Para ello se plantea el desarrollo de una página web, donde se describa el producto, sus principales ventajas y la información necesaria para concretar una compra. Por otro lado, se enfatiza en la importancia de divulgación mediante redes sociales, de manera dirigida al público target.

Por último, los viajes al exterior y la generación de networking en los países de comercialización jugarán un rol fundamental dentro del posicionamiento del producto en el mercado.

5.4.4. Plaza

El canal de distribución escogido para este proyecto es de carácter directo, es decir, que se gestiona directamente mediante la interacción entre el fabricante y el consumidor final. Para esto se utiliza la página web desarrollada, ya que es un canal propio que abarca la estrategia de marketing online

5.5. Proyección del mercado

Al día de hoy existen empresas que están comenzando a ganar terreno en este mercado, como *EATJUST* que ya comercializa productos de carne de pollo producida de manera sintética, o *Future Meat* que espera para este año 2022 la aprobación de la *Food and Drug Administration* que permita el comienzo de la comercialización de sus productos de carne vacuna cultivada (41).

Según el análisis realizado en el año 2021 por la consultora estadounidense *McKinsey*, se estima que el mercado de la carne sintética alcanzará los 25 billones de dólares para el año 2030, requiriendo una producción anual de 1.5 millones de toneladas de carne cultivada. Para alcanzar esta producción se requieren Biorreactores con capacidad total de producción de entre 220 y 440 millones de litros. Cabe destacar que estas cantidades son aproximadamente 20 veces mayores que la capacidad que posee actualmente la industria farmacéutica (29).

Actualmente se registran alrededor de 100 empresas relacionadas a la producción de carne sintética según el *Good Food Institute*. Dichas empresas abarcan distintos focos tecnológicos. Desde el abastecimiento de los materiales de producción como son los medios de cultivo y diferenciación, como

también la generación de las líneas celulares o la diferenciación de las mismas, la optimización de los componentes y diseño del bioproceso, llegando a la carne como producto final.

Teniendo en cuenta el producto a desarrollar en el presente trabajo, se espera poder formar parte de la cadena de producción, desarrollando la línea celular para abastecer a las empresas que generan la carne sintética como producto final. [Ver Anexo 1]

Cabe destacar que cada vez son más las empresas interesadas en invertir en este nuevo modelo de producción de carne. En 2020 se registraron inversiones de 350 millones de dólares sumados a otros 250 millones de dólares en el 2021. Esto demuestra la necesidad de desarrollo de este nuevo producto y el interés comercial que abarca el mismo.

Uno de los factores que impulsa a los inversores a apostar por este producto innovador es el avance en las tecnologías que se ha logrado y que han permitido un gran descenso en el costo de producción en la última década, estimando que para el 2030 los precios de la carne sintética se asemejan a los de la carne tradicional según las estadísticas de la consultora *McKinsey*, con un costo de producción que ronda los 11 dólares por cada kilogramo de carne.

El descenso de los costos de producción en este rubro se debe al avance en las tecnologías empleadas que permiten cada vez más optimizar el proceso, lo mismo sucedió en otras áreas de la ciencia como por ejemplo en el caso de la secuenciación genómica, donde al iniciar los primeros estudios en el 2001 era insostenible el costo por cada ensayo, siendo este de 1 millón de dólares por secuenciación, lo que al 2021 disminuye a menos de 1000 dólares como se puede observar en la Figura 20.

Teniendo en cuenta estos registros y el comportamiento del costo de producción observado en la trayectoria de la carne sintética hasta el momento es que se espera que el precio en el mercado sea competitivo con el de otras fuentes de proteína.

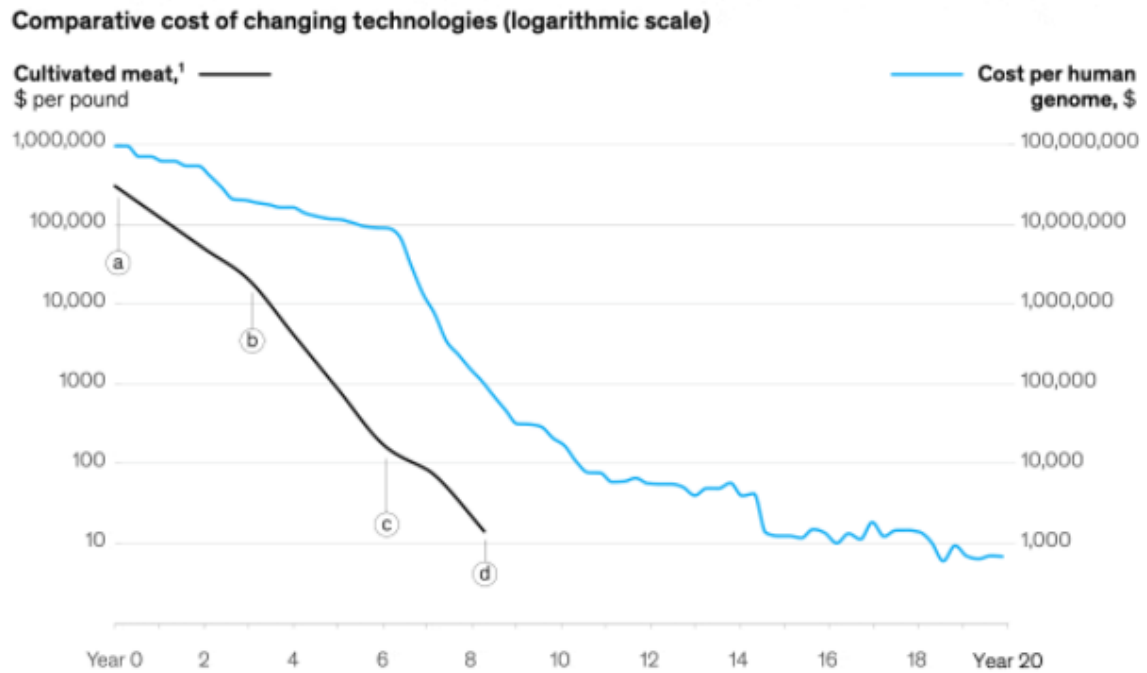


Figura 20: Comparación de la tendencia en los precios de la carne sintética y la secuenciación genómica desde los inicios de cada tecnología en el mercado hasta la actualidad.

5.6. Análisis financiero

Para el análisis financiero se realizó un flujo de caja proyectado a 10 años. Planteando para el mismo la inversión inicial requerida, los costos fijos y variables de manera anual.

El mismo arrojó una TIR de 30,2 % anual y una VAN de USD 135,049. A partir de estos valores, se concluye que es económicamente rentable durante el período considerado (10 años).

Se pueden observar los datos en el Anexo 2.

5.7. Estrategia de comercialización

Proyección de ganancia: 12.000.000 USD anual

Al esperar una ganancia anual de 12 millones de dólares, se esperaría que por mes la ganancia sea de 1 millón de dólares. Por este motivo, se plantea la venta de 3028 viales mensuales.

El precio del mercado de células madre indica que un vial de células puede venderse a un precio de hasta 500 USD aproximadamente. De todas formas, para este proyecto, se plantea la venta de los viales a 350 USD, buscando disminuir la competencia y generar un valor diferencial del producto. Es a partir de este valor que se estima que la venta de 3028 viales mensuales alcanzaría para llegar a la ganancia *target* considerando los gastos fijos y variables por mes.

Dicha cantidad de viales, corresponde al 0.33% del mercado a abastecer. Lo cual es un número razonable y realista para la comercialización de este producto en un mercado nuevo.

5.8. Mercado *target*

Como se mencionó anteriormente, hoy en día existen 100 *start-ups* encaminadas a producir carne sintética.

Estimando que se podría abarcar un 0,33% del mercado de la carne sintética. Se estima que los niveles de producción necesarios para cubrir la demanda rondan los 4.950 kg de carne mensual.

Los viales a ser comercializados contienen alrededor de 3 millones de células viables, adaptando la cantidad de viales a la necesidad de producción de las empresas, teniendo en cuenta un PDT de 45 horas aproximadamente. Además, la cantidad de pasajes realizables según los resultados obtenidos en este proyecto, deben ser como máximo 7 manteniendo una viabilidad mayor al 80%. Esto se ve respaldado por bibliografía donde se recomienda realizar menos de 9 pasajes en este tipo de células (42).

Para esto, se debería de partir de aproximadamente 1kg de carne para obtener una cantidad de células de $1,06E10$ adecuadas para lograr obtener el número de viales comercializables por mes (29).

Para este calculo, se utilizan las proyecciones de *McKinsey* que indica que 10.000 fibras musculares conforman 100 g de carne (equivalentes a una hamburguesa) y que una fibra está compuesta por 1,5 millones de células.

5.9. En qué momento hacer el procedimiento

En un principio se plantea coordinar con el negocio del frigorífico justo antes de hacer la faena para realizar las tomas de muestra. Luego de la fase de investigación, se procede a la implementación de un corral con ganado para la extracción de muestras.

5.10. Riesgos identificados

Actualmente la barrera principal se encuentra en el mercado ya que es un producto que se debe aceptar por parte de la población. A su vez, los gobiernos aún no han aprobado este producto a excepción de Singapur, quien aprobó el producto en el 2020.

En el caso de la Unión Europea, se plantea que estos productos se regulen bajo un marco regulatorio existente sin la necesidad de crear una nueva vía regulatoria, de todas formas, según el *Good Food Institute* ninguna empresa europea ha presentado el producto para su aprobación hasta el momento.

En cuanto a otras potencias, como son EE UU, Israel y Japón, se ha demostrado interés por parte de los gobiernos en dar acceso a este nuevo producto en el mercado y es probable que se presenten avances regulatorios en los próximos años.

Por último, países que se mantienen aún al margen como India y Brasil, se encuentran monitoreando la evolución de este producto innovador desde un punto externo con miras a avanzar en esta área (43).

Si bien nos referimos a un producto que no participa activamente en el mercado hoy día por falta de regulación, se sabe que para la exportación de productos de origen biológico en Uruguay se debe obtener certificados para Muestras Biológicas expedido por el Ministerio de Salud Pública (MSP) que se realiza a través del portal VUCE. Además, deberá contar con los certificados de calidad correspondientes a los países de exportación. Como la FDA para los Estados Unidos de América o la EFSA para los países de la Unión Europea.

6. Conclusiones y perspectivas a futuro

6.1. Conclusiones

A modo de conclusión, se podría decir que se logró extraer, aislar y caracterizar las células madre satélite en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay.

Se lograron obtener las células partiendo de distintas fuentes tales como frigorífico, carnicería y mediante una biopsia realizada al animal *in vivo*. Se compararon los resultados de cada caso y se descartó la toma de muestra proveniente de carnicería debido a la contaminación que se generó para ambos casos de experimentación, prefiriendo la toma de muestra a partir de frigorífico siendo que se evita la intervención de un animal vivo.

Con respecto a la evaluación de la extracción y aislamiento de células provenientes de distintos tejidos, se ha demostrado que tanto en cuadril, nalga, entraña, cuello y tejido semimembranoso se han obtenido células de interés. En el caso del cuello se logró identificar un aumento de la concentración celular en comparación con las células provenientes de la nalga bovina. Por este motivo, sería interesante comparar nuevamente todos los tejidos estudiados por triplicado y definir si el cuello es efectivamente la mejor opción para este tipo de ensayo.

Por otro lado, se ha concluido que el método más eficiente para el aislamiento de las células es la filtración. De todas formas, sería conveniente continuar probando el protocolo de aislamiento celular utilizando el reactivo *Percoll*®.

También se ha logrado confirmar la alta viabilidad que presentan estas células en cultivo a medida que pasan los días. Esto resulta ser una ventaja de estas frente a otros tipos celulares ya que se podría trabajar con las mismas durante un periodo largo de tiempo sin que las mismas disminuyan su viabilidad. Sumado a esto, también se comprobó el mantenimiento en la viabilidad celular luego de 7 pasajes, esto también resulta ventajoso ya que las células podrían resistir más tiempo y aumentan su interés comercial.

Con respecto a la caracterización celular, se logró visualizar el cambio de morfología esperado según lo presentado anteriormente. Además, se logró identificar la presencia de Pax7 en el núcleo de células por microscopía de epifluorescencia. Esto es sumamente importante ya que les confiere a las células las propiedades de células madre satélite.

Con respecto a la viabilidad de producir y comercializar este tipo de células para proveer a las empresas productoras de carne sintética, se ha demostrado que efectivamente es viable técnicamente hablando. Sumado a esto, también se ha demostrado la alta rentabilidad de este

producto en el mercado propuesto. Esto significa que dicho producto innovador podría ser una solución para aquellas empresas que producen la carne sintética, aumentando las eficiencias y a su vez generando una alta rentabilidad. Hoy en día se está a la espera de la habilitación de este tipo de productos, pero se puede distinguir el potencial que presentan.

6.2. Perspectivas a futuro

Como posible perspectiva a futuro se plantea la sustitución del SFB que se utiliza como suplemento en el medio de cultivo (44). Esto es un gran desafío a nivel del cultivo celular porque el uso de SFB como suplemento nutricional proporciona un aumento en el crecimiento celular y promueve la viabilidad de las células. Actualmente se están buscando alternativas a este compuesto por recomendaciones que realizan los organismos regulatorios como la FDA. Obviar el uso del SFB permite disminuir los riesgos biológicos que este presenta.

También se plantea como una tarea a realizar en un futuro, el estudio de los factores de transcripción que se presentan luego de la fase de CS, pudiendo así confirmar con seguridad que las células derivadas son mioblastos. Luego, continuar con su posterior análisis en el desarrollo de una fibra muscular para asegurar la capacidad de estas células de generar el producto final de interés para las futuras industrias compradoras de los viales generados en este caso.

Una vez que se confirma la capacidad de estos cultivos, es necesario poner a punto el escalado del proceso para así poder establecer los parámetros de trabajo requeridos para alcanzar las cantidades a producir pautadas.

7. Referencias bibliográficas

1. Gauna D, Perez M. Carne sintética 10. 2019:1–9.
https://inta.gov.ar/sites/default/files/carne_sintetica.pdf
2. Yaneselli K, Campbell V, Algorta A, Bonfiglio C, Mirazo J, Fernández S, Ríos M, Llambí S, Maisonnave J, Yaneselli K, et al. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de caninos, equinos y felinos en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 2018 [accessed 2022 Aug 4];54(209):18–25. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092018000100018&lng=es&nrm=iso&tIng=es. doi:10.29155/VET.54.209.3
3. Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2006 [accessed 2022 Aug 4];54(11):1177–1191. <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1369/jhc.6R6995.2006>. doi:10.1369/jhc.6R6995.2006
4. Ritchie, Hannah. Qué países del mundo consumen más carne (y hay uno de Latinoamérica). BBC news. [Internet]. 2019. <https://www.bbc.com/mundo/noticias-47119001>
5. Uruguay Presidencia [Internet]. Sector cárnico alcanzó los 4.000 millones de dólares en 2021. 2021 [accessed 2021 Dec 4]. <https://www.gub.uy/presidencia/comunicacion/noticias/sector-carnico-alcanzo-4000-millones-dolares-2021>
6. Más de US\$ 4.000 millones por ventas de carnes al exterior y en el mercado interno. *El Observador*. [Internet]. 2021 Dec 9 [accessed 2022 Aug 4]. <https://www.elobservador.com.uy/nota/mas-de-us-4-000-millones-por-ventas-de-carnes-al-exterior-y-en-el-mercado-interno-2021129184747>
7. Una a una, la situación de los principales mercados de acceso para la carne vacuna. *El País*. [Internet]. 2021. [accessed 2022 Aug 4]. <https://rurales.elpais.com.uy/carnes/una-a-una-la-situacion-de-los-principales-mercados-de-acceso-para-la-carne-vacuna>
8. Evolución de los mercados cárnicos y perspectivas para el 2022. *Agrositio*. [Internet]. 2021. [accessed 2022 Aug 4]. <https://www.agrositio.com.ar/noticia/220675-evolucion-de-los-mercados-carnicos-y-perspectivas-para-el-2022>
9. Pattarino C. USDA confirma buenas perspectivas para el mercado cárnico - Blasina y Asociados. *Blasina y Asociados - Agronegocios y comunicación*. [Internet]. 2021 Apr 12 [accessed 2022 Aug 4]. <https://blasinayasociados.com/usda-confirma-buenas-perspectivas-para-el-mercado-carnico/>
10. Sharma S, Thind SS, Kaur A. In vitro meat production system: why and how? *Journal of Food Science and Technology*. 2015 [accessed 2022 Aug 4];52(12):7599. /pmc/articles/PMC4648904/. doi:10.1007/S13197-015-1972-3
11. ¿Comer menos carne para salvar el clima? Sí, pero no siempre | Ciencia y Ecología | DW | 16.10.2020. [accessed 2022 Aug 4]. <https://www.dw.com/es/comer-menos-carne-para-salvar-el-clima-sí-pero-no-siempre/a-55305939>
12. Post MJ. Proteins in cultured beef. *Proteins in Food Processing: Second Edition*. 2018 Jan 1:289–298. doi:10.1016/B978-0-08-100722-8.00012-7

13. Beyond Meat Uruguay. [accessed 2022 Aug 4]. <https://www.beyondmeat.com.uy/>
14. C84 | Carne sintética. Una cuasi-realidad comercial. [accessed 2022 Aug 4]. <https://www.aecoc.es/articulos/c84-carne-sintetica-una-cuasi-realidad-comercial/>
15. Bedanta R. A review on lab-grown meat: Advantages and disadvantages. [Internet]. 2021 Jul 17.. [accessed 2022 Aug 4]. <https://ojs.qiu.edu.my/journal/index.php/qijmhs/article/view/48>
16. Stephens N, Di Silvio L, Dunsford I, Ellis M, Glencross A, Sexton A. Bringing cultured meat to market: Technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture. *Trends in Food Science & Technology*. 2018 [accessed 2022 Aug 4];78:155. /pmc/articles/PMC6078906/. doi:10.1016/J.TIFS.2018.04.010
17. De Backer CJS, Hudders L. Meat morals: relationship between meat consumption consumer attitudes towards human and animal welfare and moral behavior. *Meat Science*. 2015;99:68–74. doi:10.1016/J.MEATSCI.2014.08.011
18. Schaefer GO, Savulescu J. The Ethics of Producing In Vitro Meat. *Journal of Applied Philosophy*. 2014 [accessed 2022 Aug 4];31(2):188. /pmc/articles/PMC4419201/. doi:10.1111/JAPP.12056
19. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy*. 2019 [accessed 2022 Aug 4];10(1):1–22. <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13287-019-1165-5>. doi:10.1186/S13287-019-1165-5/FIGURES/8
20. Pimentel-Parra GA, Murcia-Ordoñez B. Células madre, una nueva alternativa médica. *Perinatología y Reproducción Humana*. 2017;31(1):28–33. doi:10.1016/J.RPRH.2017.10.013
21. Danoviz ME. Skeletal Muscle Satellite Cells: Background and Methods for Isolation and Analysis in a Primary Culture System. [Internet]. 2012 Apr 12. [accessed 2022 Aug 4]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3325159/>
22. Klimczak A, Kozłowska U, Kurpisz M. Muscle Stem/Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow Origin for Skeletal Muscle Regeneration in Muscular Dystrophies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2018 [accessed 2022 Aug 4];66(5):341. /pmc/articles/PMC6154032/. doi:10.1007/S00005-018-0509-7
23. Yin H, Price F, Rudnicki M. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. [Internet]. 2013. [accessed 2022 Aug 4]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4073943/>
24. Lovell-Badge R, Anthony E, Barker RA, Bubela T, Brivanlou AH, Carpenter M, Charo RA, Clark A, Clayton E, Cong Y, et al. ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2021 update. *Stem Cell Reports*. 2021;16(6):1398–1408. doi:10.1016/J.STEMCR.2021.05.012
25. Hill ABT, Bressan FF, Murphy BD, Garcia JM. Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species. *Stem Cell Research and Therapy*. 2019 [accessed 2022 Aug 4];10(1):1–13. <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-019-1145-9>. doi:10.1186/S13287-019-1145-9/FIGURES/1
26. Colibri: Estudio de las características de proliferación, multipotencialidad e inmunológicas de las células madre mesenquimales de especies domésticas. [accessed 2022 Aug 4]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/24121>
27. Riaño NB, Vera VJ. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN

- DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES CANINAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2014 [accessed 2022 Aug 4];61(2):115–133. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-29522014000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=es. doi:10.15446/RFMVZ.V61N2.44675
28. Manzano Martínez R, Pinzolas O. Tesis Doctoral. [accessed 2022 Aug 4]. <http://zaguan.unizar.es>
29. Brennan T, Katz J, Quint Y, Spencer B. Cultivated meat: Out of the lab, into the frying pan. Consultora McKinsey. [Internet]. 2021 Jun 16. [accessed Aug 4]. <https://www.mckinsey.com/industries/agriculture/our-insights/cultivated-meat-out-of-the-lab-into-the-frying-pan>
30. Miersch C, Stange K, Röntgen M. Separation of functionally divergent muscle precursor cell populations from porcine juvenile muscles by discontinuous Percoll density gradient centrifugation. *BMC Cell Biology*. 2018 [accessed 2022 Aug 4];19(1):1–12. <https://bmcmolcellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12860-018-0156-1>. doi:10.1186/S12860-018-0156-1/FIGURES/6
31. Aguirre Adriana GRAG, Gómez Bravo MHOJ y DMSG. METODOLOGIA PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE COMPUESTOS, COMO CERNIMIENTO DE ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA. Universidad Nacional Autónoma de México. [accessed 2022 Aug 4]. [http://www.riidfcm-cyted.fq.edu.uy/archivos/Mexico 2011 - Practicas CYTED/Evaluaci%F3n de la actividad antiproliferativa. Tinci%F3n con Sulforrodamina B.pdf](http://www.riidfcm-cyted.fq.edu.uy/archivos/Mexico%202011%20-%20Practicas%20CYTED/Evaluaci%F3n%20de%20la%20actividad%20antiproliferativa.%20Tinci%F3n%20con%20Sulforrodamina%20B.pdf)
32. Choi KH, Yoon JW, Kim M, Lee HJ, Jeong J, Ryu M, Jo C, Lee CK. Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: A methodological review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021 [accessed 2022 Aug 7];20(1):429–457. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12661>. doi:10.1111/1541-4337.12661
33. Andoni. Tipos de contaminación en cultivos celulares y su prevención.
34. How to Make and Use Percoll Gradients. [accessed 2022 Aug 7]. <https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/how-to-make-and-use-gradients-of-percoll>
35. Olguin HC, Olwin BB. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Developmental Biology*. 2004;275(2):375–388. doi:10.1016/J.YDBIO.2004.08.015
36. Kyoko Naito, Keita Kanki. Glycolytic inhibition by resveratrol prevents myoblast cell death caused by glucose deprivation and hypoxia; a possible application to the three-dimensional tissue construction, *Jpurnal of Bioscience and Bioingeniering*. [accessed 2022 Aug 6] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32950383/>
37. The future of food and agriculture and challenges.[Accessed 7 Aug 2022]. <https://www.fao.org/3/i6583e/i6583e.pdf>
38. How to Sustainably Feed 10 Billion People by 2050, in 21 Charts | World Resources Institute. [accessed 2022 Aug 7]. <https://www.wri.org/insights/how-sustainably-feed-10-billion-people-2050-21-charts>
39. Growing at a slower pace, world population is expected to reach 9.7 billion in 2050 and could

peak at nearly 11 billion around 2100 | UN DESA | United Nations Department of Economic and Social Affairs. [accessed 2022 Aug 7].

40. Is there enough meat for everyone? - Gates Notes. [accessed 2022 Aug 4].

<https://www.gatesnotes.com/Books/Should-We-Eat-Meat>.

<https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2019.html>

41. Las mejores empresas de Carne Artificial y Cultivada - Inteligencia-Artificial.dev. [accessed 2022 Aug 7]. <https://inteligencia-artificial.dev/carne-cultivada/>

42. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC Cell Biology. 2006 [accessed 2022 Aug 7];7:14.

[/pmc/articles/PMC1435883/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1435883/). doi:10.1186/1471-2121-7-14

43. Good Food Institute. [Internet]. 2021. [accessed 7 Aug 2022]. <https://gfi.org/cultivated/>

44. Simancas-Escorcia V, Diaz-Caballero A. Impacto de la concentración de suero fetal bovino sobre las células epiteliales dentales*. 2019 [accessed 2022 Aug 7].

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265460762017>. doi:10.18041/1900-3803/entramado.1.5420

8. Anexos

8.1. Anexo 1

Company	Brief description	Protein category	Company focus	Tecnology focus	Country	Website	Year founded
ClearMeat	India-based startup working on cultivated meat	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing, Bioprocess design	India	http://www.clearmeat.com/	2018
Finless Foods	U.S.-based company working on plant-based fish and cultivated blue fin tuna	Cultivated, Plant-based	Meat, Seafood	Cell culture media, End product formulation and manufacturing	United States	https://finlessfoods.com/	2016
Aleph Farms	Israel-based company producing cultivated beef steak	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing, Scaffolding and structure	Israel	https://www.aleph-farms.com/	2017
Matrix F.T.	Startup making 3D nanofiber tubes for cultivated meat production	Cultivated	Meat	Scaffolding and structure	United States	https://www.matrixmeats.com/	2019
Shiok Meats	Singapore-based company producing cultivated seafood, including crustaceans like shrimps, crabs, and lobsters	Cultivated	Meat, Seafood	End product formulation and manufacturing	Singapore	https://shiokmeats.com/	2018
Mzansi Meat Co	South Africa-based startup working on cultivated beef and chicken	Cultivated	Meat	Cell culture media, End product formulation and manufacturing	South Africa	http://mzansimeat.co/	2020
GOURMEY - Suprême SAS	France-based company producing restaurant-grade meats directly from animal cells, starting with cultivated foie gras	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	France	https://gourmey.com/welcome	2019
MeaTech	Israel-based company producing 3D printed cultivated meat	Cultivated	Meat	Scaffolding and structure, End product formulation and manufacturing	Israel	http://www.meatech3d.com/	2019
Mission Barns	U.S.-based startup working on cultivated meat, currently offering Kosher Bacon	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	United States	https://www.missionbarns.com/	2018
Cultured Decadence	U.S.-based company developing novel methods to make crustacean products using cell culture. acquired by Upside	Cultivated	Meat, Seafood	Cell culture media, End product formulation and manufacturing	United States	https://www.cultureddecadence.com/	2020

Fork & Goode	U.S.-based startup working on cultivated meat	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	United States	https://www.forkandgoode.com/	2018
Higher Steaks	U.K.-based startup working on cultivated meat	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	United Kingdom	https://www.highersteaks.com/	2018
Meatable	Denmark-based company producing cultivated meat products	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Netherlands	https://www.meatable.com/	2018
Mirai Foods AG (fmr. AlphaMeats)	Switzerland-based company producing cultivated meat products	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Switzerland	http://alphameats.com	2019
Eat Just, Inc.	U.S.-based company with a plant-based egg brand called JUST Egg and a cultivated meat subsidiary called GOOD Meat, with plant-based products including liquid egg, folded egg and sous vide egg bites and cultivated meat products including chicken.	Plant-based, Cultivated	Meat, Eggs, Dairy	End product formulation and manufacturing	United States	https://www.just.com https://goodmeat.co	2011
SuperMeat	Israel-based company developing cultivated chicken	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Israel	https://www.supermeat.com/	2015
Lab Farm Foods	U.S.-based company producing various cultivated meats, including pork and chicken	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	United States	https://www.labfarmfoods.com/	2019
New Age Meats	U.S.-based startup producing on cultivated meat	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	United States	http://www.newagemeats.com/	2018
Nestlé	Multinational manufacturer of food products (see Sweet Earth Natural Foods).	Plant-based, Cultivated	Contract manufacturing/processing, Meat, Seafood	End product formulation and manufacturing	Switzerland	https://www.nestle.com/	
Avant Meats	Hong Kong-based company using proprietary biotechnology platform to produce cultivated fish products, including food, skincare, and other functional	Cultivated	Meat, Seafood	End product formulation and manufacturing	Hong Kong	https://www.avantmeats.com/	2018
Biomimetic Solutions	B2B startup working on 3D scaffolds for cultivated meat layering	Cultivated	Meat	Scaffolding and structure	United Kingdom	http://www.biomimeticsolutions.com.br/	2017
BioTech Foods	Spain-based startup producing cultivated meat products, acquired by Brazil-based JBS in 2021	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Spain	https://www.biotechfoods.com/ethicalmeat/	2017
Artemys Foods	U.S.-based start-up working on cultivated and cultured meat products	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	United States	https://artemysfoods.com/	2019
Cell Ag Tech	Canada-based startup working to produce sustainable seafood from stem cells instead of living animals	Cultivated	Meat, Seafood	End product formulation and manufacturing	Canada	https://cellagtech.com/	2018
BlueNalu	U.S.-based startup producing cultivated seafood products	Cultivated	Meat, Seafood	End product formulation and manufacturing	United States	https://www.blunenalu.com/	2017
ArtMeat	Russia-based start-up working on cultivated horse and sturgeon cells	Cultivated	Meat, Seafood	End product formulation and manufacturing	Russia	http://artmeat.pro/	2019
Alife Foods	Germany-based company producing cultured schnitzel	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Germany	http://alifefoods.de/	2019
Because Animals	U.S.-based company making cultured meat for dog and cat food and supplements	Cultivated	Other, Meat	End product formulation and manufacturing	United States	https://becauseanimals.com/	2016
CellMEAT	South Korea-based company producing cultivated meat products	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	South Korea	https://www.thecellmeat.com/	2019
Umami Meats	Singapore-based company developing cultivated seafood based on a proprietary, low-cost, and sustainable formulation of growth factors	Cultivated	Meat, Seafood	Cell culture media, End product formulation and manufacturing	Singapore	https://www.umamimeats.com/	2020
Bluu Biosciences	Germany-based company producing cultivated seafood products	Cultivated	Meat, Seafood	End product formulation and manufacturing	Germany	https://www.bluu.bio/	2020
Gaia Foods	Singapore-based company producing cultivated meat products, emphasizing quality cells grown without harmful chemicals, microbial contamination, no hormones,	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Singapore	http://gaiafoods.xyz/	2019
Magic Valley	Australia-based company producing cultivated lamb meat	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Australia	https://magicvalley.com.au/	2021

Mogale Meats	South Africa-based company developing cell-lines for cultured meat, including antelope	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	South Africa	https://mogalemeat.com/	2020
Tender (formerly) Boston Meats	U.S.-based cultured meat company	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	United States	https://www.tenderfood.com	2020
denovoMATRIX	denovoMATRIX designs and produces biomaterials, which enable cell manufacturing in higher quality, quantity and	Cultivated	Meat, Dairy	Scaffolding and structure	Germany	https://www.denovomatrix.com/	2018
Gelatex Technologies	Estonia-based company that produces edible plant-based scaffolds for cell-cultured meat	Cultivated	Meat, Ingredients and inputs, Contract manufacturing/processing	Scaffolding and structure	United Kingdom	www.gelatex.com	2016
CellX	China-based company that focuses on cellular agriculture	Cultivated	Meat	Bioprocess design, Scaffolding and structure	China	https://celx.tech	2020
Bruno Cell	Italy-based startup producing cultivated meat products	Cultivated	Meat	Scaffolding and structure	Italy	https://www.brunocell.com/	2019
Appleton Meats	Canada-based company working on scaling up the production of clean ground beef, chicken, and mouse-meat (for cat treats)	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Canada	https://www.crunchbase.com/organization/appleton-meats	2016
Animal Alternative Technologies	U.K.-based company creating a complete, scalable cultured meat manufacturing system: the Renaissance Farm®, which includes raw materials, hardware (eg. bioreactors), AI software, bioelectronics, and bioprocesses	Cultivated	Bioprocessing infrastructure and equipment, Meat, Ingredients and inputs, Food processing infrastructure and equipment, Other	Bioprocess design, Scaffolding and structure, End product formulation and manufacturing, Ingredient optimization	United Kingdom	https://www.animalalternativetechnologies.com/	2020
Another Fish	Canada-based company that produces cell-cultured fish-fillet products, piloting with a whitefish fillet	Cultivated	Meat, Seafood	End product formulation and manufacturing	Canada	www.another.fish	2021
Bluefin Foods Inc.	Bluefin Foods Inc. is a life science technology company that aims to create a better solution to supplying the world with meat food products. We are developing a cost-effective and high-quality process of producing cell-cultured seafood to be a viable substitute for the traditional seafood supply chain.	Cultivated	Meat, Seafood	End product formulation and manufacturing	United States	www.blueinfoods.com	2021
Ivy Farm Technologies	U.K.-based company that produces cultivated pork products.	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	United Kingdom	https://www.ivy.farm/	2019
Ants Innovate	Singapore-based deep tech company focusing on developing cultivated whole meat cuts, including pork	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Singapore	https://www.antsinnovate.com/	2020
ANJY MEAT	Croatia-based company creating meat products that are rare in industrial animal agriculture, piloting with a lion burger.	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Croatia	http://anjymeat.com/	2021
MyoWorks	India-based company producing scaffolding for the cultivated meat industry	Cultivated	Meat, Ingredients and inputs	Scaffolding and structure	India	https://www.myoworks.in	2020
Joes Future Food / Nanjing Zhouzi	China-based company producing serum-free cultivated pork and other meat products	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	China	http://www.joesfuturefood.com	2019
Nissin Food Products Co., Ltd.	Japan-based company that producing and selling convenience food and instant noodles, carrying out research on cultured steak meat	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Japan	https://www.nissin.com/en_jp/	1958
Meatafora	Israel-based company isolating and culturing farm animal stem cells inside plant-derived collagen microcarriers to produce cultivated meat	Cultivated	Meat	Scaffolding and structure	Israel	www.meatafora.com	2021

Fisheroo	Singapore-based company using cellular agriculture technology to create surimi, a minced fish paste commonly found in East Asian cuisine	Cultivated	Meat, Seafood	End product formulation and manufacturing	Singapore	https://www.fisheroo.co	2021
Luyef Biotechnologies, Inc.	Chile-based cell-based meat company that has developed myoglobin protein to provide the flavor and aroma of real meat for plant-based meat alternatives and is also working on hybrid plant-based and cultivated meat products using an algae scaffold	Cultivated	Meat	Bioprocess design, Scaffolding and structure	Chile	https://luyef.com	2020
BioFood Systems	Israel-based company that produces meat analogues using bovine embryonic stem cells cultivated in an animal free cell culture media	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Israel	https://www.biofood-systems.com	2018
Novel Farms	U.S.-based company that produces whole cuts of cultured Iberian pork	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing, Scaffolding and structure	United States	https://www.novel-farms.co/	2020
NewCo	Israel-based company that produces cultivated raw meat products	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Israel	https://www.globenewswire.com/news-release/2022/01/10/2363587/0/en/Biotechnology-Company-Pluristem-and-Israel-s-Largest-Food-Producer-Tnuva-Launch-Landmark-Collaboration-to-Establish-Cultured-Food-Platform.html	2021
Ambi Real Food	Brazil-based company producing cultured meat products, focusing on beef	Cultivated	Meat	End product formulation and manufacturing	Brazil	https://ambirealfood.com/	2021
Edge Foods	U.S.-based company that produces cultivated meat products using innovative biotechnologies.	Cultivated	Meat, Bioprocessing infrastructure and equipment	Bioprocess design, End product formulation and manufacturing	United States	www.edgefoods.co	2022
Meat.The End	Israel-based company developing production techniques and ingredients to boost the texture of meat alternatives	Plant-based, Cultivated	Meat	Ingredient optimization, End product formulation and manufacturing	Israel	www.meattheend.tech	2020
Blue Ridge Bantam	U.S.-based company that produces hybrid alternative poultry products, especially turkey, by integrating cultivated fat cells that mimic the taste and texture of animal fat cells into	Cultivated, Plant-based	Meat	End product formulation and manufacturing	United States	https://www.blueridgebantam.com	2020

Figura 22: Reporte extraído de *Good Food Institute* de las *start-ups* involucradas en la producción de carne sintética actualmente.

8.2. Anexo 2

Link al desglose del flujo de caja del Proyecto de comercialización de células:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1FmaJghM5D_nO6-qnj-FlqGciHKORmRQd9z2qdkx1M/edit?usp=sharing