

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y Tecnología

**PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)
Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I**



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I

Evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de clavo contra la línea celular

HT-29 de cáncer de colon *in vitro* en el CIATEJ Guadalajara

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, Luis Alberto Sepúlveda Galindo

Profesor PAP: Dr. Moisés Martínez Velázquez

M. en C. José Nabor Haro González

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre de 2023

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	4
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	4
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	5
1.2 Caracterización de la organización.....	7
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	8
1.4. Planeación de alternativa(s).....	12
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	16
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	22
1.7. Bibliografía y otros recursos	28
1.8. Anexos generales.....	¡Error! Marcador no definido.
2. Productos	31
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	32
3.1 Sensibilización ante las realidades	32
3.2 Aprendizajes logrados	33

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El PAP “Evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de clavo contra la línea celular HT-29 de cáncer de colon *in vitro*” tiene como objetivo evaluar la actividad biológica del aceite esencial de clavo contra la línea celular HT- 29 de cáncer de colon *in vitro*. El cáncer es una patología humana con gran impacto a nivel salud, es la principal causa de muerte con un aproximado de 10 millones de defunciones para el 2020 a nivel mundial. En México para el mismo año se registraron un total de 97, 323 defunciones por la misma enfermedad.

Actualmente existen diversas técnicas para tratar el cáncer que van desde cirugías, quimioterapias, radioterapias, inmunoterapia dirigida, entre otras. Sin embargo, las desventajas de estos tratamientos suelen afectar al paciente durante el proceso: dolores de cabeza, falta de apetito, hemorragias, infecciones bacterianas, pérdida de energía. Por ello, el buscar alternativas que ayuden a controlar el cáncer en etapas tempranas es fundamental, los aceites esenciales de diferentes especies son de sumo interés en las investigaciones científicas por sus efectos antitumorales, antisépticos y analgésicos.

En el presente trabajo se evaluó el aceite esencial de clavo para una línea celular de cáncer de colon (HT-29) comparándolo con un reactivo utilizado en quimioterapias, el Cisplatino. Los resultados obtenidos fueron alentadores ya que se mostró un efecto positivo en la viabilidad celular ocasionando muerte celular programada. También se obtuvieron datos importantes en la concentración requerida de aceite de clavo para un IC₅₀, siendo esta de 200 µg/mL.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

El presente PAP fue realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) que pertenece a la Coordinación de Medio Ambiente, Salud y Alimentación del Sistema de Centros Públicos de Investigación del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología. El CIATEJ cuentan con más de 40 años de experiencia realizando actividades de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación, ofreciendo servicios tecnológicos y de formación de recursos humanos especializados con programas de posgrado, educación continua e iniciación a la investigación.

El presente proyecto de índole teórico-práctico está siendo realizado por el estudiante a doctorado José Nabor Haro González y su equipo de investigación. La fase práctica del proyecto para la evaluación biológica está bajo la dirección del Dr. Moisés Martínez Velázquez, codirector encargado del proyecto. El objetivo general de esta investigación es evaluar el efecto citotóxico del aceite esencial del clavo de olor contra el cáncer de colon en un modelo celular HT-29.

Objetivos específicos:

- Evaluar la actividad citotóxica del aceite esencial de clavo de olor en línea celular HT-29 mediante la metodología MTT.
- Determinar el efecto del aceite esencial del clavo de olor sobre la migración celular y clonogenicidad en línea celular HT-29.
- Determinar los posibles mecanismos de muerte celular mediante la identificación de caspasa mediante la metodología western blot.
- Comparar la actividad citotóxica del aceite esencial de clavo de olor contra el cisplatino utilizado en el tratamiento contra cáncer de colon.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

El cáncer es una enfermedad por la que un grupo de células del cuerpo se multiplica sin control alguno y llega a extenderse a otras regiones del cuerpo. En un proceso normal las células del cuerpo se van dividiendo, en un proceso llamado mitosis, según se vayan requiriendo. Esta división celular está regulada en el núcleo de cada célula, específicamente

en sus genes y una variación en dicha regulación ocasiona cambios en las instrucciones de cuándo y cómo la célula se tiene que dividir para ir remplazando a las más viejas del sistema. Los tres genes que se identifican causantes del cáncer son; protooncogén, gen supresor de tumoral y gen de reparación ADN [1].

Ya que una afección genética la puede tener cualquier célula del cuerpo dependiendo de las condiciones del entorno en las que se desarrollen, uno de los cánceres más comunes en hombres y mujeres es el de colon y recto, siendo una mala alimentación y el sedentarismo los dos factores principales que lo provocan. En el mundo se diagnostican 1,849,515 nuevos casos por año de CCR (cáncer colorrectal), posicionándolo en el tercer lugar de cánceres más comunes y en segunda posición de los más mortales con 880,792 muertes anuales. La tasa de incidencias por esta anomalía se ha visto con mucha más frecuencia en regiones con índices de desarrollo medio-alto, mientras que en países como EE. UU, Australia y Nueva Zelanda, las tasas de detección se han estabilizado e incluso han disminuido debido a programas de salud enfocados a la revisión y detección de la población con probabilidades de padecerla, así como avances relacionados directamente con quimioterapias y tratamientos alternos [2]. De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, durante el 2020 en México, se registraron 14,901 casos nuevos de neoplasia en el colon, y se registraron más de 7 mil muertes en el mismo periodo, colocando el cáncer de colon como el segundo más mortal en nuestro país, solo por detrás del cáncer de mama [3]. La detección temprana del cáncer de colon, incrementa drásticamente el porcentaje de tratar, sobrellevar y curarlo hasta en un 90%, logrando una mayor expectativa de vida del paciente [2].

Por lo general el CCR es detectado en una etapa avanzada el 70% de las veces, esto por motivos de falta de cultura médica de cada individuo para hacerse chequeos médicos recurrentes, haciendo que el tratamiento para curarlo o sobrellevar la enfermedad sea muy difícil. Dado que esta enfermedad es detectada en etapas tardías se buscan soluciones viables para prevenir e informar a las personas sobre los factores que pueden aumentar la probabilidad de desarrollarlo, tales como: ser mayor de 50 años, antecedentes familiares con CCR, afecciones intestinales inflamatorias, dietas con bajo contenido de fibra y alto

contenido de grasas, estilo de vida sedentario, diabetes, obesidad, tabaquismo y alto consumo de alcohol [3].

1.2 Caracterización de la organización

El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), es un Centro que pertenece a la Coordinación de Medio Ambiente, Salud y Alimentación del Sistema de Centros Públicos de Investigación (CPI) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Desde hace más de 40 años, el Centro realiza actividades de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación (I+D+i), ofrecen servicios tecnológicos y oportunidades de formación de recursos humanos especializados con programas de posgrado, maestrías y doctorados, además de capacitaciones continuas e iniciación a la investigación [4]. Su propósito es ofrecer soluciones tecnológicas y de capital humano destinadas a contribuir la mejora de la competitividad de diversos actores sociales en los sectores agropecuarios, alimentos y bebidas, salud animal y humana, medio ambiente y energía sustentable. Cuenta con personal experto en cada una de las actividades efectuadas dentro del centro, además, dispone de una infraestructura en laboratorios, plantas pilotos e instalaciones especializadas, con el objetivo de desarrollo para trabajos, proyectos y servicios tecnológicos [4].

Las investigaciones de CIATEJ tienen como misión impulsar el desarrollo sostenible de la sociedad, generando conocimiento de vanguardia, formar talentos especializados y aplicar la ciencia y tecnología de manera innovadora. Mientras tanto, su visión es fomentar el conocimiento e innovación tecnológica mediante trabajos multidisciplinarios que se llevan en colaboración con otros Centros Públicos, universidades e industrias, nacionales e internacionales [4].

Dentro del CIATEJ se encuentra el área de Biotecnología Médica y Farmacéutica, conformada por 22 a 24 investigadores expertos del área comprometidos a atender las demandas y retos del sector Salud a nivel global a través de la investigación, desarrollo y transferencia de productos innovadores. También oferta servicios altamente especializados para la prevención, diagnóstico, tratamiento y control de patologías humanas y animales,

infecciosas y no infecciosas, considerando las bases moleculares de la salud y la enfermedad [5].

El Doctor en Ciencias Biomédicas Moisés Martínez Velázquez, nivel 2 del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) en el área de Biología, Química y co-director del presente PAP, es investigador titular C del CIATEJ unidad Guadalajara. Se desempeña en la línea de investigación dedicada al área de Biotecnología Médica y Farmacéutica y sublíneas de desarrollo y evaluación de vacunas, desarrollo y validación de pruebas de diagnóstico molecular [6][7].

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

A pesar de que los tratamientos del cáncer colorrectal (CCR) están muy estudiados y estandarizados, sus precios y los efectos adversos siguen siendo una oportunidad de mejora para que los individuos que se someten a estos puedan sobrellevar de mejor manera esta enfermedad potencialmente mortal. Los tratamientos efectuados para el CCR dependen del estadio en el cual se detecte, que van desde el 0 hasta el 4; variando entre 7 tipos de tratamientos estándar.

1. Cirugía

Este es uno de los tratamientos más comunes para todos los estadios del CCR, donde un médico puede extirpar el cáncer mediante tres técnicas de cirugía.

- Escisión local; esta cirugía es ideal para retirar el tumor cuando el cáncer se detecta en una etapa temprana. Se basa en introducir un tubo con un instrumento cortante a través del recto hasta el colon y extirparlo directamente.
- Resección del colón con anastomosis; si el tumor detectado es más grande, se realiza una colectomía parcial (corte del tumor con un poco de tejido sano del colon) para posteriormente realizar la anastomosis (coser los extremos donde se realizó el corte).
- Resección del colon con colostomía; En dado caso que no se puedan coser los dos extremos del corte, se crea una abertura por fuera del cuerpo para eliminar el material de desecho.

2. Criocirugía

Este tratamiento es muy similar a la cirugía convencional, la diferencia es que se usa nitrógeno para congelar los tumores y extirparlos con mayor facilidad y sin tanto riesgo de cortes.

Los posibles riesgos y efectos secundarios de la cirugía y la criocirugía dependen de diversos factores, incluyendo la extensión de la operación y la salud general del paciente. Los problemas más comunes que surgen durante o poco después de la operación son el sangrado, infecciones y coágulos en las piernas, poniendo en riesgo latente de complicaciones al paciente con alta probabilidad de muerte [8].

3. Ablación por radiofrecuencia

La ablación por frecuencia utiliza una sonda especial con electrodos con el fin de destruir células cancerígenas, ésta se introduce directamente en la piel o por una incisión abdominal para atacar la zona de interés. Por lo general es utilizada para destruir pequeños tumores, tanto en la zona origen como aquellos que se hayan podido propagar a tejidos diferentes del sistema.

Los efectos secundarios más comunes para esta metodología se rigen por, dolor abdominal, infección en hígado, fiebre, sangrado en la cavidad torácica o en el abdomen, pruebas hepáticas con resultados anormales [9].

4. Quimioterapia

En la quimioterapia se utilizan medicinas especializadas con índices citotóxicos para la muerte celular afectando todas las células del cuerpo. Una de las ventajas de esta técnica es que cuando se introduce mediante una vía intravenosa llega a todas las células cancerígenas que estén en el cuerpo, es menos invasiva, pero es un tratamiento largo de realizar. La desventaja de este tratamiento tiene relación al tipo de fármaco utilizado, así como la dosis, provocando comúnmente pérdida de pelo, úlceras en la boca, pérdida de apetito y de peso, náuseas y vómitos, diarrea, cambios en uñas y piel, también otro riesgo es la afección de las células productoras de eritrocitos en la médula ósea [10].

5. Radioterapia

La técnica en cuestión consta de usos de rayos X de alta frecuencia para destruir las células cancerígenas o impedir su crecimiento. Para esta técnica existe la radioterapia

interna y la radioterapia externa. Los efectos secundarios observados por la aplicación de radioterapia incluyen, irritación de la piel presentando ampollas y descamación, dificultades de que las heridas lleguen a cicatrizar, náuseas, irritación rectal, incontinencia intestinal, irritación en la vejiga que puede incluir sangrado al orinar y fibrosis [11].

6. Terapia dirigida

Las terapias dirigidas evalúan el perfil del cáncer que se va a atacar con el fin de generar una terapia específica para el mismo.

- Anticuerpos monoclonales; terapia con inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular y terapia con inhibidores del factor de crecimiento epidérmico.
- Inhibidor de angiogénesis; Ziv-aflibercept y regorafenib.
- Inhibidor de proteínas cinasas; inhibidor de BRAF.

Pese a que los medicamentos de las terapias dirigidas atacan ciertos mecanismos definidos que las células cancerígenas aprovechan como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), gen BRAF, por mencionar unos, los efectos adversos son compartidos en su mayoría, dando como resultado hipertensión arterial, cansancio extremo, sangrado, recuentos de glóbulos blancos bajos, dolores de cabeza intensos y periódicos [12].

7. Inmunoterapia

Este tratamiento en particular usa las células del sistema inmune del paciente para combatir de manera más eficiente al cáncer, donde se usan sustancias específicas para ayudarles a identificar las células malignas del cáncer. Estas terapias constan en una inhibición del receptor CTLA-4 y la inhibición de PD-1 y PD-L1 [14].

Por último, los efectos secundarios que se presentan en la inmunoterapia se destacan por estado de cansancio para el individuo, tos, náuseas, erupciones en la piel, pérdida del apetito, estreñimiento; reacciones alérgicas de las cuales derivan fiebre, escalofríos, respiración silbante, y dificultad para respirar [13].

Tratamientos agrupados según el estadio del cáncer:

- Tratamiento para el estadio 0
 - Escisión local o polipsectomía simple
 - Resección y anastomosis (esta se hace cuando el tumor es demasiado grande para hacer una escisión local)
- Tratamiento para el estadio 1
 - Resección y anastomosis
- Tratamiento para el estadio 2
 - Resección y anastomosis
- Tratamiento para el estadio 3
 - Resección y anastomosis
 - Quimioterapia post-cirugía
- Tratamiento para el estadio 4
 - Escisión local para tumores que reaparecieron
 - Resección
 - Quimioterapia
 - Radioterapia
 - Terapia dirigida
 - Inmunoterapia

Estos son los tratamientos aprobados por la Sociedad Americana del Cáncer, ya que han demostrado ser muy efectivos y de fácil replicación, además que también son las técnicas más estudiadas por el momento [14]. Por otro lado, los problemas que presentan estas metodologías contra el cáncer ponen en riesgo la salud del individuo tanto física como emocionalmente. En 2020, GNP Seguros atendió a 365 casos relacionados directamente con cáncer de colon, generando un costo total de atención por una suma de 128 millones de pesos. El precio promedio individual por atención contra el cáncer asciende a 350 mil pesos y los estados más afectados de la república, con incidencia de un 52% de los casos, son Estado de México, Jalisco y Nuevo León [16].

Actualmente se han buscado alternativas para llevar de una forma menos agresiva y más económica la prevención y pretratamiento contra esta enfermedad, dando como resultado el

uso de aceites esenciales con el objetivo de disminuir los efectos secundarios y controlar el cáncer. Según la Farmacopea Europea, los aceites esenciales son un producto oloroso de origen botánico y de composición compleja. El clavo posee 15 – 20 % de aceites esenciales por peso, conteniendo altas cantidades de compuestos fenólicos con actividad biológica de interés, como antibacterial, antifúngico, insecticida y antioxidante [17].

Se han identificado por lo menos 30 compuestos oleosos en el clavo, donde el eugenol se presenta como mayoritario, con un rango del 50%. Del 10%-40% se compone de acetato de eugenilo, beta-cariofileno y alfa-humuleno [17]. Se ha encontrado que el conjunto eugenol, beta-cariofileno y alfa-humuleno tienen actividad citotóxica y antitumoral, despertando el interés para uso como alternativa de la prevención y co-tratamiento del cáncer, además que reducen los efectos secundarios provocados por las quimioterapias, tales como, náuseas, vómito, pérdida de apetito y pérdida de peso [17].

1.4. Planeación de alternativa(s)

Actualmente existe información limitada sobre el uso de los aceites esenciales como preventivo y de co-tratamiento enfocados al cáncer. Como ya se mencionó, el clavo está compuesto de múltiples aceites esenciales con diferentes tipos de actividades biológicas, se encontró que el conjunto eugenol, beta-cariofileno y alfa-humuleno tiene propiedades citotóxicas y antitumorales debido a su atributo de ser antioxidantes y anti-inflamatorios, como resultado, activa las vías de señalización específicas ROS (Reactive Oxygen Species, por sus siglas en inglés), que contribuyen a la regulación de la proliferación celular, angiogénesis y la metástasis [17].

Las propiedades anticancerígenas del conjunto eugenol, beta-cariofileno y alfa-humuleno se deben a los siguientes mecanismos: activación de enzimas desintoxicantes, destrucción de DNA por estrés oxidativo, actividad antimetastásica y citotóxica, disminución de la viabilidad, detención de ciclo celular o apoptosis, reducción de niveles de expresión fosfato-Akt y MMP-2 y fuga de proteínas. También el CEO (por sus siglas en inglés, Clove Essential Oil) ha demostrado un efecto de baja citotoxicidad en células normales [17]. Por ello, el estudio sobre el comportamiento enfocado a cultivos de células *in vitro* de cáncer de colon y

cómo implementar el CEO para reducir y prevenir esta enfermedad, termina siendo una investigación innovadora en el área de Salud [19]. Las metodologías analíticas que se usarán para medir la actividad biológica del CEO en cultivos celulares de cáncer de colon son: ensayos de MTT, migración celular y clonogenicidad; también identificar los posibles mecanismos de muerte celular por Western Blot, comparando su citotoxicidad contra Cis-Platino, un fármaco utilizado en las quimioterapias.

Ensayo MTT

El ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio) se utiliza para medir la actividad metabólica celular como indicador de viabilidad. Este es un ensayo de colorimetría que se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla a cristales de formazán de color púrpura por las células metabólicamente activas. Las células metabólicamente activas contienen enzimas oxidoreductasas dependientes de NAD(P)H que reducen la sal de tetraziolo a formazán; estos últimos son insolubles en agua y para poder medirlos en el espectrofotómetro se solubilizan con DMSO para posteriormente hacer lecturas a una longitud de onda de 500-600 nm. Cuanto más se acerque la medición a 1, existen más células activas [18].

Migración celular

El ensayo de migración celular proporciona información útil sobre la actividad biológica sobre un cultivo celular. Este se caracteriza por el movimiento o la migración de la célula de espacios con poblaciones elevadas a lugares con menos densidad poblacional dentro de los recipientes de cultivos. Estos ensayos se realizan en entornos controlados con el objetivo de adquirir imágenes en un lapso determinado y medir el comportamiento de dicha migración. Para este ensayo se genera una “herida” en el cultivo de monocapa de células confluentes en microplaca, para posteriormente introducir los tratamientos correspondientes e ir monitoreando la expansión, proliferación y migración de las células hasta que el control, que tiene exclusivamente medio de cultivo, se cierre por completo, para posteriormente evaluar y comparar las imágenes obtenidas por microscopía, con una escala referente, y calcular la tasa de crecimiento celular [19].

Western Blot

El Western Blot es una técnica analítica ampliamente utilizada para estudiar alguna proteína de interés. Este método permite detectar muy específicamente una sola proteína contenida en alguna muestra biológica, esta especificidad se logra por el uso de un anticuerpo que reconoce la proteína y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Para realizar esta técnica se deben llevar a cabo 5 pasos generales; preparación de la muestra, electroforesis, transferencia a una membrana de nitrocelulosa, inmunotinción y detección de las bandas [21].

En la tabla 1 se muestran las actividades tentativas por hacer a lo largo de 16 semanas. Esta tabla está sujeta a cambios derivados por imprevistos que lleven a una experimentación más larga.

Tabla 1: Cronograma de actividades previstas del PAP

Nombre de la actividad	Recursos	Tiempo (días)	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15	Semana 16
Introducción a cultivos celulares	AM	2																
Preparación de medios	TP CB	1																
Arranque de líneas celulares	AM TP CB IC MO	2																
Crecimiento de líneas celulares	TP CB IC MO	4																
Crio preservación	TP CB CF UC	1																

Preparación de emulsiones	TP	1																
	CB																	
	RF																	
Sembrado para MTT	AM	2																
	TP																	
	CB																	
	CF																	
	IC																	
	EF																	
Ensayo migración celular	AM	3																
	TP																	
	CB																	
	MO																	
	IC																	
Ensayo Western Blot	AM	3																
	TP																	
	FD																	

Para interpretar correctamente la tabla 1 en el apartado de recursos, la tabla 2 explica las abreviaturas.

Tabla 2: Abreviaturas de los recursos utilizados

Recursos utilizados	
Abreviaturas	Significado
AM	Asesorías Dr. Moisés Martínez
TP	Trabajo personal
CB	Cabina de bioseguridad
IC	Incubadora de CO ₂
MO	Microscopio óptico
CF	Centrifuga
UC	Ultra congelador
RF	Refrigerador
EF	Espectrofotómetro
FD	Fotodocumentador

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Preparación de medios

Para la preparación de medios se requirió del medio Dulbecco's Modified Eagle's Me (DMEM), suero fetal bovino y un antibiótico compuesto de Penicilina-Estreptomicina (PSN), pipetas de 5 mL y 10 mL, un dispensador de vacío automático para las pipetas, tubos Falcón de 50 mL, alcohol etílico al 70% para esterilizar y gradillas.

Se limpiaron los materiales que se necesitarían, así como la campana de bioseguridad con alcohol para esterilizar. Se activó la luz UV por 15 min. Una vez pasaran los 15 min se activó el flujo laminar de la campana y se introdujo el medio DMEM, suero fetal bovino y PSN previamente limpiados con alcohol. Se apartaron 5 a 8 tubos Falcón, individualmente, para preparar los medios con la siguiente composición; 45 mL de medio DMEM (90%), 4.5 mL de suero fetal bovino (9%) y 500 microlitros de PSN (1%). Se ajustó el pH a 7. Se cerraron los tubos, se les aplicó Parafilm en las tapaderas para mantener la esterilidad, se limpió la campana de flujo laminar y se reservaron los medios preparados en un refrigerador a una temperatura de 5°C a 10°C.

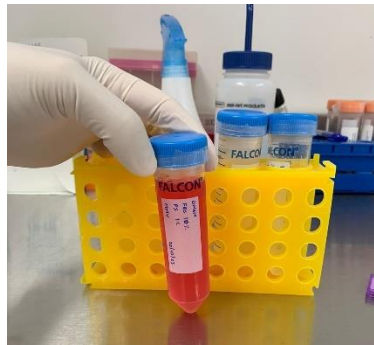


Figura 1. Medio DMEM preparado.

En la Figura 1 se observa una alícuota de medio DMEM ya preparado y listo para almacenar en las condiciones correspondientes de refrigeración (20°C) hasta su tiempo de uso. Se preparó un aproximado de 1 litro y 500mL de medio y se dispusieron en tubos Falcon de 50 para tener un mejor control de inocuidad y su facilidad de uso en los cultivos celulares.

Arranque de líneas celulares

Para arrancar las líneas celulares de cáncer colorrectal HT-29, se utilizaron matraces para cultivo en monocapa de 75 cm² con capacidad de 8 a 15 mL en volumen. También se utilizó la incubadora con inyección de CO₂ para mantener un intercambio de gases y un correcto pH de medio. Los materiales utilizados fueron micropipetas de mil microlitros, pipetas de 10 mL, alcohol etílico al 70% y criovial con la línea celular.

Se usó la campana con las medidas de esterilidad aplicando alcohol etílico al 70% y se activó la luz UV por 15 min. Se introdujeron los materiales a la campana de flujo laminar a utilizar excepto los medios y reactivos que puedan verse afectados por la UV. Una vez transcurrido los 15 min y descongelado el criovial, se agregó 8 mL de medio previamente preparado al matraz de 75 cm² y se agregaron 500 microlitros del criovial para comenzar la activación de la línea. Este paso se hizo exactamente igual para dos matraces y poder utilizar todo el criovial.

Los matraces se introdujeron a la incubadora a 35°C con 5% de CO₂ por un periodo de 24 h. Transcurridas las 24 h se revisaron los matraces y se evaluó la viabilidad de las células adheridas en la monocapa. Bajo las mismas condiciones de asepsia, se trabajó en la campana de flujo laminar y se hizo un lavado de los matraces para retirar el medio del día anterior y los restos del agente utilizado para el criovial (DMSO). El lavado consistió en retirar el medio con una pipeta serológica desechable de 10 mL, y dos enjuagues con PBS (3mL por enjuague). Al finalizar se le puso 9 mL de medio preparado y se dejó crecer bajo las mismas condiciones de incubación por 2 días para nuevos lavados o hasta que el medio comenzara a virar de rojo intenso a rojo-amarillento. La Figura 2 muestra parte del procedimiento que se llevó a cabo en la inoculación primaria del criovial con la línea HT-29 en matraces para cultivo celular animal de monocapa.

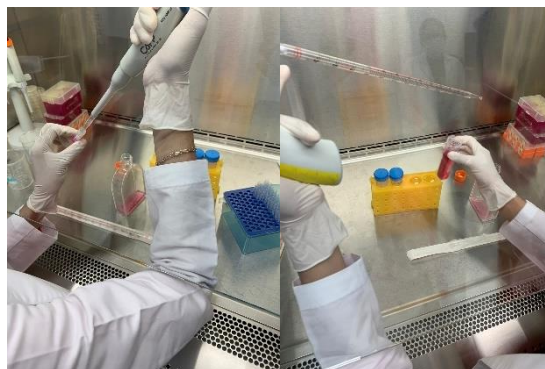


Figura 2. Cambio de medios a las líneas celulares

Ensayo MTT

Para este ensayo las células se sometieron a la reacción y viabilidad celular para una concentración específica de las emulsiones y del fármaco control Cis-platino, las concentraciones establecidas fueron de 0 microgramos/mL hasta los 550 microgramos/mL con diferencia de 50 microgramos/mL entre cada tratamiento. Para esto se tuvieron que tripsinizar los matraces para despegar las células de la monocapa y poder sembrarlas en caja de 96 pocillos, dejándolas pegar por 24 h, poner los tratamientos y dejarlos actuar por 24 h y por último introducir el reactivo MTT dejándolo por 3 horas. Finalmente, se extrajo el líquido y se suspendió en DMSO para lectura en espectrofotómetro.

Se usó la campana de flujo laminar para mantener la asepsia con la misma metodología de aplicación EtOH (etanol) al 70% y la luz UV. Los materiales por necesitar también se introdujeron a la campana para mayor control de contaminación.

Se hizo un lavado de las cajas retirando el medio y enjuagando dos veces con 3 mL de PBS por enjuague para retirar los desechos y células muertas. Una vez se enjuagó, se agregaron 3 mL de tripsina para despegar las células y poder transferirlas a los pocillos. Se incubaron los matraces de 75 cm² en la incubadora bajo las mismas condiciones por un lapso de 10 min, posteriormente a esto se agregaron 6 mL de medio preparado para inhibir la actividad de la tripsina, se transfirieron los 9 mL a tubos Falcón de 15 mL, y se centrifugaron a mil rpm por 5 min. Transcurrido el tiempo se retiró el sobrenadante y se suspendió el pellet a un mililitro

con medio preparado. Posteriormente, se extrajeron 10 microlitros de muestra y se mezcló con 10 microlitros de azul tripano para teñir las células viables y realizar un conteo en cámara de Neubauer con un microscopio. La siembra se realizó en función a la densidad poblacional tomando una alícuota de muestra y suspenderlo en medio preparado para introducirlo en la placa de 96 pocillos.

Se sembraron una razón de 50 mil células por pocillo donde resultó a 6 pocillos contando 4 emulsiones de aceites, un control positivo Cis-platino y un control negativo por cuadruplicado. Se dejó incubar la placa por 24 h para que se estabilizaran y pegaran las células en mono capa, se agregaron los tratamientos correspondientes a su pocillo y se dejó nuevamente en la incubadora por otras 24 h. Pasando estas últimas 24 h, se revisaron las placas y se les agregaron 20 microlitros de reactivo MTT y dejaron en incubación por 3 horas. Al pasar las 3 horas, se retiró el líquido de los pocillos y se suspendieron las sales generadas agregando 100 microlitros de DMSO. Por último, se realizó una lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Se guardaron los resultados y digitalizaron en Excel. La Figura 3 muestra la tinción obtenida después de realizar el ensayo MTT lista para la lectura en espectrofotómetro.

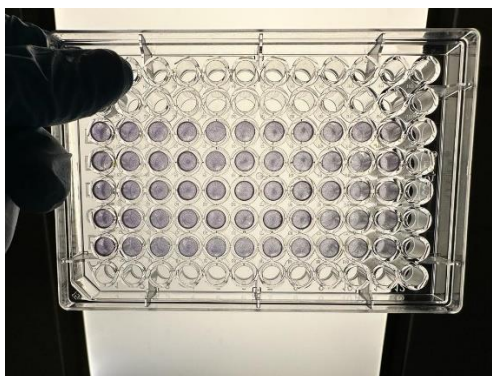


Figura 3. Tinción de la prueba MTT con DMSO.

Ensayo de Migración celular

En esta etapa experimental, las células se evaluaron conforme a un blanco donde este no tendría ninguno de los tratamientos por evaluar. Se observó de forma cualitativa la migración correspondiente a que tan rápido o cuanto es que se cerraba un estriado que se le hizo al cultivo en una placa de 12 pocillos.

Primero se despegaron las células del cultivo crecido en una caja para cultivo en monocapa T75 en condiciones asépticas dentro de la campana de bioseguridad. Posteriormente se aplicó a las células un lavado de PBS para retirar las impurezas y se agregaron 3 mL de tripsina. Después de haberse agregado la tripsina se incubaron por 5 minutos a 35°C y 5% de CO₂ en una incubadora, esto para que la tripsina actuara más eficazmente y despegara las células en cuestión.

Una vez se despegaron estas células, se pasó todo el líquido a tubos Falcón de 15 mL para posteriormente usar la centrífuga y concentrar las células en el fondo del tubo. Transcurridos los 5 min de la centrifugación, se retiró el tubo de la misma y en la campana de bioseguridad se extrajo el sobrenadante. El cúmulo que se obtuvo en el fondo se resuspendió con 1 mL de medio DMEM con el fin de poder tomar una muestra, teñirla y realizar el conteo celular correspondiente para calcular los microlitros que se tomarían en el sembrado. Una vez se obtuvo esta relación de las células contenidas en la muestra tomada para el conteo y las células suspendidas en el tubo Falcón, se extrajeron los microlitros correspondientes para sembrar 200 mil células por pocillo en la placa correspondiente.

Se incubaron las placas de pocillos todo un día, se observaron al microscopio y se le realizó una estría en forma de cruz a los pocillos con puntas de 200 microlitros estériles dentro de la campana de bioseguridad. Se les realizó un lavado delicadamente con PBS frío solo para extraer las células afectadas por la intervención del corte y que no se volvieran a pegar en ese espacio vacío. Se les agregó los tratamientos correspondientes y se dejó actuar por un día completo en la incubadora. Para finalizar, al siguiente día se extrajo el tratamiento y se le agregó medio DMEM para observar la migración de las células al cubrir la herida generada, se observaron todos los días hasta que el pocillo control cerrara completamente y se tomó evidencia fotográfica. Se puede apreciar, en la Figura 4, el corte inicial efectuado en los pocillos para en ensayo de migración celular pasando las 24 h de la inoculación y antes de someter los pocillos con sus respectivos tratamientos de Cisplatino y CEO.

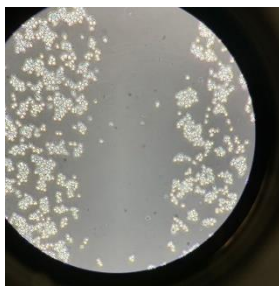


Figura 4. Corte en pocillo para HT-29 observado en microscopía

Ensayo Western Blot

Para el ensayo Western Blot se requirió una extracción de las proteínas intermembranales, las cuales son caspasa 3 y caspasa 9 para evaluar la ruta de muerte celular que toma la célula en cada tratamiento. La extracción de las proteínas se basa en una lisis membranal con buffer RIPA el cual actúa con un detergente rompiendo la membrana y exponiendo los compuestos dentro de ella. Al obtener las proteínas se sometieron a un gel de acrilamida y una electroforesis para la separación molecular por tamaño. Se transfirieron los geles a una membrana de nitrocelulosa, se agregó un anticuerpo primario y se bloqueó con leche en polvo las demás posibles adiciones que pueda tener. Por último, se adhirió un anticuerpo secundario y se reveló con una solución reveladora que tiñe la membrana.

Una vez obtenida las proteínas, se realizó un gel de acrilamida con un grosor de 1.5 mm. Se lavó el cristal donde se pondría el gel concentrador y el gel separador. Se armó el cristal con la ayuda de un soporte y unos cojinetes en la parte inferior para evitar fugas. Ya armado se agregó agua hasta cubrir y se verificó que no existieran fugas. Mientras se dejaba la estructura armada, se verificaban los pH de los buffers correspondientes a los geles, siendo 6.8 para el gel concentrador y 8.8 para el gel separador. Al comprobar que no existía fuga en el montaje se retiró el agua. Para el gel separador se mezcló 3.6 mL de acrilamida líquida junto con 2.25 mL de buffer pH 8.8, 3.15 mL de agua destilada, 50 microlitros de PSA al 10% y 5.63 microlitros de TEMED. Se micropipetió rápidamente la mezcla para que no solidificara a 2/3 del volumen del cristal montado. Al solidificarse el primer gel, se preparó el segundo gel concentrador con los siguientes volúmenes; acrilamida líquida 375 microlitros, buffer pH 6.8 750 microlitros, agua destilada 1.8 mL, PSA 10% 30 microlitros y TEMED 3 microlitros. Se llenó el restante del cristal con este líquido y se instaló el peine con 8 pocillos.

Mientras solidificaba el gel de acrilamida, se desnaturalizó la proteína a baño maría por 10 min junto a un reactivo para teñir la proteína en la electroforesis. Transcurrido los 10 min se cargó el gel con las proteínas y un marcador de peso molecular. Se corrió el gel dentro de una cámara con buffer de corrida por un lapso de 2 horas a 100 V. La transferencia del gel a la membrana y el bloqueo lo realizo mi compañera encargada por falta de tiempo para poder realizarla. La Figura 5 muestra el gel de acrilamida después del proceso de electroforesis para proteínas sumergido en una solución de Commassie para revelar las bandas resultantes.

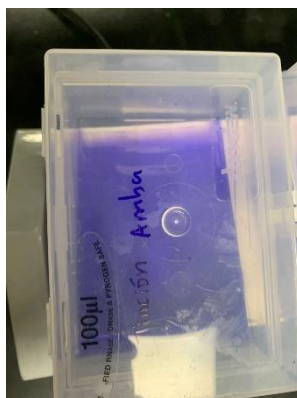


Figura 5. Tinción de gel poliacrilamida en solución Commassie

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Arranque de líneas celulares

El arranque de las líneas celulares comenzó con descongelar un criovial y expandir la línea en cajas para cultivo celular en monocapa, estas se hicieron a lo largo de toda la experimentación debido a la naturaleza de la tesis por demostrar. Los resultados del crecimiento celular fueron muy satisfactorios a tal punto que se tuvo que congelar varias muestras por la confluencia de la línea en la caja y lo fácil que era su manipulación siendo una línea celular muy resistente.

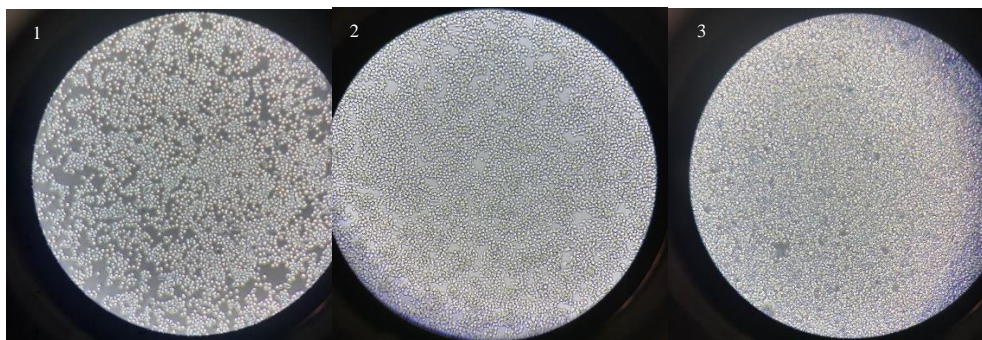


Figura 6. Visualización de tres etapas del crecimiento de la línea HT-29 en microscopía óptica de campo claro a 40X ;1 recién sembradas; 2 pasando 48 h; 3 pasando 96 h.

Como se puede observar en la imagen 6, se puede apreciar la viabilidad de la célula y un aumento en la densidad poblacional dando como resultado una línea muy sana y muchas células para trabajar en los siguientes experimentos.

Ensayo MTT

Los resultados obtenidos en la experimentación de viabilidad celular, después de someter la línea HT-29 a distintos tratamientos que contenían los aceites esenciales de clavo de olor, indican que efectivamente existe una acción de muerte celular, además señalan el índice de letalidad 50 (IC₅₀). Este índice indica una dosis mínima para llegar a un 50% de muerte celular. Esta se comparó con un fármaco control comercial específico para las quimioterapias de nombre Cisplatino, dando como resultado los gráficos de las Figuras 7 y 8;

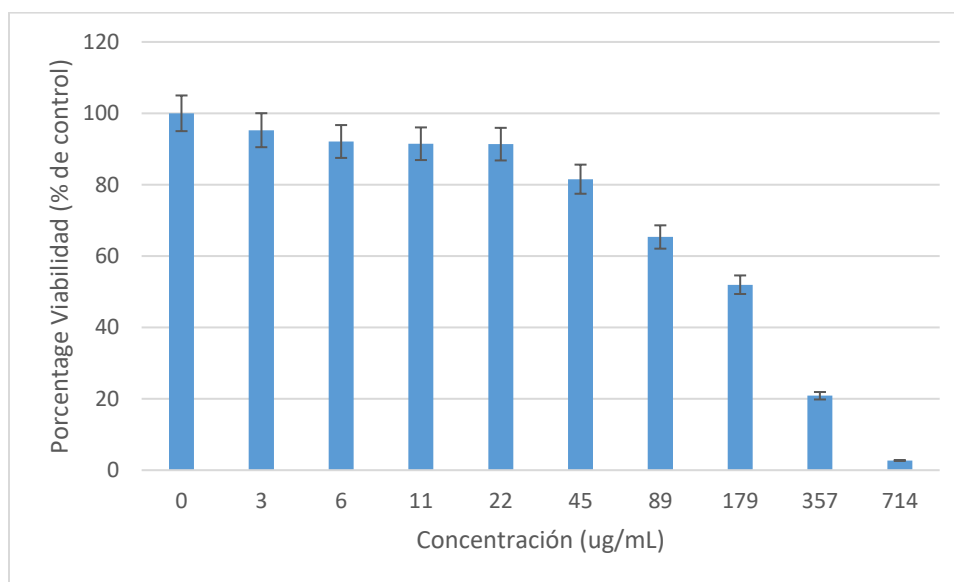


Figura 7. Viabilidad celular en HT-29 expuesto a diferentes concentraciones de Cisplatino.

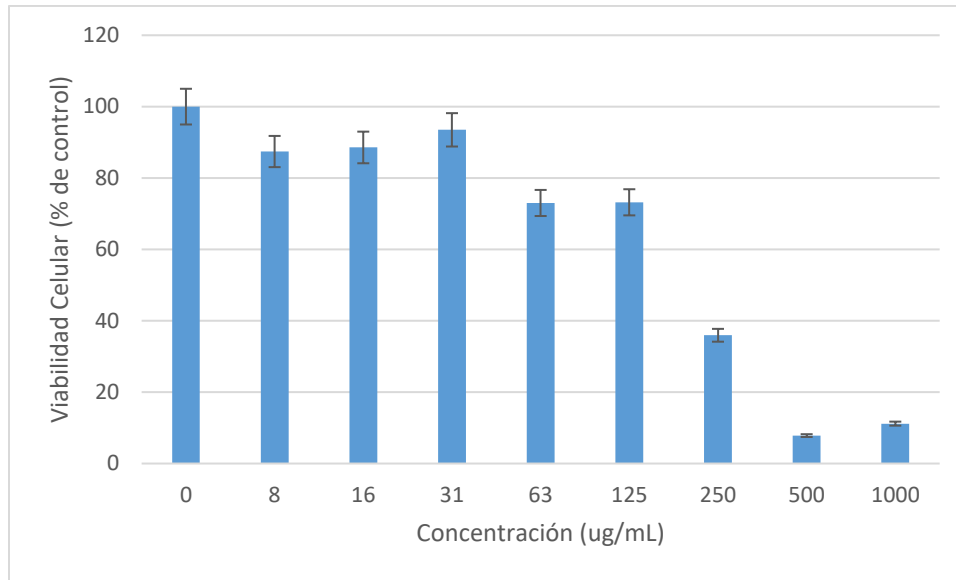


Figura 8. Viabilidad celular en HT-29 expuesto a diferentes concentraciones de aceite esencial de clavo.

Como se puede apreciar, los resultados de la Figura 7 muestran que la eficiencia del aceite esencial de clavo por sí solo alcanza un IC_{50} entre 125 ug/mL y 250 ug/mL. Al comparar los resultados de la Figura 7 vs. Figura 8, se observa que la diferencia entre las concentraciones utilizadas para los IC_{50} de cada tratamiento no está muy alejada entre sí, siendo esto alentador como alternativa para tratamientos futuros contra cáncer de colon.

Ensayo de Migración celular

La migración celular ayudó a evaluar el efecto post-tratamiento de las células y como es que estas migraban nuevamente a un espacio en el cual se estiró para dejarlo libre. Esto es importante porque muestra el comportamiento de la célula bajo un efecto de estrés.

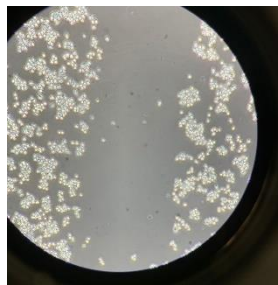


Figura 9. Corte en pocillo para HT-29 observado en microscopía

La Figura 9 representa el corte 24 h después del sembrado en las placas y antes de efectuar los tratamientos correspondientes. Al efectuar los tratamientos se dejó en incubación por otras 24 h y posteriormente se le generó un cambio de medio y se incubaron por 8 días.

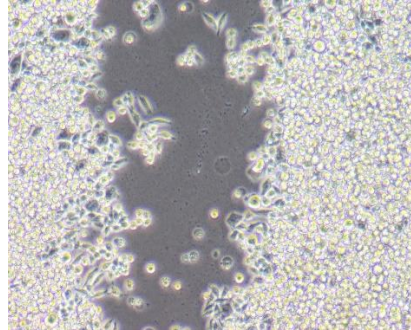


Figura 10. Ensayo de migración celular después de 8 días que se efectuaron los tratamientos (control)

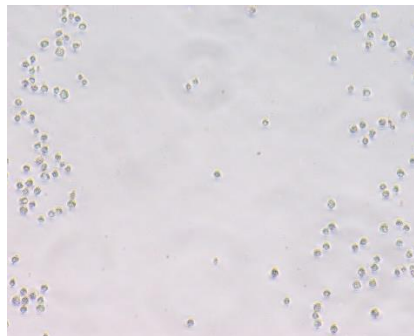


Figura 11. Ensayo de migración celular después de 8 días que se efectuaron los tratamientos (CISplatino)

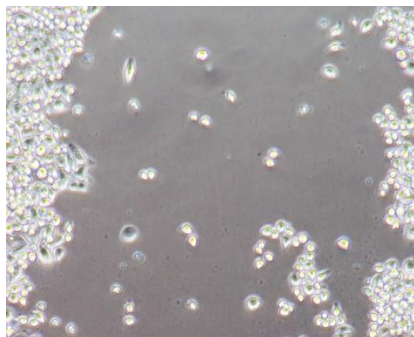


Figura12. Ensayo de migración celular después de 8 días que se efectuaron los tratamientos (CEO)

Después de esa semana se volvieron a tomar fotografías dando como resultado las Figuras 10, 11 y 12. La Figura 10 son las células sin tratamiento (control) y claramente se ve que su actividad celular no se vio afectada de ninguna manera, por otro lado, en la imagen 9 la muerte celular resulto ser demasiado agresiva y lo único que se observa en este campo son los restos de las células que alguna vez estuvieron ahí. Por último, la imagen 10 son las células tratadas con el CEO dando a conocer que no tuvo la recuperación que el control y si afecto directamente al comportamiento celular sin la agresividad efectuada del fármaco contratipo.

Ensayo Western Blot

El ensayo de Western Blot confirmó el efecto que tiene el CEO en las células, esto por la extracción de proteínas remanentes de las células apoptóticas haciendo una relación entre el tamaño de las procaspasas y que tipo de ruta molecular se activó en la célula. En este caso se evaluó la existencia de procaspasas 3 y 9 así como PARP (enzima que participa en la reparación de DNA) para confirmar o denegar la activación de esta ruta molecular.

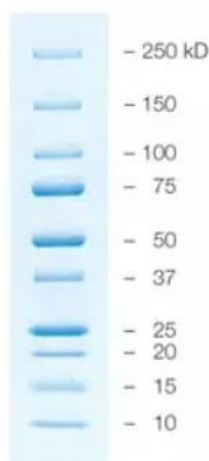


Figura 13. Marcador de peso molecular “Precision Plus Protein All Blue Standards”.

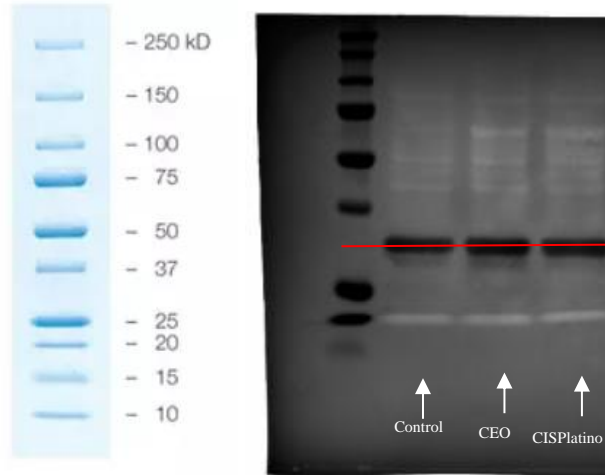


Figura 14. Gel de acrilamida cargado con CISplatinio y CEO para identificar procaspasa 3.

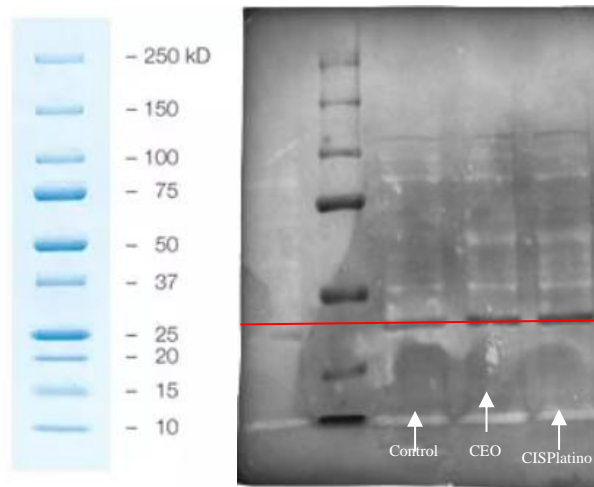


Figura 15. Gel de acrilamida cargado con CISplatinio y CEO para identificar procaspasa 9.

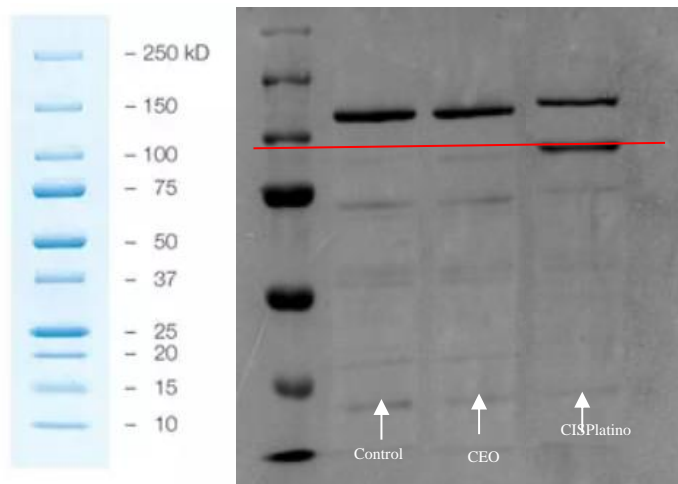


Imagen 16. Gel de acrilamida cargado con CISplatino y CEO para identificar PARP.

Como se aprecia en las Figuras 15 y 16 no existe una activación en la ruta apoptótica de caspasa 3 y 9 respectivamente, ya que las procaspasas siguen estando en la célula con su peso molecular completo y no tuvo una fragmentación, las procaspasas tienen un peso molecular de alrededor de 30-50 kD y al visualizarlo con el marcador de peso molecular existen las bandas correspondientes a ese peso. La Figura 16 tampoco muestra una activación de la enzima PARP (peso molecular de 85 kD) corroborando así que no existió una fragmentación nuclear efectuada.

Para concluir, los resultados de la experimentación con MTT para la viabilidad celular arrojó datos de interés debido a que no existe una amplia diferencia en la concentración requerida para el IC₅₀ de Cisplatino (179 µg/mL) y el CEO (250 µg/mL, considerando que en esta concentración existe un 60% de muerte celular). Por otra parte, al observar el comportamiento de la migración celular, se notan cambios sumamente drásticos en la agresividad de acción efectuada por el fármaco contratipo (Cisplatino) con respecto al CEO, confirmándonos de esta manera que los efectos adversos pueden minimizarse en gran medida. Por último, la corroboración de la ruta molecular de muerte celular programada resultó negativa para las rutas de caspasas 3 y 9 apoyando a este resultado la falta de la enzima PARP, por lo que se tendrá que diseñar otras experimentaciones con el objetivo de puntualizar qué mecanismo de muerte celular se efectúa en las células afectadas.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] NIH, «¿Qué es el cáncer?», Instituto Nacional del Cáncer, 2023. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>(accedido el 28 de agosto de 2023).
- [2] G. Cervantes Sanchez *et al.* «Recomendaciones para diagnóstico y tratamiento del cáncer de colon y recto en México». SciELO. [En línea]. Disponible: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2565-005X2019000400265#aff2 (accedido el 28 de agosto de 2023.)

- [3] AMGEN, «El cáncer colorrectal avanza del 4° al 3° lugar de incidencia en la población mexicana», AMGEN, 2023. [El cáncer colorrectal avanza del 4° al 3° lugar de incidencia en la población mexicana. \(amgen.com.mx\)](https://www.amgen.com.mx) (accedido el 28 de agosto de 2023).
- [4] CIATEJ, «Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible». CIATEJ, 2023. <https://www.ciatej.mx/el-ciatej/quienes-somos> (accedido el 28 de agosto de 2023.)
- [5] CIATEJ, «Biotecnología Médica y Farmacéutica». CIATEJ, 2023. Disponible: <https://www.ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-medica> (accedido el 28 de agosto de 2023.)
- [6] CIATEJ, «Moisés Martínez Velázquez». CIATEJ, 2023. <https://www.ciatej.mx/investigacion/investigador/dr-moisés-martínez-velázquez> (accedido el 28 de agosto de 2023.)
- [7] ResearchGate, «Moisés Martínez Velázquez». ResearchGate, 2023. [Moisés MARTINEZ-VELAZQUEZ | Research Scientist | Ph.D. | Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara | CIATEJ | Medical and Pharmaceutical Biotechnology Unit | Research profile \(researchgate.net\)](https://www.researchgate.net/profile/Moisés-Martínez-Velázquez) (accedido el 28 de agosto de 2023).
- [8] American Cancer Society, «Cirugía contra el cáncer de colon | Tipos de cirugía contra el cáncer de colon». American Cancer Society, 2020. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/cirugia-del-colon.html> (accedido el 28 de agosto de 2023).
- [9] American Cancer Society, «Ablación y embolización para el cáncer colorrectal». American Cancer Society, 2020. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/ablacion-emoblizacion.html> (accedido el 28 de agosto de 2023).
- [10] American Cancer Society, «Quimioterapia contra cáncer colorrectal | Químico contra el cáncer de colon y recto». American Cancer Society, 2020. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/quimioterapia.html> (accedido el 28 de agosto de 2023).
- [11] American Cancer Society, «Radioterapia contra el cáncer colorrectal | Radiación para tratar el cáncer colorrectal». American Cancer Society, 2020 <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/radioterapia.html> (accedido el 28 de agosto de 2023).
- [12] American Cancer Society, «Terapia dirigida de medicamentos contra el cáncer colorrectal | Medicamentos dirigidos contra cáncer de colon o recto». American Cancer

- Society, 2020. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/terapia-dirigida.html> (accedido el 29 de agosto de 2023).
- [13] NHI, «Tratamiento del cáncer de colon». Instituto Nacional del Cáncer, 2022. https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq#_141 (accedido el 29 de agosto de 2023).
- [14] American Cancer Society, «Inmunoterapia contra el cáncer colorrectal | Inmunoterapia para el cáncer de colon o recto». American Cancer Society, 2020 <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/inmunoterapia.html> (accedido el 29 de agosto de 2023).
- [15] NHI, «Tratamiento del cáncer de colon». Instituto Nacional del Cáncer, 2022. https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq#_340 (accedido el 29 de agosto de 2023).
- [16]GNP, «Noticia GNP Seguros atendió más de 350 casos de cáncer de colon». GNP Seguros - Vivir es increíble, 2020.<https://www.gnp.com.mx/noticias/GNP-Seguros-atendio-mas-de-350-casos-de-cancer-de-colon-durante-2020> (accedido el 29 de agosto de 2023).
- [17] J. N. Haro González, G. A. Castillo Herrera, H. Espinosa Andrews y M. Martínez Velázquez. «Clove Essential Oil (Syzygium aromaticum L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health». MDPI, 2021. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/21/6387> (accedido el 29 de agosto de 2023).
- [18] MERCK, «MTT-Assayprotokoll für Zellviabilität und Zellproliferation». Merck | Germany, 2023. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt> (accedido el 29 de agosto de 2023).
- [19] Molecular Devices, «Ensayos de migración celular». Molecular Devices, 2023. <https://es.moleculardevices.com/applications/cell-imaging/cell-migration-assays> (accedido el 29 de agosto de 2023).
- [20] C. Manzano Basalo. «Estudio in vitro de la supervivencia de células tumorales irradiadas con rayos X». Archivo Digital UPM, 2019. https://oa.upm.es/57044/1/TFG_CARLOS_MANZANO_BASALO.pdf (accedido el 29 de agosto de 2023).

[21]C. Torrealba. «Introducción a Western Blot». AllScience, 2019. <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/introduccion-a-western-blot> (accedido el 29 de agosto de 2023).

2. Productos

Tabla1. Ficha descriptiva de los datos obtenidos.

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de apoyo a centros de investigación externos I.
Nombre del proyecto	Evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de clavo contra la línea celular HT-29 de cáncer de colon <i>in vitro</i> en el CIATEJ Guadalajara
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Análisis de emulsiones generadas a partir de aceites esenciales de clavo como cotratamiento contra el cáncer de colon efectuados en los laboratorios de CIATEJ Guadalajara, como apoyo a un estudiante de doctorado.
Autores:	Luis Alberto Sepúlveda Galindo

Producto

El producto generado fue meramente el apoyo en los análisis y evaluaciones del CEO así como este reporte que podrá servir como un apoyo a la investigación que se estará realizando en un futuro, y quien decida continuar con ella llegue a observar qué fue lo que se hizo, cómo y por qué se hizo, así como los resultados para que planifique meticulosamente las experimentaciones futuras. A continuación, se muestra una tabla con el resumen de los análisis realizados con base en los resultados obtenidos.

Tabla 1. Descripción de los resultados según la experimentación realizada

Evaluación por:	Descripción de resultados
Experimentación de MTT	Los datos obtenidos por la metodología de MTT ayudó a corroborar la citotoxicidad celular de las emulsiones suministradas por el encargado de la tesis, dando como resultados positivos a una acción de muerte celular para la línea cancerígena HT-29.

	Esto bajo condiciones <i>in vitro</i> y sin conocer realmente que ruta de muerte celular se lleva a cabo en la célula.
Experimentación de migración celular	La migración celular fue un ensayo de índole cualitativo donde se observaba la actividad de la célula para reproducirse después de un corte y efectuándole un tratamiento, esto con el fin de evaluar la efectividad post tratamiento de las emulsiones de clavo. Se efectuó un resultado negativo (si crecimiento) en comparación al control (sin tratamiento).
Experimentación de Western Blot	La experimentación de Western Blot fue de suma importancia en esta investigación, porque si bien los resultados previos fueron positivos en la acción del aceite de clavo, no especificaban que tipo de ruta apoptótica era la que seguían las células para tener muerte. Por ello la extracción de proteínas postapoptóticas nos ayudaron a identificar que la ruta apoptótica no es por vía de caspasas ni PARP, por lo que se generara otra experimentación para ROS (especies reactivas de oxígeno) con el fin de avanzar en la investigación.

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

El estudio del cáncer es de suma importancia social, esto debido a que el estilo de vida de las personas que componen la sociedad hace que la contaminación vaya en aumento siendo este uno de los factores principales en la inducción de las mutaciones genéticas. A pesar de que existen normativas y leyes, estas difieren entre cada país y es por ello por lo que las cifras de las enfermedades son muy variables en cada región. El cáncer es una enfermedad multifactorial, aleatoria y las probabilidades de desarrollarlo aumentan en edades avanzadas,

las personas de 60 años o más representan un gran grupo de riesgo para esta anomalía de comportamiento celular.

Este PAP me sirvió mucho para darme cuenta de los conflictos y dificultades que las personas enfrentan en la vida real, donde no solo los estudiantes o doctores del CIATEJ tienen sumo interés en estudiar a fondo cualquier tipo de cáncer, sino otros centros públicos y privados también comparten el mismo interés para llegar a desarrollar tecnologías y tratamientos innovadores que minimicen el impacto psicológico, el desgaste físico y las dificultades económicas, tanto personales como familiares, que esta enfermedad atrae a la vida de una persona. Podría decir que por parte del equipo de investigación al cual me integre, mi director de PAP, Dr. Moisés Martínez Velázquez, tiene mucha experiencia en el área de oncología y nos transmitió la importancia de esta investigación al hacernos preguntas, más allá de lo técnico, humanas donde estas nos hicieron reflexionar sobre el que es lo que yo puedo hacer por mi país para ayudar a los demás. Por último, cabe resaltar que el aceite esencial de clavo tiene demasiado potencial como un tratamiento de cáncer en etapas tempranas o un cotratamiento en etapas tardías por su citotoxicidad comparable con el fármaco Cisplatino, pero difiriendo en su agresividad de afección.

3.2 Aprendizajes logrados

Lo que podría decir que aprendí con esta experiencia fue a seguir un orden de trabajo en las experimentaciones, ya que a pesar de que se tenían diversas experimentaciones proyectadas, no podíamos realizarlas sin antes haber obtenido resultados previos de las que se estaban haciendo. Muchas veces nos ocurrió obtener resultados totalmente diferentes a los que planeábamos y eso nos orillaba a comenzar un diseño de experimentación diferente al planeado. También el hecho de trabajar en un entorno desconocido y real me enseñó a tener mente fría y controlar mis sentimientos de ansiedad, angustia, miedo y frustración ante lo desconocido. Otro punto muy importante fue el darme cuenta que los conocimientos que aprendí a lo largo de mi vida universitaria sí tienen un valor real y que, puestos en práctica, pueden llegar a generar un cambio.

3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

	Competencia	Evidencia	Relevancia/Fortaleza*	Competencias Nuevas	Competencias Potencializadas	
<p>Categoriza las competencias en conocimientos, habilidades y actitudes.</p> <p>Escribe la o las evidencias de cada competencia y su relevancia.</p>	Conocimientos	Química, bioquímica y biología	Participé en el análisis de medios de cultivo para observar el mejor crecimiento sobre una cepa bacteriana específica con el fin de obtener biomasa y por ende un producto de alto valor comercial.	Puntualidad de investigación, desecho de información no relevante, profundización de la información seleccionada, reforzar mis otros conocimientos.	Para el apartado de conocimientos, considero que aprendí a dar un seguimiento lógico en la investigación, es decir, hacer primero lo primero, obtener resultados, analizarlos, discutir con el equipo y tomar una decisión de que es lo que viene después.	Reforcé en gran medida todas las competencias que describí al inicio del semestre, esto porque todo el tiempo adquiría conocimientos sobre el comportamiento biológico bajo ciertos parámetros y el generar resultados cuantitativos, así como cualitativos mejorar la comprensión y dan argumentos sólidos a la investigación.
		Estadística	Participo en un estudio estadístico con el fin de demostrar y analizar el mejor tratamiento correspondiente hacia dos líneas de cáncer.	Tomar decisiones puntuales para programar las experimentaciones futuras reduciendo el número de tratamientos y seguir efectuando las relevancias del mejor de estos con el objetivo de entregar resultados cuantitativos y lógicos.		
		Buenas prácticas de laboratorio	Manejar correctamente las prácticas de inocuidad, así como el uso correcto de la instrumentaria de laboratorio para el cultivo de células animales (ITESO, CIATEJ).	Me ha ayudado a mejorar el manejo de la instrumentaria y sentirme más cómodo con ella, dando como resultado una fluidez en la experimentación del laboratorio		

		Microbiología	Identificación de manera cualitativa sobre un cultivo contaminado de células animales en comparación de levaduras y bacterias (bacilos y cocos) con el fin de determinar dicha contaminación no generada por nuestro equipo de investigación.	Técnicas cualitativas de como identificar los organismos no deseados en un cultivo animal causado por mano ajena al equipo perteneciente de la investigación en cuestión y la toma de decisiones causadas por este problema.		
	Habilidades	Diseño de protocolos	Ayude a diseñar protocolos con material existente en el laboratorio para tres tipos de análisis experimentales.	Ayudo a ampliar mi búsqueda sobre las metodologías aplicadas en diferentes artículos de investigación y buscar puntualmente cada metodología a un protocolo que se adaptara a los reactivos existentes.	Una de las habilidades que podría decir que aprendí fue a primero escuchar bien lo que se tiene que hacer y lo que ya se hizo, posteriormente planear, un paso a la vez, lo que se tiene que hacer, al obtener los resultados responder a las siguientes preguntas básicas ¿Qué representan? Y ¿Para qué me sirven?	Fortalecí mi capacidad a generar alternativas en los diseños de experimentos, esto para buscar alternativas factibles en caso de que no se cuente con un reactivo a la mano y el capital no permita que se llegue a comprar. Para la discusión siento también que hice un gran avance porque amplió mi vocabulario y me enseñaron primero a observar, analizar, pensar y discutir.
		Discusión en equipo	Planeación de los diferentes ensayos programados para análisis puntuales con el fin de crear estadísticos y datos cuantitativos sobre la experimentación.	Me ayudó a proponer ideas, así como una discusión proactiva entre los integrantes del equipo de investigación seleccionando información relevante para		
		Análisis de resultados	Al llevar varias experimentaciones en	Me ayudó a utilizar diferentes técnicas de		

		solitario para el mejor tratamiento diseñado contra el cáncer de colon y mama, obtuve resultados que requerí interpretar de forma adecuada para que fuesen entendibles para todo el equipo.	análisis, interpretar estos resultados y discutirlos con el equipo para posteriormente generar un reporte de la experimentación realizada.		
	Elaboración de reportes de resultados	Cada semana se elaboró un reporte de resultados para presentarlo a la directiva con el fin de informar los avances de la investigación, así como los retos y estancamientos de la misma para que en la reunión semanal se planeara el enfoque de los siguientes ensayos o experimentaciones.			
	Actitudes	Al cometer errores en las experimentaciones del laboratorio escucho activamente la retroalimentación inmediata que me dan mis supervisores y cambio mi técnica o me enfoco en cambiar mis	Me ha ayudado a mejorar en técnicas desconocidas y en el manejo de una instrumentaría de laboratorio nueva, así como la instrumentaría ya conocida pero menos moderna.	En actitudes no considero realmente que haya aprendido algo nuevo sino reforzar en gran medida las que presente al principio del semestre.	En lo que escucha activa refiere, mejore en gran medida porque me ayudó a darle seguimiento e integrarme rápidamente al equipo de trabajo, me hizo tener un contexto de que era lo que se estaba haciendo, porque se estaba haciendo, como se estaba haciendo y

			metodologías para evitar estos errores.			lo que se tenía que hacer. Hilando la escucha activa, la construcción de ideas mejoraron bastante por convivir con personas muy sabias y talentosas, haciéndome querer leer más sobre el tema y proponer ideas diferentes que en ocasiones ayudaron al equipo.
		Construcción proactiva de ideas	En las discusiones de los resultados, todos proponemos alternativas para las experimentaciones fallidas, el cómo cambiar el protocolo de experimentación sin manipularlo a favor de los resultados deseados del proyecto.	Me ha ayudado a pensar fuera de la caja, y ver cómo solucionar una problemática de manera diferente sin recargarla a favor de los resultados deseados del proyecto en cuestión.		
		Liderazgo	En un análisis de viabilidad celular para la respuesta después de la aplicación de los diferentes tratamientos, me dejaron encargado de la experimentación para observar cómo es que me comportaba al tener la primera decisión y el cómo guiaba al equipo para la recopilación de datos.	Confianza en ti mismo, aun teniendo pequeños fallos saber que al tener un equipo puedes confiar en los demás y así como tú los apoyas ellos te apoyaran.		
		Toma de decisiones	Al tener el liderazgo de una experimentación, se tuvo que investigar que metodologías serían las más viables en relación a los reactivos	Esto ayudó a mi parte de liderazgo y a tomar una decisión después de evaluar por lo menos tres alternativas construyendo los casos con		

			disponibles, para finalizar con una toma de decisión en particular con una optimización de tiempo.	las posibles amenazas, fortalezas, oportunidades y debilidades de cada uno, comparándolos entre ellos y descartando uno por uno hasta tener el mejor de las decisiones.		
--	--	--	--	---	--	--