

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE**

**Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales**

**Sustentabilidad y tecnología**

**PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)  
PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA  
SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL, ENERGÉTICA Y ALIMENTARIA I**



**ITESO, Universidad  
Jesuita de Guadalajara**

**4D08 PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA  
SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL, ENERGÉTICA Y ALIMENTARIA I  
Expansión de células mesenquimales de placenta humana en matrices  
biológicamente compatibles en CIATEJ y CEGINT**

**PRESENTAN**

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, Ana Paula Salcedo Uribe

Ing. en Biotecnología, Natalia Ramírez Zermeño

Profesor PAP: Dr. David José Mendoza Aguayo, Dr. N. Emmanuel Díaz Martínez

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 .....	6
1.2 Caracterización de la organización.....	8
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	10
1.4. Planeación de alternativa(s).....	12
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora .....	20
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos .....	31
1.7. Bibliografía y otros recursos .....	32
1.8. Anexos generales.....	36
2. Productos .....	36
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	37
3.1 Sensibilización ante las realidades .....	37
3.2 Aprendizajes logrados .....	39

# REPORTE PAP

## Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

*[Este texto deberá aparecer en todos los RPAP]*

*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) (coparticipación) 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, cocrear 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 “Expansión de células mesenquimales de placenta humana en matrices biológicamente compatibles en CIATEJ y CEGINT”, es la continuación de un proyecto iniciado en el semestre de primavera 2020. El objetivo principal del presente proyecto reside en la evaluación de la compatibilidad de matrices biológicas, tanto comerciales como caseras, con células mesenquimales de placenta humana (MSC) para la producción de cultivos en 3D.

El proceso experimental se dividió en tres objetivos específicos que permitieron asegurar su correcto desarrollo. Se inició por la caracterización de la línea celular de trabajo mediante un ensayo inmunocitoquímico, donde se encontró un marcaje positivo a los antígenos de superficie característicos de MSC, corroborando la integridad de las células.

El segundo objetivo consistió en la realización de una cinética preliminar y análisis de la proliferación celular en los microportadores (MP) comerciales (Corning® y CultiSpher) y los caseros de PLA (ácido poliláctico). Los resultados obtenidos revelan que los niveles celulares en los MP de PLA y el estándar de mercado (Corning®) son estadísticamente iguales, avalando su uso para los fines del proyecto. Asimismo, se recomienda realizar un análisis económico para evaluar la viabilidad de su uso a gran escala y asegurar la replicabilidad del proceso.

Finalmente, el tercer objetivo constituye la optimización del protocolo previamente establecido para la producción de los microportadores de PLA. Para esto, se introdujeron biorreactores al proceso, se actualizaron las técnicas de esterilización y se realizaron pruebas de esterilidad que permitieron asegurar el buen funcionamiento del nuevo protocolo.

### 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 proyecto es llevado a cabo dentro de las instalaciones del laboratorio de Biotecnología Médica y Farmacéutica (BMF) del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) en colaboración con el laboratorio Nivel II del Centro para la Gestión de la Innovación y la Tecnología (CEGINT) del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), siendo parte del Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales. Dichos entornos laborales proporcionan tanto las instalaciones como los equipos e insumos requeridos para la adecuada ejecución del proyecto.

Debido a la naturaleza de investigación en laboratorio, el proyecto se clasifica como de tipo experimental. La metodología y el seguimiento han sido ejecutados a lo largo de semestres anteriores con el apoyo de los ingenieros e ingenieras Diego Padilla, Amparo Sahagún, Mariana Mercado, Elke Islas, Ana Gabriela Alejandro, Ximena De Unánue y Judith Vázquez. Actualmente, se suma la participación de las estudiantes de ingeniería en Biotecnología Ana Paula Salcedo y Natalia Ramírez Zermeño. De igual manera, se cuenta con la dirección y asesoría de los doctores David José Mendoza, Emmanuel Díaz, Gabriela Porras y Blanca Valdivia.

#### Objetivo general

Evaluar la compatibilidad de distintas matrices biológicas con células mesenquimales de placenta humana bajo condiciones controladas para la producción de cultivos en 3D.

#### Objetivos específicos

- Caracterizar la línea celular de trabajo.
- Ensayar diferentes matrices tanto comerciales como sintéticas a base de PLA (ácido poliláctico).
- Estandarizar el protocolo de producción y esterilización de las matrices de PLA.

## 1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

Desde la aparición del cultivo habitual de células eucariotas hace más de cuatro décadas, los soportes más comúnmente utilizados para la promoción del crecimiento celular han sido manufacturados a partir de poliestireno o cristal, adquiriendo la configuración de una superficie bidimensional plana [1]. Incontables investigaciones publicadas, que abarcan desde el examen de agentes antineoplásicos hasta el análisis la biología del desarrollo, han dependido del formato 2D para la adhesión y el cultivo de células animales. No obstante, estos estudios han sido objeto de crítica debido a que se basan en la premisa de que la fisiología animal puede ser adecuadamente representada mediante una monocapa celular [2].

Resulta evidente que la disposición de una célula eucariota en un soporte bidimensional de vidrio o poliestireno no constituye una reproducción fiel de la matriz extracelular encontrada en el tejido nativo [3]. En consecuencia, se ha constatado una variabilidad significativa en una serie de respuestas biológicas complejas, tales como la expresión de receptores, la migración celular y la apoptosis, en comparación con las observadas en el órgano o tejido original [2].

Las matrices de cultivo tridimensional fueron desarrolladas para superar las limitaciones arquitecturales de los cultivos bidimensionales. Dichas matrices porosas cuentan con la capacidad de promover el crecimiento, la organización e incluso la diferenciación celular en su estructura [4]. Así entonces, el objetivo final del diseño de matrices para cultivo 3D es imitar las características de la matriz extracelular (ECM) natural de tal manera que las células se comporten como lo harían *in vivo* [4].

La elección de los materiales para la fabricación de soportes (también conocidos como portadores) incluye metales, vidrios, polímeros, cerámicas y derivados de tejidos biológicos, así como mezclas de materiales [5]. Los polímeros son comúnmente utilizados debido a la posibilidad de controlar sus propiedades químicas y estructurales, además de que existe una variedad de métodos para su producción en escalas microscópicas y/o nanoscópicas [4]. Así entonces, los materiales deben ser elegidos tomando en cuenta su disposición final.

En particular, los materiales biodegradables son utilizados con enfoques clínicos donde el organismo debe ser capaz de metabolizar los productos monoméricos sin despertar respuestas inmunológicas o el desarrollo de cápsulas fibrosas [2]. En este sentido, Lee *et al* [4] reportan una variedad de materiales poliméricos para la producción de matrices para cultivo 3D. Dichos materiales pueden ser clasificados como naturales o sintéticos (Tabla 1). Los autores resaltan que prácticamente cualquier sustancia que cambia de estado de líquido a sólido puede ser utilizada, aunque comúnmente se implementan polímeros sintéticos, especialmente PLA (ácido poliláctico), PGA (ácido poliglicólico) y sus mezclas copoliméricas [4].

**Tabla 1. Materiales para la producción de matrices tridimensionales**

Polímeros sintéticos	Polímeros naturales
Ácido Poliglicólico (PGA), Ácido poliláctico (PLA), Copolímero de Ácido poliláctico y poliglicólico (PLGA), Policaproactona (PCL), Polietilenglicol (PEG), Polivinilalcohol (PVA), Polipropileno Fumarato (PPF), Ácido Poliacrílico (PAA), Péptidos, ADN (polímeros naturales artificialmente preparados)	Colágeno, Gelatina, Hialuronato, Glicosaminoglicano, Quitosano, Alginato, Seda, Fibrina, Dextrano, Matrigel, etc.

Adicionalmente, el uso de PLA y PGA dentro del área médica fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en 1969 y 1971, respectivamente [6]. Asimismo, los biopolímeros son altamente utilizados en la industria farmacéutica dado que pueden acarrear medicamentos de diversas maneras, ya sea a través de una adsorción física, una unión química o al encapsular el medicamento dentro de una estructura polimérica en forma de esfera [7]. Esta encapsulación previene la modificación no deseada del medicamento o de la sustancia activa, proporcionando así una protección adicional [8].

Los fármacos son encapsulados en un portador polimérico apropiado, lo que habilita una liberación sostenida durante períodos que pueden extenderse desde días hasta años [9]. La elección de un portador biocompatible y que se descompone naturalmente permite que el medicamento alcance su destino deseado, al mismo tiempo que se regula la velocidad de liberación del medicamento mediante el uso de polímeros resistentes al entorno gástrico, y se logra un control espacial incorporando partículas magnéticas en la estructura del portador [10].

En cuanto a la producción de los microportadores, Costa *et al* [11] mencionan las técnicas de electroasporación y emulsificación por solventes. Se resalta que los portadores deben cumplir con las condiciones que establece la farmacopea con respecto a la esterilidad [12]. Sin embargo, algunos métodos propuestos para esterilizar, tales como la esterilización química con óxido de etileno, no son apropiados para poliésteres alifáticos biodegradables [13]. En contraste, la esterilización mediante irradiación gamma es ampliamente utilizada en dispositivos médicos que son sensibles al calor y se puede aplicar eficazmente a polímeros que se descomponen naturalmente y a sustancias farmacéuticas [11].

Costa *et al.* [11], describen otros métodos más accesibles para la esterilización de los microportadores, tales como métodos químicos para materiales que no resisten altas temperaturas, calor seco o húmedo, así como técnicas de exclusión molecular. Todos los métodos mencionados cuentan con sus desventajas, ya sea la posible formación de residuos tóxicos, la degradación del biopolímero o el tamaño de membrana.

Por su parte, en un estudio realizado por Rubí-Sans *et al* [14], se desarrollaron microtejidos utilizando una matriz derivada de células. La técnica se basa en el uso de ácido poliláctico y microportadores Cultispher® S como soporte, donde se cultivaron células madre mesenquimales de médula ósea de rata (rBM-MSCs).

Finalmente, los autores concluyen que todas las condiciones de microtejidos producen una matriz extracelular densa que rodea a los microportadores, y esto ocurre sin necesidad de utilizar factores de crecimiento [14]. De manera intrigante, cuando se combinaron ambos tipos de microportadores para formar microtejidos mixtos, se observó que las células se multiplicaban constantemente, secretaban una gran cantidad de matriz extracelular y estimulaban una respuesta angiogénica [14].

## 1.2 Caracterización de la organización

El presente Proyecto de Aplicación Profesional se lleva a cabo en el laboratorio de Biotecnología Médica y Farmacéutica (BMF) del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) en colaboración con el laboratorio Nivel

II del Centro para la Gestión de la Innovación y la Tecnología (CEGINT) del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO). El proyecto se encuentra bajo la coordinación del Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales del ITESO y cuenta con la dirección de los doctores David Mendoza y Emmanuel Díaz.

El laboratorio de BMF del CIATEJ se enfoca en abordar las demandas y desafíos del sector médico y farmacéutico en México. Su labor se centra en la investigación, desarrollo y transferencia de productos innovadores destinados a la prevención, diagnóstico, tratamiento y control de patologías humanas y veterinarias, teniendo en cuenta las bases moleculares de la salud y la enfermedad [15]. La dirección de este laboratorio está a cargo del Dr. Emmanuel Díaz.

Por su parte, los laboratorios que integran el CEGINT se encuentran bajo la dirección del Dr. Alejandro Arana. El centro tiene el objetivo de desarrollar proyectos orientados hacia un análisis continuo de la realidad, con un enfoque particular en temas relacionados con la salud, la alimentación y el medio ambiente [16]. Dichos proyectos se alinean con el propósito de promover un crecimiento económico que se ajuste a los principios de la ética profesional. Ambos centros de trabajo proporcionan tanto las instalaciones como los equipos e insumos requeridos para la adecuada ejecución del presente PAP.

Cabe resaltar que el proceso experimental se dividió en dos secciones distintas: la producción de microportadores y el cultivo celular. La primera fase del proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del CEGINT, ya que el centro ofrecía las facilidades necesarias para el proceso, como biorreactores, campana de extracción y solventes. Por otro lado, la etapa del cultivo animal se desarrolló en los laboratorios del CIATEJ bajo la supervisión del Dr. Emmanuel Díaz, quien proporcionó el equipo especializado, reactivos y materiales esenciales para el correcto desarrollo de los cultivos animales.

Los laboratorios mencionados anteriormente han sido diseñados de acuerdo con las directrices de las buenas prácticas de manufactura y de laboratorio, cumpliendo con rigurosos estándares de calidad. Están especialmente equipados para llevar a cabo investigaciones que

involucran células de origen animal, ya que cuentan con una amplia gama de recursos, incluyendo mesetas, detectores de humo, sensores de movimiento, campana de flujo laminar, incubadora de dióxido de carbono y microscopio invertido, además de otros equipos altamente especializados.

### 1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

La terapia con células troncales es un método fundamentado en el cultivo celular y la biología del desarrollo, aprovechando su capacidad de renovarse y diferenciarse con la finalidad de tratar numerosas enfermedades y lesiones [17] [18]. Gracias a las células troncales pluripotentes (embrionarias) y multipotentes (hematopoyéticas y mesenquimales) [19] obtenidas de embriones y médula ósea, placenta o sangre del cordón umbilical, respectivamente, es posible llevar a cabo ingeniería, regeneración y reparación de tejidos, terapia para enfermedades autoinmunes, hepáticas, óseas y cartilagosas [20], entre otras.

El cultivo de líneas celulares humanas para uso terapéutico se remonta a la década de 1950 con los ensayos que permitieron crear la vacuna con el virus del polio inactivado [21] que, de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud [22] en 1994 logró la erradicación la poliomieltis en la Región de las Américas. Asimismo, en 1980, con el auge de las tecnologías recombinantes para la producción de anticuerpos en biofármacos, se permitió la estandarización de los métodos de cultivo, el aumento del acervo científico y el progreso en dicha tecnología [23] que permiten establecer las bases para la producción de células troncales, como las mesenquimales, en procesos de mayor escala.

La manera en que se lleva a cabo el crecimiento de células troncales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) es en monocapa, suspensión y cultivo tridimensional [24], siendo este último el de mayor interés debido a su potencial para generar altos rendimientos de producción celular. El cultivo tridimensional permite un nivel de duplicación de la población del inóculo de hasta 4.0 [25], debido a que propicia la formación de agregados celulares que, de acuerdo con Jauković *et al.* [26], imitan mejor las características estructurales y funcionales del microambiente tisular nativo. El aprovechamiento de recursos como el

espacio y reactivos es mayor en este tipo de crecimiento, en comparación con el tradicional crecimiento en monocapa, el cual es en la superficie de recipientes de plástico o de vidrio con limitada superficie para la proliferación celular, medio de cultivo no homogéneo y con dificultad para medir parámetros de cultivo (pH, OD) [27].

En 1967, van Wezel propuso por primera vez el uso de micropartículas de plástico con reticulación de dextrano, el cual permitió establecer la adhesión celular a la esfera [27]. Conforme fue evolucionando dicha tecnología, se implementaron nuevos materiales para fabricar las micropartículas, también llamadas microportadores (MP), tales como poliestireno, vidrio y celulosa. En Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) realizados anteriormente en el ITESO por el Ing. Diego Padilla y coordinados por el Dr. David J. Mendoza y la Mtra. Aida Guerrero en el periodo de otoño 2020, se hicieron pruebas de estandarización del crecimiento tridimensional en un Spinner-flask (Corning ®) utilizando MP de poliestireno USP clase VI (Corning ®), recubiertos con matriz de colágeno, logrando un nivel de duplicación de la población del inóculo de 1.07 en un periodo de 2.5 días [28].

Como parte del avance tecnológico del crecimiento tridimensional de MSC, se han implementado gran variedad de materiales que le confieran al MP la polaridad y la densidad de carga adecuadas para que la adhesión celular esté presente. En el PAP del periodo primavera 2020, al cual se incorporó la Ing. Amparo Sahagún, se hicieron pruebas con un MP elaborado a partir de ácido poli láctico (PLA), que es un polímero biocompatible utilizado principalmente en la elaboración de material quirúrgico, cápsulas, prótesis, entre otros [29]. La elaboración de MP con dicho material permitió a los investigadores obtener una producción celular 2.24 veces mayor con respecto al periodo anterior, y una reducción de los costos de 47.73% [30].

Posterior a la implementación del PLA como material para los MP, se consiguió estandarizar su producción por el método de emulsión, así como la reticulación de la matriz que lo recubre: el colágeno. La Ing. Judith Vázquez y la Ing. Ximena De Unánue, en el periodo de primavera 2023, determinaron que el mejor método para la reticulación de colágeno es el del tratamiento

dehidrotermal (DHT) debido a que mejora la adhesión de la cadena peptídica en el polímero [31].

En el presente PAP (otoño 2023), se busca analizar la proliferación de las células con métodos de fluorescencia como el CellTracker (ThermoScientific) y su adhesión en los MP, así como otros métodos de caracterización de la línea celular, tales como inmunofluorescencia, citometría, capacidad de diferenciación a adipocitos, condrocitos y osteoblastos, cinética y citometría de flujo. Estas pruebas permiten establecer una correlación con el tejido de origen (en este caso, de placenta) validando la posición del linaje en la cual se encuentra (estromal o diferenciada), o bien, relacionadas con la línea celular en específico, como morfología y capacidad de proliferación [1] que, a su vez, serán herramientas útiles para su crecimiento en cultivo 3D.

Adicionalmente, se muestra la perspectiva de evaluar diferentes matrices para la reticulación en PLA en los MP, tales como la fibronectina y gelatina, para estandarizar las condiciones ideales para el cultivo tridimensional de MSC que prometa aumentar la producción de estas células con capacidad terapéutica. Los pasos anteriores se asumen con el reto de trabajar en todo momento en condiciones de esterilidad e inocuidad, para conseguir el crecimiento adecuado de los cultivos celulares.

#### 1.4. Planeación de alternativa(s)

Como ya se mencionó, la parte experimental de este PAP se dividió en dos secciones: la producción de microportadores y el cultivo celular. A continuación, se describen los pasos requeridos para realizar la segunda sección del proyecto.

##### *Proliferación celular*

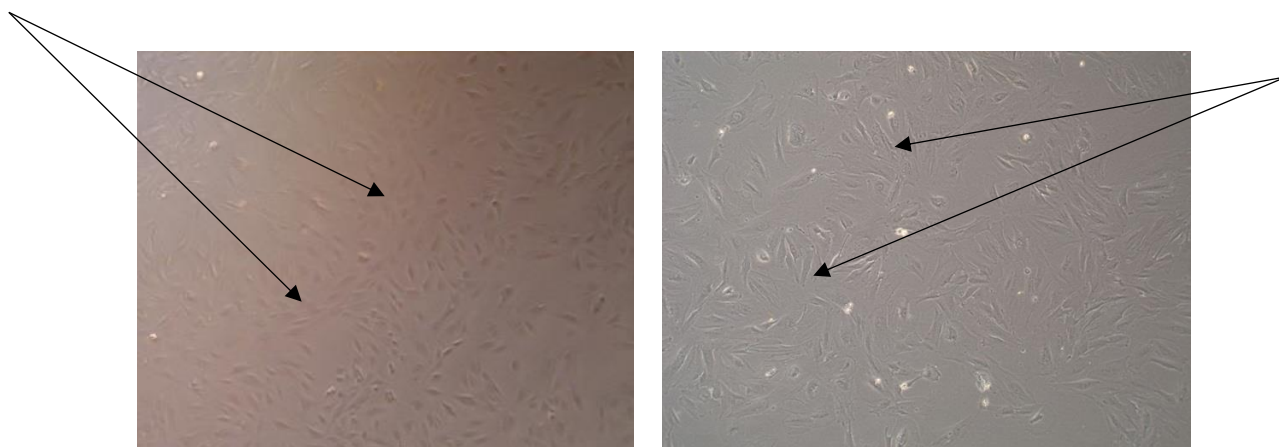
El primer paso para la expansión de MSC (células troncales mesenquimales) en matrices biológicamente compatibles, es contar con una línea celular saludable, apta para la experimentación. Esto se logra mediante el adecuado manejo de su ambiente, lo cual involucra la composición idónea del medio de cultivo, condiciones de asepsia, una superficie

que le permita establecer interacciones entre células y con la matriz de proliferación, así como la temperatura y composición del aire adecuadas [1]. La magnitud exacta de cada condición utilizada para la proliferación celular se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones de crecimiento de MSC**

Condición	Magnitud	Unidad
Suero Fetal Bovino	10	%
Aminoácidos no esenciales	1	%
Antibiótico	1	%
Medio de cultivo DMEM	87	%
Glutamax	1	%
Temperatura	37	°C
CO <sub>2</sub>	5	%

El mantenimiento de la línea celular se llevó a cabo siguiendo las BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) y bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas por lo que, durante su monitoreo con el microscopio, las células presentaron adhesión a la superficie, morfología fibroblastoide y rápido crecimiento en el recipiente de cultivo T-75. La Figura 1 muestra las células que se utilizaron para las pruebas posteriores.



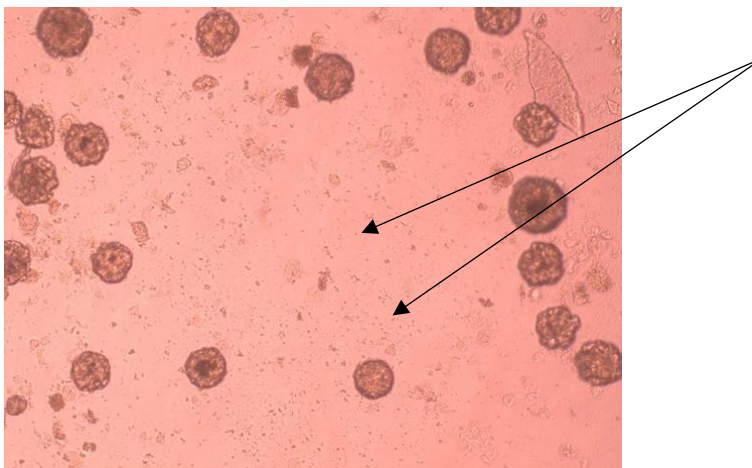
**Figura 1. MSC (señaladas por flechas) en cultivo bidimensional vistas en microscopio Zeiss Axio Vert A1. A) Células con confluencia del 85% (10X), y B) células con morfología fibroblastoide (20X)**

Las MSC fueron adquiridas del laboratorio biotecnológico Lcells, el cual cuenta con el número de licencia otorgado por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS, Ciudad de México) **12-TR-14-039-0001** que establece los requisitos

generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, que se alinea con las BPL y que se han implementado en este PAP, especialmente en cuanto al apartado 7.4 Manipulación de los ítems de ensayo o calibración. Esto representa una ventaja, ya que se asegura la calidad del cultivo y las prácticas de laboratorio no intervienen con la normativa de bioética. El manejo de la línea celular permitió que las células no presentaran arresto en su crecimiento, así como la presencia de contaminación bacteriana, en comparación con el trabajo de PAP anteriores [30], [31].

### *Producción de microportadores*

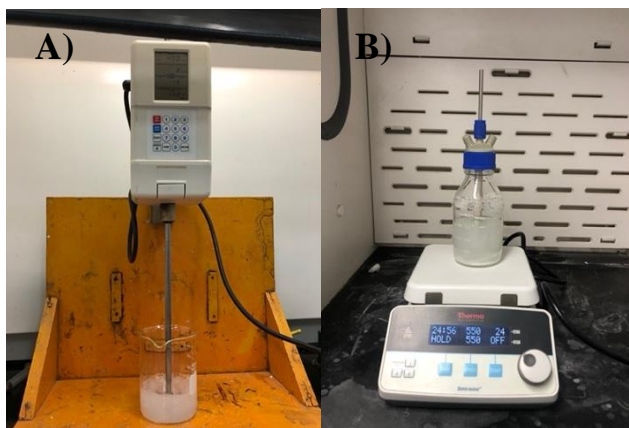
En PAP anteriores ya se había establecido la problemática de evaluar la biocompatibilidad de MSC en distintas matrices [28], [30], [31], por lo que el proceso de su producción no se modificó. No obstante, una vez que se iniciaron las pruebas con los microportadores de PLA tratados con colágeno, éstos presentaron contaminación bacteriana al día 5 de cultivo (Figura 2), a pesar de no observarse en días anteriores. La etapa de crecimiento exponencial de bacterias que se encuentran comúnmente en contaminación de cultivos animales [1], tales como *Escherichia coli*, es de aproximadamente 1 h [32], por lo que ésta debió haberse presentado al día siguiente de la inoculación, a diferencia de la prueba, que tomó 5 días en presentarla.



**Figura 2. Cultivo de MSC con MP de PLA (10X) con contaminación (señalada con flechas).**

Se determinó que el PLA es capaz de encapsular bacterias durante el proceso de emulsión, por lo que se modificó el método tanto de emulsificación como el de esterilización. En PAP

anteriores [31] el proceso de emulsificación se llevaba a cabo en un sistema completamente abierto y en un agitador industrial (Figura 3), no obstante, el tamaño del equipo impedía su adecuada esterilización, por lo que se decidió cambiar el recipiente por un biorreactor con agitador magnético previamente esterilizado por autoclave, ya que las condiciones de temperatura y presión elevada (121°C y 15 psi) permiten que el agua de vapor penetre y elimine la viabilidad celular [33].



**Figura 3. A) Anterior sistema de agitación para la formación de esferas durante la emulsión de PLA, y B) actual sistema.**

Asimismo, el proceso de esterilización de PAP anteriores [31] consistía en colocar los MP en sufanios 0.5% estéril durante 10 min, para después ser sometidos a un lavado con PBS y un ciclo de exposición a luz ultravioleta (UV) durante 18 min y dejar secar durante el transcurso de la noche en incubadora. Dicho proceso resultó deficiente, por lo que se planteó un nuevo método que, de acuerdo con Costa *et al.* [11], requiere de al menos un ciclo de esterilización con autoclave y reposo de 3 h en etanol al 70%.

Por otro lado, se observó que el procedimiento en biorreactores es en promedio 24 h más largo que el proceso usado en PAP anteriores, esto se debe a que, al incluir un biorreactor en el protocolo, el área de salida para los gases exhaustos es menor y, dado que la reacción en el interior de sistema es exotérmica, la velocidad de volatilización del diclorometano es significativamente más lenta que en un sistema abierto.

Así entonces, se plantearon rediseños en el biorreactor con el objetivo de aumentar la transferencia de energía entre el sistema y los alrededores. Estas modificaciones incluyen el cambio de la propela actual (tipo ancla de plástico) por una propela tipo hélice en acero inoxidable de flujo radial (Figura 4).



**Figura 4. Propela tipo hélice en acero inoxidable [34].**

La elección de la propela se debe a que el flujo de aire paralelo de las propelas axiales crea un gradiente de presión a lo largo de la superficie de la hélice. Este gradiente de presión hace que el aire se mueva hacia la superficie de la hélice, donde se calienta por fricción. El aire caliente se expande y se vuelve menos denso, lo que facilita su evaporación [35].

Por otro lado, se diseñaron nuevas tapas para los biorreactores con las cuales se espera aumentar la transferencia de energía y evitar la condensación de los reactivos volátiles. La primera tapa (Figura 5) es una optimización de la tapa actual para biorreactor en frasco Schott, la cual incluye 6 canales de salida para gases exhaustos y 1 entrada en el centro para el rotor de la propela. En este diseño se incorporan 4 salidas adicionales a las que se tienen con la tapa actual.

El segundo diseño (Figura 6) de tapa para biorreactor en frasco Schott es más sencillo, pues no se cuentan con canales de salida para los gases, sino con 4 aperturas alrededor del orificio de entrada para el rotor. Este diseño es fácil de crear con una tapa ya existente y presenta una mayor área de transferencia de energía a comparación del diseño 1.



**Figura 5. Diseño 1 de tapa para biorreactor en frasco Schott**



**Figura 6. Diseño 2 de tapa para biorreactor en frasco Schott**

Cabe mencionar que estos diseños no han sido probados, únicamente se presentan como una alternativa fácilmente producible para solucionar los problemas actuales en la producción de MP en biorreactores. Sin embargo, su implementación no requiere de inversión adicional al sistema y los beneficios se verían directamente reflejados en los tiempos y rendimientos de producción.

#### *Reticulación de colágeno a microportadores de PLA con tratamiento dehidrotermal*

Con base en el método del PAP anterior [31], se hizo la reticulación del colágeno a los MP mediante un tratamiento dehidrotermal (DHT). En campana de bioseguridad se sumergieron los MP en una solución de colágeno durante 15 min y posteriormente se dejaron secar en cámara de anaerobiosis durante 4 días. La primera prueba con microportadores de PLA

(Figura 2) mostró un crecimiento favorable, y adhesión a los microportadores, por lo que se demuestra que el método es efectivo.

#### *Caracterización de la línea celular de MSC*

Las células mesenquimales provenientes de placenta (como las usadas en el presente PAP), comparten características entre sí que, aunque varían entre una línea celular y otra [36], son persistentes, y tienen el potencial de dar evidencia del estado del cultivo MSC. Un ejemplo de ello son los marcadores de superficie, que son parte del inmunofenotipo de la célula, y que son utilizados para detallar el tipo de células troncales ya que se expresan de manera natural. Algunos de estos se clasifican como marcadores de adhesión celular, integrinas, selectinas, receptores de quimiocinas, y receptores de membrana involucrados en el proceso de apoptosis o necrosis [37], tales como CD13, CD29, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, SSEA-4, entre otros [36], [37].

Una manera de identificar la expresión de dichos marcadores de membrana es mediante el método de citometría de flujo, el cual tiene su fundamento en fluidica, óptica y redes electrónicas, que en conjunto tienen la capacidad de medir las características ópticas y de fluorescencia de una célula durante su exposición a una fuente de luz [38]. A pesar de también ser útil para medir tamaño y forma de las células, este método es valioso por reconocer la presencia de los marcadores de superficie acoplados a anticuerpos que le confieren la fluorescencia detectable para el dispositivo. Una de las desventajas de la citometría de flujo es el costo y, a pesar de no estar disponible el método en las instalaciones del CEGINT, el centro de investigación del CIATEJ puede proporcionar este recurso.

En paralelo, la inmunocitoquímica es un método cualitativo para identificar marcadores de membrana, con la capacidad de generar una imagen integral a nivel de una sola célula [39] basándose de igual forma en la detección e imagen del fluorocromo (anticuerpo) adherido al marcador de superficie. A excepción de la cinética de crecimiento, en ninguno de los PAPs anteriores se había realizado un procedimiento de caracterización.

Respecto a la caracterización de la línea celular usada durante las prácticas de laboratorio, es posible establecer el índice de proliferación mediante el crecimiento del cultivo en un ensayo que permita contar la cantidad de células por día, y de esta manera construir la cinética del crecimiento. Este dato debería ser comparable con lo reportado con la literatura, por lo que se espera que las células tengan la capacidad de duplicar su población en al menos 38 a 41 h [40], [41]. Debe tomarse en cuenta que dicha relación no se mantiene cuando se hace la caracterización del cultivo en los MP.

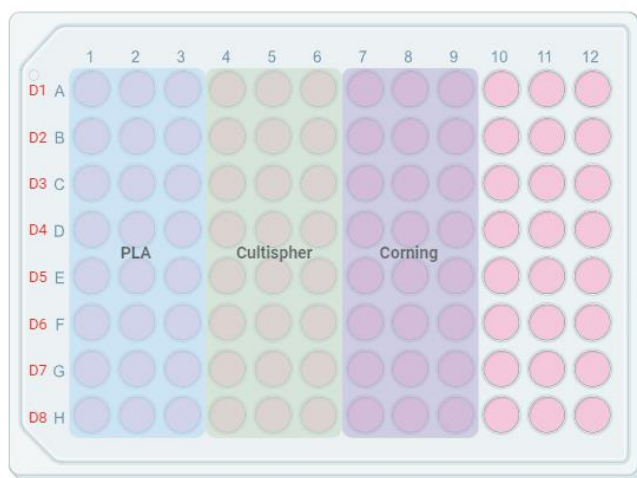
Los métodos y procedimiento antes mencionados se han planeado para realizarse a lo largo del semestre. La manera en que las alternativas serán ejecutadas en el PAP, se muestra cronológicamente en la Tabla 3. Asimismo, las abreviaturas de los recursos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 3. Cronología de actividades durante el periodo de PAP de otoño 2023**

Actividades	Recursos	Días	Agosto			Septiembre				Octubre				Noviembre				Dic iembre
			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
Planeación																		
Investigación de mejoras	L	10		■	■													
Corrección de protocolos	L	10			■	■												
Proliferación celular	MSC, I, TF, MCC	55			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
Cambio de medio	CB, MCC, MSC	33			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
Producción microportadores	CB, CE, RSF, PA	16		■			■			■			■					
Esterilización	A, UV, Et	4		■			■			■			■					
Tratamiento colágeno	CB, H, CA	5			■			■	■		■		■					
Pasaje de cultivo monocapa	TF, CB, I, M, C, MCC, MSC, CN	5				■		■		■		■		■				
Pruebas con MP tratados	P96, MP, MSC, MCC, CB, CN, M	15				■				■	■							
Conteo celular de cinética en MP	P96, MSC, M, CN, MCC, CB	15				■				■	■							
Inmunocitoquímica	P24, MSC, AG, CB, M, CN, MCC, Ab, CO, LÁ	6								■								



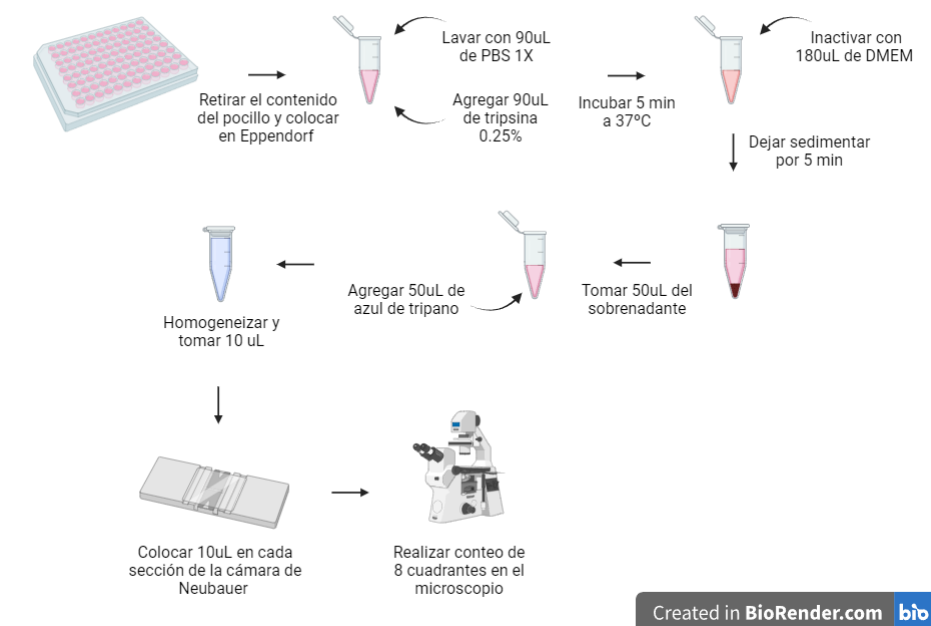
Se utilizó una placa NEST® de 96 pocillos sin tratamiento, donde se sembraron 22,500 MSC y 14 g/L de los microportadores correspondientes por pocillo, por triplicado. En la Figura 7, se muestra el diseño de experimentos, donde se puede observar en azul los pocillos sembrados con células mesenquimales y MP de PLA con recubrimiento de colágeno, en verde los pocillos correspondientes a MP marca Corning® recubiertos con colágeno, en morado los pocillos con MP Cultispher® recubiertos con gelatina y, en rojo las filas correspondientes a los días de la cinética.



Created in BioRender.com bio

**Figura 7. Diseño de experimentos para la cinética de proliferación celular en microportadores**

Posteriormente se procedió con el diseño del protocolo de conteo celular en placa de 96 pocillos con MP. Se tomó como base el Protocolo de Uso General de Microportadores Corning® [42], el cual fue adaptado para trabajar con los volúmenes de la placa de 96 pocillos (Figura 8). Además, se eliminó el paso de centrifugación de la biomasa con los MP debido a la posibilidad de daño celular, factor que afectaría considerablemente los resultados de la cinética.



**Figura 8. Protocolo de conteo celular para cinética de microportadores en placa de 96 pocillos**

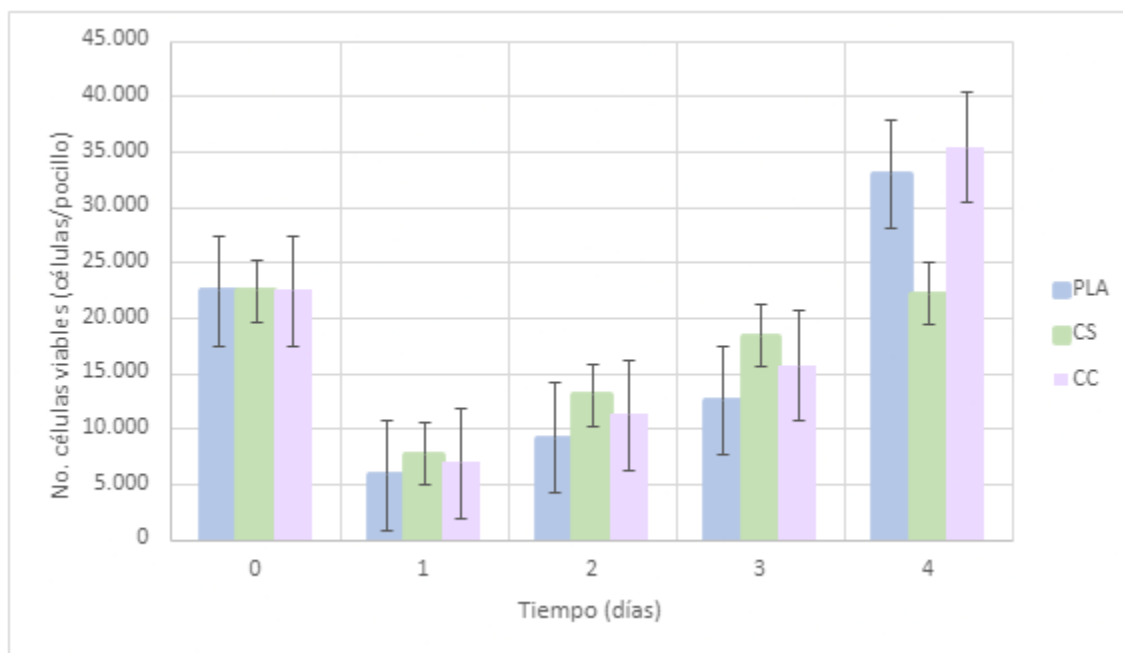
Los conteos celulares se realizaron diariamente, los datos fueron recuperados y, mediante la Ecuación 1, se calculó el número de células en cada uno de los pocillos con MP.

$$No. \text{ células} = X(10,000)(d)(V)$$

**Ecuación 1. Conteo celular en cámara de Neubauer**

Donde  $X$  es el promedio de células contadas por cuadrante, 10,000 es el factor de la Cámara de Neubauer,  $d$  es el factor de dilución y  $V$  el volumen en el cual se encuentran resuspendidas las células.

La cinética se desarrolló de acuerdo con el protocolo establecido hasta el día 5, en el cual se encontraron contaminaciones bacterianas encapsuladas en el proceso de producción de los microportadores de PLA. Fue necesario detener el experimento e inducir muerte celular con cloro a la caja de 96 pocillos para evitar contaminaciones cruzadas dentro del laboratorio. A pesar de lo anterior, se logró obtener resultados de una cinética preliminar (Figura 9), donde se puede comparar la adherencia y proliferación celular en las tres matrices utilizadas.



**Figura 9. Cinética de proliferación celular en microportadores; se muestra el conteo de células adheridas a microportadores de ácido poliláctico (PLA), Cultispher® (CS) y Corning® (CC)**

En la figura 9 se observa que, aunque se sembraron 22,500 células, el conteo en el día 1 muestra que no todas las células se adherieron a los microportadores. Sin embargo, en el día 2 se observa una cantidad mayor de células en los MP y, con el transcurso de los días, dicha cantidad se ve en aumento. Cabe mencionar que, en este punto, no se sabe si el aumento en la cantidad de células en los MP se debe a la proliferación de las primeras células adheridas o a la adherencia de nuevas células cada día. A manera de dilucidar el dilema anterior, se propone la introducción al experimento del marcador fluorescente de proliferación celular CellTracker.

Posteriormente, se realizó un análisis estadístico de la cinética de MP de PLA y Corning®. Se decidió comparar dichos microportadores debido a que, al día 4, ambos muestran niveles celulares similares, además de que resulta atractivo obtener una comparación entre la matriz comercial especializada (Corning) y la matriz casera (PLA).

Los resultados de la estadística descriptiva (Tabla 5) presentan una desviación estándar similar para ambos MP, con una media de 19,012 y 21,910 células adheridas a los microportadores de PLA y Corning®, respectivamente. Por otro lado, la prueba de hipótesis

nula (Tabla 6) muestra que los niveles celulares en los microportadores de PLA y Corning® son estadísticamente iguales.

**Tabla 5. Estadística descriptiva**

<b>Muestra</b>	<b>No. Experimentos</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>
PLA	5	16638	11061
Corning	5	18370	11129

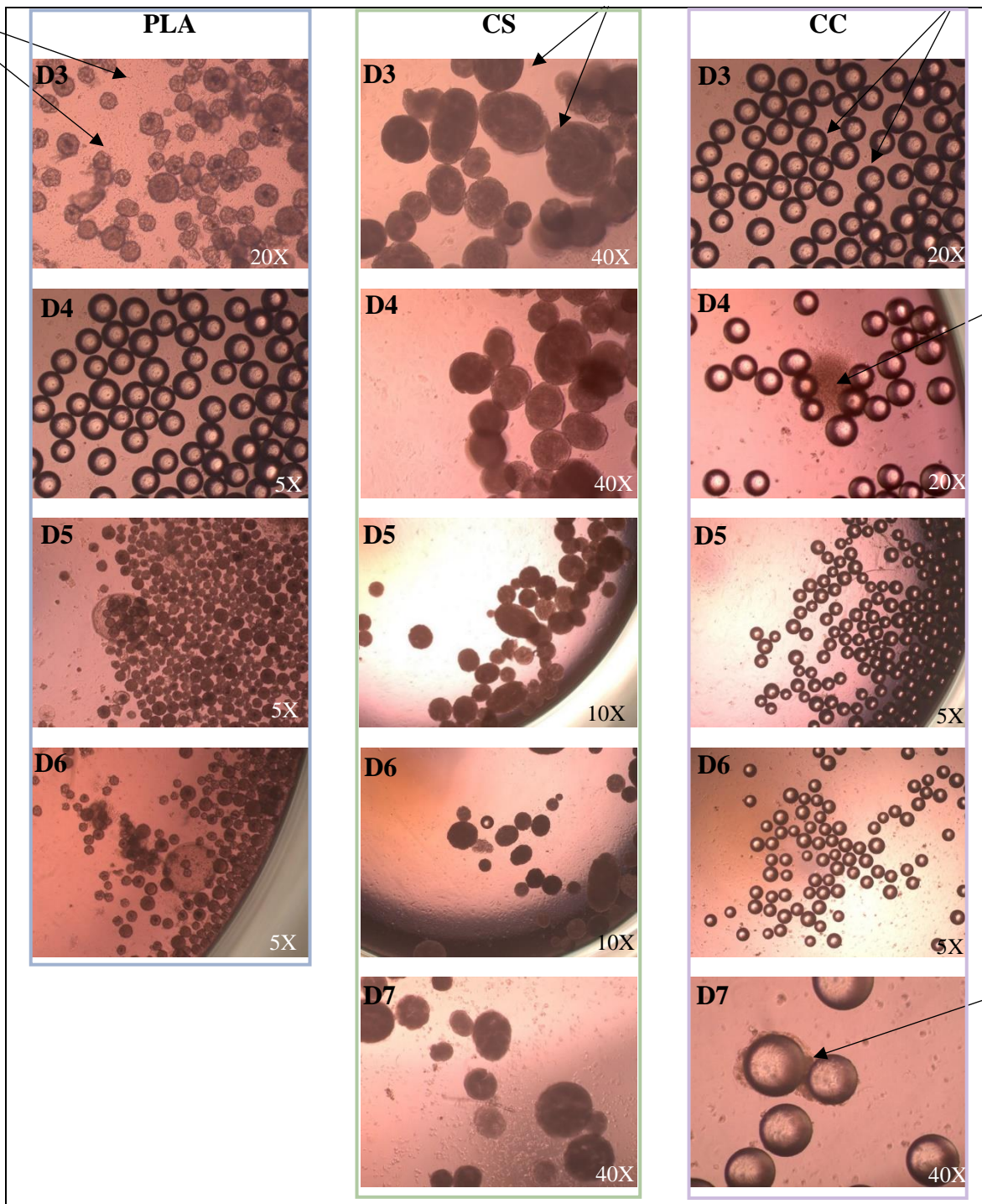
**Tabla 6. Prueba de hipótesis nula**

Hipótesis nula	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$	
Hipótesis alterna	$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$	
<b>T- Value</b>	<b>DF</b>	<b>P-Value</b>
-0.25	7	0.811

El análisis de la de estadística descriptiva y los resultados de la prueba de hipótesis nula, permiten avalar el uso de microportadores caseros de PLA para la producción de cultivos en 3D. Asimismo, se recomienda realizar un análisis económico para evaluar la viabilidad de su uso a gran escala, además de asegurar la replicabilidad del proceso anterior y la proliferación de las células en los microportadores.

#### *Análisis cualitativo de la proliferación celular en las matrices biológicamente compatibles*

Se llevó a cabo un monitoreo cualitativo del diseño de experimentos que se muestra en la Figura 7 para las MSC en cada una de las matrices biológicamente compatibles, adicional al análisis de la cinética de proliferación celular (Figura 9). La prueba consistió en capturar imágenes cada 24 h con el microscopio Zeiss Axio Vert A1, en campo claro con los diferentes aumentos de los objetivos disponibles (5, 10, 20 y 40X). En la Figura 10 se muestra la evolución de la proliferación celular en cada uno de los microportadores, tanto de PLA, como Corning® y Cultispher®.



**Figura 10. Evolución de la proliferación de MSC en las distintas matrices biocompatibles: ácido poliláctico (PLA), CultiSpher® (CS) y Corning® (CC). La primera fila muestra las imágenes tomadas en el día 3 (D3), en las cuales se observa la presencia de células (señaladas con flechas), pero sin clara evidencia de adherencia. En el D4, se presenta la primera formación de esferas de biomasa en MP de PLA y, al no presentarse adherencia en CC, las células tienden a sedimentarse al fondo del pocillo sin capacidad de adherirse a ninguna superficie (señalado con flechas). En D5 y D6 se**

**mantiene la formación de esferas de biomasa en PLA y reducida adherencia en CS y CC. En D7 se encuentra adherencia en CC (señalado con flechas).**

De acuerdo con la Figura 10, la adherencia en los MP de PLA fue la que mayor evolución presentó al mostrar la formación de las esferas de biomasa a partir del día 4. Los MP de CS tuvieron adherencia moderada durante el tiempo que se mantuvieron las MSC en cultivo con dichos MP, del día 4 hasta el día 7. Los MP de CC, en cambio, presentaron pocos signos de proliferación celular durante el tiempo de cultivo, mostrando evidencia de adherencia hasta el día 7.

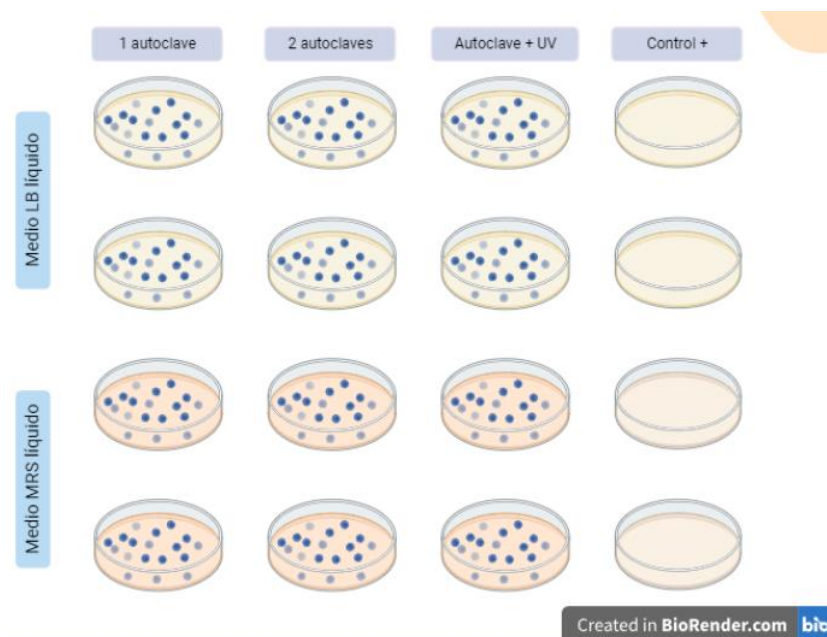
#### *Producción de microportadores de PLA en sistema controlado*

Tras presentarse contaminación en el cultivo de MSC (Figura 2) se hizo latente la necesidad de establecer un nuevo protocolo tanto de producción de los MP de PLA, como de esterilización, con el objetivo de evadir la encapsulación de agentes contaminantes en el biopolímero [11] y asegurar el ambiente ideal de crecimiento de las células. Se planteó un nuevo sistema con condiciones de inocuidad más controladas, el cual fue llevado a cabo en el CEGINT de ITESO.

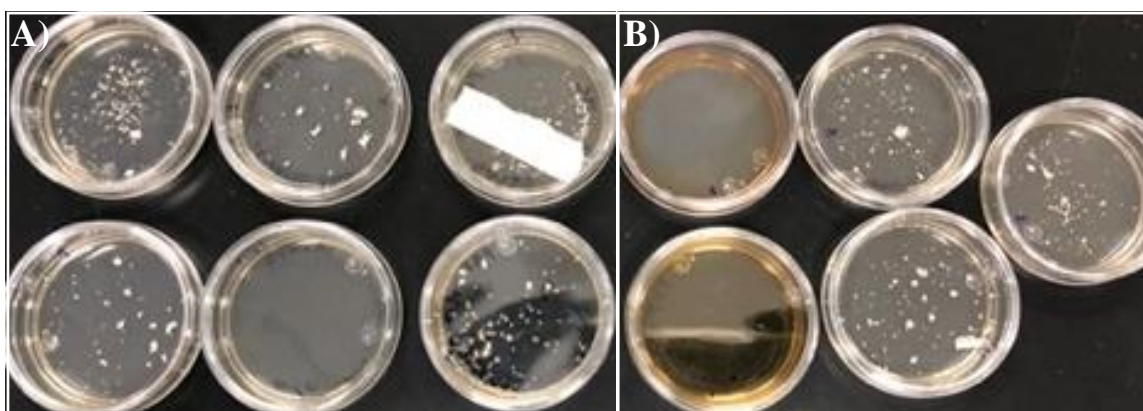
Primero, se implementó el uso de material y reactivos estériles para que la producción de MP de PLA fuese realizado en condiciones de inocuidad en la medida que el protocolo lo permitiera. Se optó por esterilizar en autoclave el biorreactor en que se lleva a cabo la emulsión (Figura 3B), el agua en la cual se disuelve el PVA (ácido polivinílico), así como el material empleado para pesarlo y el PLA. El primer lote de MP elaborado con el nuevo sistema, consistió en 3 g de PLA, 300 mL de solución de PVA 0.05% y 60 mL de diclorometano, los cuales permanecieron en agitación a 450 rpm durante 72 h a 550 rpm.

Una vez que los microportadores fueron recuperados del proceso de emulsión, se sometieron a una segunda esterilización por autoclave, ya que este material es capaz de soportar altas temperaturas [29], también se probó la esterilización con radiación UV, según como lo reportan Costa *et al* [11]. Posteriormente se dejaron los microportadores en etanol al 70% durante 2 días, ya que este reactivo es tóxico para algunos microorganismos [43] y se les aplicó el tratamiento dehidrotermal (DHT) para la reticulación del colágeno.

A manera de comprobar la efectividad del nuevo método, se diseñaron pruebas de esterilidad (Figura 11) en medio LB (Luria-Bertani) y MRS (Man, Rogosa y Sharpe) con los MP. Dichas pruebas se realizaron por duplicado, se incluyeron también controles negativos y se realizaron revisiones diarias durante un total de 7 días (Figura 12).



**Figura 11. Diseño de experimentos para las pruebas de esterilidad de MP de PLA**



**Figura 12. Pruebas de esterilidad de MP de PLA. Se observa que en todas las cajas el medio es traslúcido, y se descarta la presencia de contaminación bacteriana. A) Cajas Petri con medio LB del día 1 de la prueba, y B) cajas Petri con medio MRS o LB que se hicieron el día 4 de la prueba.**

Debido a que las pruebas de la Figura 12 no presentaron cambio en la turbidez del medio de cultivo después de los 7 días, y no se apreció presencia microbiana en el examen al

microscopio, se llegó a la conclusión que no hubo crecimiento microbiano y/o fúngico. De esta manera, se permite consolidar el nuevo protocolo de esterilización. El lote de MP producido con el nuevo protocolo fue almacenado en frascos de vidrio con sellado hermético para su uso posterior.

Finalmente, se midió el rendimiento de la producción de MP con el nuevo protocolo de esterilización. Dicho cálculo se muestra en la ecuación 2:

$$\text{Rendimiento} = \frac{M_I - M_F}{M_T} \cdot 100\%$$

**Ecuación 2. Rendimiento de producción de MP**

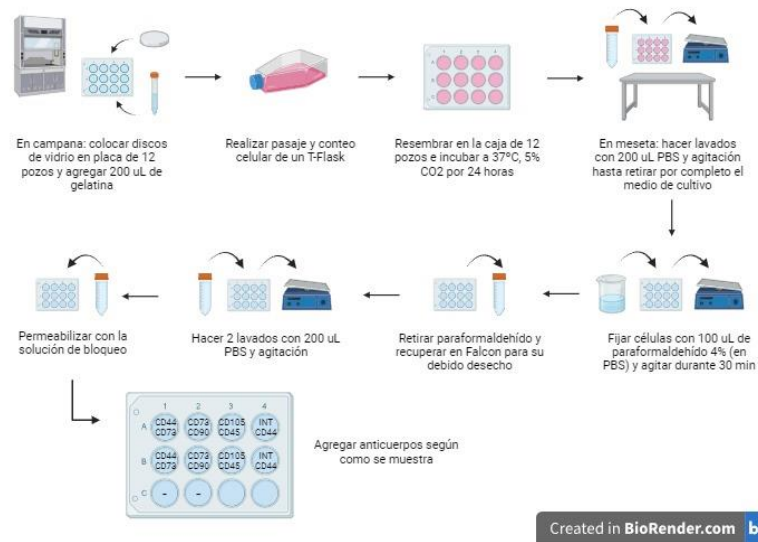
Donde  $M_I$  es la masa de PLA inicial (g) y  $M_F$  la masa final de MP (g). De tal manera que, después de pesar los MP obtenidos, se planteó la ecuación 3.

$$\text{Rendimiento} = \frac{(3 - 1.95)g}{3g} \cdot 100\% = 35\%$$

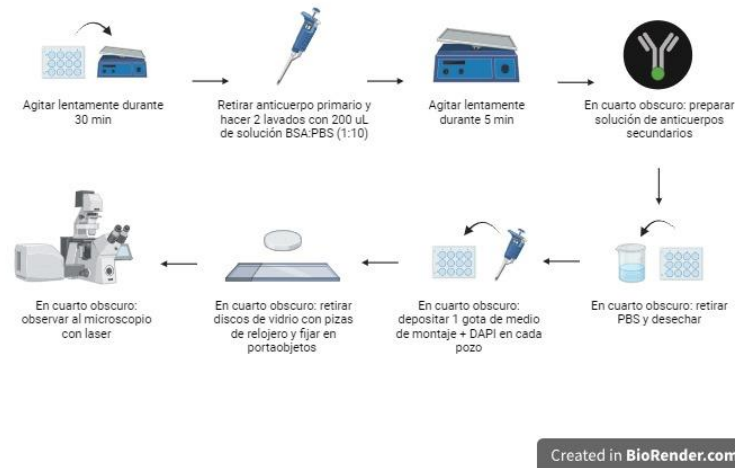
**Ecuación 3. Resultado del rendimiento de producción de MP**

#### *Caracterización cualitativa con Inmunocitoquímica de línea celular de MSC*

Se llevó a cabo la prueba de Inmunocitoquímica en la línea celular MSC de placenta adquiridas en el laboratorio biotecnológico Lcells. Esta es una prueba que aprovecha el inmunofenotipo de las MSC para su caracterización [39]. El procedimiento para la Inmunocitoquímica se muestra en la Figura 13 y 14.

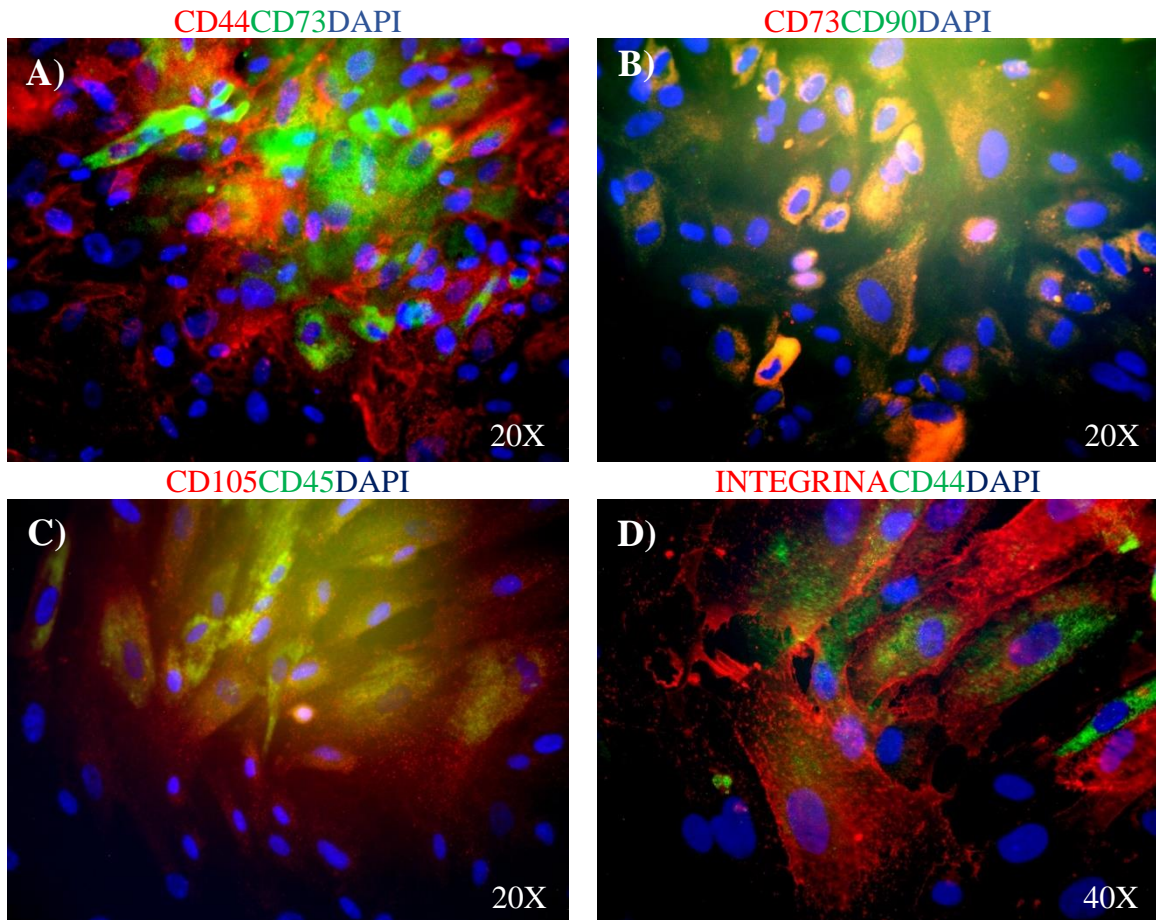


**Figura 13. Protocolo para la caracterización de MSC con el método de Inmunocitoquímica. Fijación y adición de anticuerpos primarios**



**Figura 14. Protocolo para la caracterización de MSC con el método de Inmunocitoquímica. Adición de anticuerpos secundarios.**

De acuerdo con Rojewski *et al.* [37] los marcadores CD44, CD73, CD90, CD105, son positivos en MSC, mientras que CD45 e integrina tienen menor respuesta o están asociados a células troncales maduras, o MSC de médula ósea, a diferencia de las utilizadas en la prueba, que son de placenta humana. En la Figura 15 se muestran los resultados de las pruebas.



**Figura 15. Imágenes tomadas en microscopio Zeiss Axio Vert A1 con barrido láser a 333 nm (DAPI, azul), 495 nm (FITC, verde) y 551 nm (Rhodamine, rojo). A) Marcaje con antígenos de superficie CD44 (rojo), CD73 (verde) y nuclear DAPI (azul), B) antígenos de superficie CD73 (rojo), CD90 (verde) y nuclear DAPI, C) antígenos de superficie CD105 (rojo), CD45 (verde) y nuclear DAPI (azul), y D) antígenos de superficie Integrina (rojo), CD44 (verde) y nuclear DAPI (azul).**

Las imágenes A, B, C y D de la Figura 11 muestran un marcaje positivo a los antígenos de superficie, que son característicos de MSC de acuerdo con la Sociedad Internacional para la Terapia Celular y Génica (ISCT, por sus siglas en inglés) [44]. Los antígenos CD44 e integrina (rojo) de las imágenes 10A y 10D, respectivamente, están asociados a moléculas de adhesión celular de MSC [37], por lo que la presencia positiva de estos permite observar con mayor claridad la estructura fibroblastoide característica de las MSC.

## 1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

El proceso experimental se dividió en tres secciones principales las cuales se diseñaron a manera de cumplir con los objetivos particulares del PAP. Dichas secciones fueron: la caracterización de la línea celular de trabajo, la optimización del protocolo de producción y esterilización de los MP de PLA y evaluación de proliferación celular en los distintos MP.

Los resultados de la primera sección permitieron garantizar que la línea celular empleada para el resto de los experimentos se encuentra en condiciones óptimas, no se ha diferenciado y cuenta con las características claves de una población íntegra. Por otro lado, los resultados de la optimización del proceso de producción de los MP de PLA permiten asegurar la inocuidad y esterilidad de los reactivos y equipos en cualquier momento. Además, el protocolo actual conlleva un mejor control de los parámetros de producción, así como un mejor análisis de la transferencia de masa y energía en el sistema. Por lo tanto, se plantea cambiar la propela actual por una propela de tipo axial para aumentar la eficiencia de la transferencia de energía en el sistema y ayudar con la volatilización del diclorometano, con el objetivo de reducir los tiempos de espera en el biorreactor. Asimismo, se propone aumentar las salidas de gases exhaustos mediante la introducción de una nueva tapa con mayor cantidad de orificios y así, evitar la condensación del diclorometano.

Los resultados de la cinética preliminar permiten avalar el uso de los MP caseros de PLA para el cultivo 3D de células mesenquimales de placenta humana (MSC). Dichos resultados demuestran que los MP de PLA aseguran niveles celulares estadísticamente iguales que el estándar actual del mercado (Corning®). Además, los resultados son comparables con lo reportado en la literatura [45], [46], [47] e incluso, se presentan mejores resultados en cuestión de la formación de conglomerados.

En un estudio realizado en 2008 por Hong *et al.* [45] se utilizaron microportadores de PLA recubiertos con colágeno para el cultivo de MSC diferenciadas al linaje de condrocitos. Los autores reportan, de manera cualitativa, la presencia de adherencia celular a la matriz en el día 6, y conglomerados de biomasa en el día 8. No obstante, la Figura 10 muestra que en el

trabajo realizado en este PAP se obtuvo adherencia en los MP de PLA desde el día 3 y se presentaron conglomerados en el día 4, a pesar de haber utilizado una densidad de siembra menor que Hong *et al.*, de  $0.15 \times 10^6 \text{cél/mL}$  en comparación con  $8.00 \times 10^6 \text{cél/mL}$ . Lo anterior permite demostrar que se aumentó la velocidad de crecimiento de las MSC, asociado a la biocompatibilidad de los microportadores caseros de PLA y a las condiciones en las cuales el cultivo se llevó a cabo [46].

De manera similar, el trabajo de Li *et al.* [47] reporta la presencia de conglomerados celulares en un mayor periodo de tiempo en comparación con lo reportado en este PAP. En dicho estudio se hizo el cultivo de MSC diferenciadas al linaje de pre-osteoblastos en matriz de PLA con recubrimiento de nano hidroxapatita, y se reportan los conglomerados en el día 7, es decir, 3 días más que el cultivo en PLA de la Figura 10. Este estudio permite reconocer que la efectividad de la matriz casera de PLA es consistente respecto a otras publicaciones, logrando mayor cantidad de crecimiento en menor tiempo.

Finalmente, después de haber demostrado la biocompatibilidad de la matriz y su utilidad para el cultivo celular, se recomienda realizar un análisis económico que abarque tanto la producción como su implementación. Este análisis permitiría evaluar la viabilidad de su uso a gran escala, además de asegurar la replicabilidad del proceso y la proliferación de las células en los microportadores mediante la introducción del marcador fluorescente CellTracker.

## 1.7. Bibliografía y otros recursos

### Bibliografía

- [1] I. Freshney, Culture of animal Cells. A Manual of Basic Techniques, Hoboken, NJ.: Wiley & Sons, 2005.
- [2] J. Haycock, «3D Cell Culture: A Review of Current Approaches,» *Humana Press*, vol. 1, p. 15, 2011.
- [3] F. Pampaloni, E. G. Reynaud y E. H. Stelzer, «The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.,» *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 8, n° 10, pp. 839-845, 2007.
- [4] J. Lee, M. J. Cuddigy y N. A. Kotov, «Three-dimensional cell culture matrices: state of the art.,» *Tissue engineering part B: reviews*, vol. 14, n° 1, pp. 61-86, 2008.

- [5] G. F. Muschler, C. Nakamoto y L. G. Griffith , «Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering,» *JBJS*, vol. 86, n° 7, pp. 1541-1558, 2004.
- [6] J. Kohn, W. J. Welsh y D. Knight, «A new approach to the rationale discovery of polymeric,» *Biomaterials*, vol. 28, pp. 4171-4177, 2007.
- [7] A. N. F. Versypt, D. W. Pack y R. D. Braatz, «Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres—A review,» *Journal of controlled release*, vol. 165, n° 1, pp. 29-37, 2013.
- [8] A. L. Tasker, J. P. Hitchcock, L. He, E. A. Baxter, S. Biggs y O. J. Cayre, «The effect of surfactant chain length on the morphology of poly (methyl methacrylate) microcapsules for fragrance oil encapsulation.,» *Journal of colloid and interface science*, vol. 484, pp. 10-16, 2016.
- [9] L. E. Kokai, A. M. Ghaznavi y K. G. Marra, «Incorporation of double-walled microspheres into polymer nerve guides for the sustained delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor,» *Biomaterials*, vol. 31, n° 8, pp. 2313-2322, 2010.
- [10] J. G. Lyons, P. Blackie y C. L. Higginbotham, «The significance of variation in extrusion speeds and temperatures on a PEO/PCL blend based matrix for oral drug delivery.,» *International journal of pharmaceutics*, vol. 351, n° 1-2, pp. 201-208, 2008.
- [11] R. C. D. Costa, E. D. Pereira , F. M. Silva , E. O. D. Jesus y F. G. Souza Jr, «Drug micro-carriers based on polymers and their sterilization.,» *Chemistry & Chemical Technology*, vol. 12, n° 4, pp. 473-487, 2018.
- [12] A. Fernández-Cabadillo, P. Puebla, R. Herrero-Vanrell y P. Pastoriza, «Radiosterilisation of indomethacin PLGA/PEG-derivative microspheres: protective effects of low temperature during gamma-irradiation.,» *International Journal of pharmaceutics*, vol. 313, n° 1-2, pp. 129-135, 2006.
- [13] C. Y. Hsiao , S. J. Liu, S. W. Ueng y E. C. Chan, «The influence of  $\gamma$  irradiation and ethylene oxide treatment on the release characteristics of biodegradable poly (lactide-co-glycolide) composites.,» *Polymer degradation and stability*, vol. 97, n° 5, pp. 715-720, 2012.
- [14] G. Rubí-Sans, I. Cano-Torres, S. Pérez-Amodio, B. Blanco-Fernández, M. A. Mateos-Timoneda y E. Engel, «Development and angiogenic potential of cell-derived microtissues using microcarrier-template,» *Biomedicines*, vol. 9, n° 3, p. 232, 2021.
- [15] C. d. I. y. A. e. T. y. D. d. E. d. J. A. C., «Biotecnología Médica y Farmacéutica,» CONAHCYT, 2023. [En línea]. Available: <https://ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-medica>. [Último acceso: 25 Septiembre 2023].
- [16] ITESO, «Laboratorios ITESO,» 2023. [En línea]. Available: <https://laboratorios.iteso.mx/dpti-laboratorio-de-biotecnologia/>.
- [17] S. Yamanaka, «Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges,» *Cell Stem Cell*, vol. 27, n° 4, pp. 523-531, 2020.
- [18] J. K. Biehl y B. Russell, «Introduction to stem cell therapy,» *The Journal of cardiovascular nursing*, vol. 2, n° 98, p. 24, 2009.
- [19] C. Brown, C. McKee, S. Bakshi, K. Walker, E. Hakman, S. Halassy, ... y G. R. Chaudhry, «Mesenchymal Stem Cells: Cell Therapy and Regeneration Potential,» *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.*, vol. 13, n° 9, pp. 1738-1755, 2019.

- [20] p. Saeedi, R. Halabian y A. A. I. Fooladi, «A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies,» *Stem cell investigation*, vol. 6, n° 34, pp. 1738-1755, 2019.
- [21] J. F. Enders, T. H. Weller y F. C. Robbins, «Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues,» *Science*, vol. 109, n° 2822, pp. 85-87, 1949.
- [22] Organización Panamericana de la Salud, «La historia de la polio: de la erradicación a la reemergencia,» septiembre 2022. [En línea]. Available: <https://www.paho.org/es/historias/historia-polio-erradicacion-reemergencia>. [Último acceso: 1 septiembre 2023].
- [23] F. Hesse y R. Wagner, «Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures,» *Trends in biotechnology*, vol. 18, n° 4, pp. 173-180, 2000.
- [24] C. A. Tavira, A. Ortega, I. Dávila, S. Estrada y A. Meneses, «Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica,» *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 40, n° 4, pp. 35-46, 2009.
- [25] R. Das, R. Roosloot, M. van Pel, K. Schepers, M. Driessen, W. E. Fibbe, J. D. de Bruijn y H. Roelofs, *Journal of Translational Medicine*, vol. 17, n° 241, 2019.
- [26] A. Jauković, D. Abadjieva, D. Trivanović y et al., «Specificity of 3D MSC Spheroids Microenvironment: Impact on MSC Behavior and Properties,» *Stem Cell Rev and Rep*, vol. 16, p. 853–875, 2020.
- [27] S. M. Badenes, A. Fernandes-Platzgummer, C. A. V. Rodrigues, M. M. Diogo, C. L. da Silva y J. M. S. Cabral, «Microcarrier culture systems for stem cell manufacturing,» de *Stem cell manufacturing*, Lisboa, Elsevier, 2016, pp. 77-104.
- [28] D. F. Padilla, «Desarrollo y estandarización del cultivo en 3D de células madre mesenquimales humanas en un reactor Spinner-Flask,» Tlaquepaque, 2020.
- [29] L. Serna y F. Albán, «Ácido poliláctico (PLA): Propiedades y aplicaciones. 5.1 (2003): 16-26.,» *Ingeniería y competitividad*, vol. 5, n° 1, pp. 16-26, 2003.
- [30] M. A. Sahagún, «Desarrollo y estandarización de cultivo 3D de células madre mesenquimales humanas,» Tlaquepaque, 2021.
- [31] X. De Unánue y J. Vázquez, «Estandarización de cultivo 3D de células madre mesenquimales humanas en un reactor Spinner-Flask y en andamios de PLA recubiertos con colágeno en el CEGINT, ITESO,» Tlaquepaque, 2023.
- [32] A. Castro Crespo, «Cultivo de lactobacillus reuteri en solitario y en cocultivo con escherichia coli a 37°C.,» Valladolid, 2020.
- [33] M. J. Hernández, J. M. Celorio, C. L. Moros y V. M. S. Bernad, «Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización,» *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, vol. 32, n° 10, pp. 681-688, 2014.
- [34] Fusion Fluid Equipment, «PR3 Impeller,» Fusion Express, 2023. [En línea]. Available: <https://fusionfluid.com/products/mixing-impellers/marine-prop-pr3>. [Último acceso: 22 Noviembre 2023].

- [35] D. O. Pino-Herrera, Y. Fayolle, S. Pageot, D. Huguenot, G. Esposito, E. van Hullebusch y Y. Pechaud, «Gas-liquid oxygen transfer in aerated and agitated slurry systems with high solid volume fractions,» *Chemical Engineering Journal*, vol. 350, pp. 1073-1083, 2018.
- [36] A. Wetzig, A. Alaiya, M. Al-Alwan, C. B. Pradez, M. S. Pulicat, A. Al-Mazrou, ... y C. Adra, «Differential marker expression by cultures rich in mesenchymal stem cells,» *BMC cell biology*, vol. 14, pp. 1-12, 2013.
- [37] M. T. Rojewski, B. M. Weber y H. Schrezenmeier, «Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues,» *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, vol. 35, n° 4, pp. 168-184, 2008.
- [38] A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran y A. Nalbant, «Flow cytometry: basic principles and applications,» *Critical reviews in biotechnology*, vol. 37, n° 2, pp. 163-176, 2017.
- [39] M. Schieker, C. Pautke, K. Reitz, I. Hemraj, P. Neth, W. Mutschler y S. Milz, «The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells,» *Journal of anatomy*, vol. 204, n° 2, pp. 133-139, 2004.
- [40] S. Vellasamy, P. Sandrasaigaran, S. Vidyadaran, E. George y R. Ramasamy, «Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue,» *World journal of stem cells*, vol. 4, n° 6, p. 53, 2012.
- [41] S. P. Bruder, N. Jaiswal y S. E. Haynesworth, «Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.,» *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 64, n° 2, p. 278-294, 1997.
- [42] Corning Incorporated, «Corning® Microcarrier General Use,» 2013. [En línea]. Available: [https://www.corning.com/catalog/cls/documents/protocols/protocol\\_CLS\\_AN\\_223\\_Microcarriers\\_General\\_Use.pdf](https://www.corning.com/catalog/cls/documents/protocols/protocol_CLS_AN_223_Microcarriers_General_Use.pdf). [Último acceso: 25 Octubre 2023].
- [43] L. González, «Antisépticos y desinfectantes,» *Ámbito farmacéutico*, vol. 22, n° 3, pp. 64-70., 2003.
- [44] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop y E. Horwitz, «Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement,» *Cytotherapy*, vol. 8, n° 4, pp. 315-317, 2006.
- [45] Y. Hong, Y. Gong, C. Gao y J. Shen, «Collagen-coated polylactide microcarriers/chitosan hydrogel composite: Injectable scaffold for cartilage regeneration,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 85, n° 3, pp. 628-637, 2008.
- [46] «Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system,» *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 11, n° 1, pp. 21-38, 2007.
- [47] «Design and biophysical characterization of poly (l-lactic) acid microcarriers with and without modification of Chitosan and Nanohydroxyapatite,» *Polymers*, vol. 10, n° 10, p. 1061, 2018.

## 1.8. Anexos generales

### 2. Productos

**Tabla 7. Ficha descriptiva del producto 1**

Nombre y código del PAP	4D08 Programa de desarrollo tecnológico para la Sustentabilidad ambiental, energética y alimentaria I.
Nombre del proyecto	Expansión de células mesenquimales de placenta humana en matrices biológicamente compatibles en CIATEJ y CEGINT.
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Protocolo para la implementación de un proceso de esterilización efectivo para los microportadores de ácido poliláctico (PLA) durante su proceso de producción, con la finalidad de evadir la contaminación del cultivo causada por la encapsulación de microorganismos. Se ha desarrollado para personas involucradas en ciclos posteriores de este PAP.
Autores:	Natalia Ramírez Zermeño y Ana Paula Salcedo Uribe.

**Tabla 8. Ficha descriptiva del producto 2**

Nombre y código del PAP	4D08 Programa de desarrollo tecnológico para la Sustentabilidad ambiental, energética y alimentaria I.
Nombre del proyecto	Expansión de células mesenquimales de placenta humana en matrices biológicamente compatibles en CIATEJ y CEGINT.
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Caracterización de la línea celular de células mesenquimales de placenta humana (MSC) mediante la técnica de Inmunocitoquímica. Se elaboró con la finalidad de instruir a quienes trabajan con dicha línea celular respecto a la naturaleza de esta, destinado a personas involucradas en ciclos posteriores de este PAP.
Autores:	Natalia Ramírez Zermeño y Ana Paula Salcedo Uribe.

**Tabla 9. Ficha descriptiva del producto 3**

Nombre y código del PAP	4D08 Programa de desarrollo tecnológico para la Sustentabilidad ambiental, energética y alimentaria I.
Nombre del proyecto	Expansión de células mesenquimales de placenta humana en matrices biológicamente compatibles en CIATEJ y CEGINT.
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Diseño de la tapa del biorreactor que fomenta la transferencia de masa y energía durante el proceso de producción de microportadores de PLA. Fueron planteadas para ser utilizadas por personas involucradas en ciclos posteriores de este PAP.
Autores:	Natalia Ramírez Zermeño y Ana Paula Salcedo Uribe.

### 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

*Ana Paula Salcedo*

Este Proyecto de Aplicación Profesional ha sido fundamental en mi comprensión y acercamiento a dos áreas de suma relevancia: la investigación biotecnológica y los estudios clínicos. Estos campos han sido la constante motivación que impulsa mi trayectoria académica. A través de esta experiencia, logré identificar y potenciar mis fortalezas, especialmente en la resolución de problemas y la generación de innovadoras soluciones. Los resultados obtenidos son un motivo de satisfacción y un estímulo que aviva mi inquietud por seguir explorando y aprendiendo dentro del terreno de la medicina regenerativa.

Consciente del impacto revolucionario del desarrollo tecnológico basado en células mesenquimales, asumo con firmeza mi compromiso de escalar estos procesos para hacerlos accesibles al público en general. La ejecución de este proyecto me ha acercado considerablemente a mis metas profesionales, brindándome la oportunidad de contribuir, aunque sea modestamente, al mejoramiento de la calidad de vida de nuestra sociedad.

En mi rol como ingeniera en biotecnología, subrayo la trascendencia de emprender proyectos que aborden las problemáticas contemporáneas, siempre en sintonía con el bienestar colectivo y guiados por principios éticos y valores arraigados. Mi compromiso con este proyecto se manifiesta en la transparencia al reportar datos, la dedicación absoluta para alcanzar los mejores resultados, el mantenimiento riguroso de estándares científicos y el estricto apego a las normativas dictadas por las comisiones de bioética en cuanto al manejo de células mesenquimales humanas.

*Natalia Ramírez*

Antes de iniciar este PAP, mi exposición a la biotecnología médica había sido limitada, ya que mi atención estaba puesta en otras áreas de Biotecnología. No obstante, al sumergirme en este proyecto percibí que su relevancia no reside únicamente en el cumplimiento de los objetivos planteados, sino que este proyecto también tiene como finalidad contribuir a un bien mayor partiendo de logros pequeños.

Actualmente, la idea de contribuir a algo más allá de los límites académicos resulta atractiva, ya que me sitúa como elemento de la sociedad en la que vivo. El desarrollo de este proyecto no solo le permite a mi equipo y a mí contribuir a resolver problemáticas que aquejan a gran cantidad de personas a lo largo de mundo en cuestión de salud, como enfermedades crónicas o degenerativas, sino que también se extiende a otras áreas de impacto. Debido al potencial del cultivo 3D para la producción de carne comestible *in vitro*, este proyecto permitiría también contribuir a eliminar la crueldad animal, y resolver otros problemas como la huella que tiene la industria ganadera en el medio ambiente.

Dada la importancia de este proyecto, creo que mis propias convicciones y mis valores están enfocados a comprometerme como ingeniera en Biotecnología a abordarlo de manera rigurosa, asegurándome de fundamentarlo adecuadamente y garantizar su auténtica utilidad dentro de los límites establecidos para este proyecto. Este compromiso va más allá de la obtención de resultados, sino que implica generar soluciones aplicables de problemas que incluso son globales.

### 3.2 Aprendizajes logrados

*Ana Paula Salcedo*

La inmersión en la producción de matrices tridimensionales para el cultivo animal representó una experiencia enriquecedora y bastante retadora. Durante el desarrollo del PAP, se presentaron retos como las contaminaciones en los cultivos, la transferencia de energía en los biorreactores, el manejo de tiempo y el diseño de experimentos específicos para cumplir los objetivos del proyecto. Sin embargo, estos retos fueron superados mediante el trabajo en equipo, la comunicación asertiva y el compromiso con el proyecto.

Fue necesario incorporar conocimientos que involucran desde la biología hasta la ingeniería, así como realizar investigaciones profundas en la literatura con el objetivo de llevar el proyecto a término. Pude desarrollar habilidades tales como el reconocimiento de la factibilidad de distintos procesos, el planteamiento de soluciones y la comunicación constante con mis superiores. Aprendí sobre la estandarización y optimización de protocolos ya establecidos, así como la generación de nuevos.

Reconozco la importancia de la ética en la investigación, sobre todo en el área de las células mesenquimales humanas y el sector salud. Finalmente, agradezco la confianza que tuvieron los directores del proyecto conmigo para poder llevar a cabo mis ideas, ya que esto se vio directamente reflejado en el ambiente de trabajo, la seguridad al momento de realizar procedimientos meticulosos y la corrección de errores.

*Natalia Ramírez*

El PAP es parte fundamental y un hito en el desarrollo del alumnado del ITESO. En este proyecto logré, junto con mi compañera, aplicar la creatividad y el pensamiento crítico para la resolución de los problemas que se fueron presentando. Las actividades al principio de llevaron a cabo acorde a lo planeado: las células proliferaron adecuadamente y el proceso de producción de los microportadores de PLA pudo ser replicado respecto a lo reportado en el PAP del periodo Primavera 2023. No obstante, nos enfrentamos a la contaminación del experimento de proliferación celular de los microportadores, que a su vez estaba involucrado con un fallo en la metodología para producir la matriz biocompatible. Debido a que este error afectaba al componente principal del proyecto, con análisis de resultados, pensamiento crítico y consulta de diversas fuentes fue posible establecer que la fuente del error se debía al método de esterilización de los microportadores y que eso propiciaba a su vez la proliferación de MSC. Una vez determinada la fuente del error, logramos establecer una nueva metodología con fundamento científico para lograr establecer el método nuevo y evadir. El ejercicio de la resolución de problemas nos permitió aplicar el conocimiento y el pensamiento crítico para cumplir con el objetivo del proyecto.

Ahora soy capaz de ver un panorama más amplio y completo del ambiente que me rodea, con la finalidad de atender las necesidades y promover, por ejemplo, la lucha altruista de la Ciencia y los bienes que se pueden alcanzar mediante ésta. Lo anterior conlleva mantenerse en el margen de la Ética, respetando y manteniendo en concordancia la moral en su individualidad. Mi talento en el liderazgo también me da la responsabilidad de promover el cumplimiento de ésta partiendo del ejemplo, con la finalidad de infundir en el equipo el sentido del deber con respecto a lo que la Ética plantea, evitando prácticas indebidas en seres humanos, animales, y hacia otras personas e instituciones.

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

Tabla 10. Inventario de competencias – Ana Paula Salcedo

	Competencia	Evidencia	Relevancia	Nuevas competencias	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>	<p><b>C</b> <b>o</b> <b>n</b> <b>c</b> <b>i</b> <b>m</b> <b>i</b> <b>e</b> <b>n</b> <b>t</b> <b>o</b> <b>s</b></p>	Microbiología	Trabajé en los laboratorios CIAJ en esta área.	Puedo realizar los procesos fundamentales de microbiología.	Expansión y criopreservación de células animales.	Mejoré mis técnicas de expansión y manejo de cultivos animales y detectar contaminaciones
		Principios de ingeniería genética	Desarrollé proyectos <i>in silico</i> de ingeniería genética para distintas asignaturas.	Puedo apoyar con los análisis bioinformáticos del proyecto.	Producción de microportadores en biorreactores.	Logré comprender el funcionamiento de la técnica de emulsión y proponer optimizaciones al proceso.
		Principios de biología molecular	He llavado a cabo distintos experimentos que involucran técnicas de biología molecular.	Soy capaz de realizar exitosamente técnicas meticulosas.	Uso de la técnica de reticulamiento DHT	Logré comprender el mecanismo de biodegradación del PLA y así poder proponer modificaciones en los protocolos de producción
	<p><b>H</b> <b>a</b> <b>b</b> <b>i</b> <b>l</b> <b>i</b> <b>d</b> <b>a</b> <b>d</b> <b>e</b> <b>s</b></p>	Siembra y cultivo de microorganismos y consorcios.	Trabajé en el PAP de Petroclean donde tuve un rol importante en la siembra y propagación de los microorganismos.	Soy capaz de llevar a cabo todo el proceso de siembra y propagación de microorganismos, dar seguimiento y realizar pruebas de viabilidad.	Diseño de experimentos específicos para cumplir los objetivos del proyecto.	Reconozco la importancia de la factibilidad de un procedimiento y de proponer alternativas más rápidas, específicas y/o menos costosas.
		Diseño de protocolos	Apoyé en el desarrollo de protocolos de laboratorio para el PAP	Puedo llevar a cabo la planeación experimental del proyecto.	Análisis, estandarización y optimización	Soy capaz de tomar en cuenta detalles minuciosos en procesos

		de Petroclean.		de protocolos anteriores.	complejos para poder proponer mejoras.
	Manejo de agenda	Trabajo en Critical Care innovations, donde debo llevar la agenda de los doctores, así como el registro de pagos y facturas.	Puedo organizar tanto la agenda del proyecto, así como llevar registro de compras y cotizaciones.	Búsqueda a profundidad en la literatura para poder proponer modificaciones a los protocolos, resolver dudas y optimizar procesos.	Soy capaz de comparar mis resultados con la literatura y enfocar el proyecto para mejorar mis resultados.
A c t i t u d e s	Compromiso y responsabilidad	Cumplo con mis tareas y proyectos en tiempo y forma.	Soy una persona confiable al momento de trabajar y cumplir con lineamientos y fechas de entrega.	Rápida resolución de problemas y planteamiento de ideas.	Entiendo y analizo los resultados para la toma de decisiones con base en las buenas prácticas de laboratorio.
	Comunicación	Estudíé medios de comunicación como carrera técnica.	Soy asertiva al momento de hablar y sé comunicarme a través de distintos medios.	Desarrollo de métodos de comunicación constante y asertiva con mis superiores.	Me rijo por la honestidad y la ética. Reconozco los cuidados necesarios para trabajar con MSC.
	Trabajo en equipo	A lo largo de mi desarrollo académico y profesional he sido valorada por mi participación en los equipos de trabajo.	Soy capaz de delegar y recibir trabajo conforme el proyecto avanza.	Facilidad de acoplamiento a distintas áreas de trabajo.	Identifico y reconozco las distintas áreas de mi carrera, incorporando conocimientos desde la biología hasta la ingeniería.

Mediante el ejercicio del inventario de competencias pude darme cuenta de todo lo que logré personalmente durante el desarrollo del PAP. Al entrar al proyecto sin conocimientos de

cultivos animales, resalto mi dedicación en investigar todas las técnicas, procedimientos y cuidados necesarios para el manejo de células mesenquimales. Además, destaco todo el proceso de investigación en literatura que realicé para poder corroborar los resultados obtenidos y la búsqueda de soluciones para los problemas que llegaron a surgir.

Por otro lado, debo reconocer el apoyo que tuve de parte de todos los involucrados para poder alcanzar los objetivos planteados y para poner a prueba mis conocimientos y habilidades como ingeniera. Destaco particularmente mi desarrollo profesional en distintas áreas tales como la ingeniería de biorreactores, el diseño de experimentos y la efectiva resolución de problemas.

Finalmente, la disposición y compromiso con el proyecto permitieron obtener resultados comparables con la literatura y acercarme a mis metas profesionales dentro del área de la investigación clínica. Para la continuación del proyecto, me siento motivada a seguir desarrollando y explotando dichas actitudes y habilidades.

*Natalia Ramírez*

**Tabla 11. Inventario de competencias de Natalia Ramírez Zermeño**

	Competencia	Evidencia	Relevancia/Fortaleza*	Competencias nuevas	Competencias potencializadas
Categoriza las competencias en conocimientos, habilidades y actitudes.  Escribe la o las evidencias de cada competencia y su relevancia.	<b>Conocimientos</b>  Biología celular, respecto al funcionamiento de las células; metabolismo, tejido conjuntivo y ciclo celular.	Acredité la materia de Cultivo de Células y Tejidos Animales, en la cual revisé los requerimientos para el cultivo celular.	Conozco las necesidades de los cultivos celulares. Puedo predecir su evolución, y tomar decisiones en caso de que se presentara algún evento imprevisto que pudiera impedir u obstaculizar que éstos sean exitosos.	Competencia para la proliferación de MSC en cultivo bidimensional y tridimensional.	Mayor comprensión de la actividad de crecimiento y proliferación de las MSC para mejorar su crecimiento. Entendí el mecanismo de proliferación de las proteínas de membrana para la adherencia a los microportadores
		Cursé al menos 8 materias con prácticas en el laboratorio que requirieron de la revisión de los procesos necesarios para la preservación de esterilidad e	Sé aplicar las BPL para usar correctamente las herramientas y los equipos con la finalidad de mantener la esterilidad de los cultivos.		

	Laboratorio (BPL).	inocuidad, procurando las BPL.			a su uso en las actividades.
	Conceptos y principios de estadística y diseño de experimentos.	Cursé las materias de Probabilidad y Estadística, así como Diseño de Experimentos, en las cuales desarrollé un proyecto final en el cual apliqué los conocimientos adquiridos en cada clase.	Sé plantear un diseño de experimentos para evaluar las condiciones de cultivo que permitan cumplir con el objetivo, por ejemplo, la proliferación de la línea celular. Asimismo, sé identificar, recabar y clasificar la información para su análisis estadístico en programas como StatGraphics, que permite tomar decisiones y confirmar o refutar hipótesis.	Capacidad del empleo del análisis estadístico en datos relacionados con sistemas biológicos.	Comprendí que la naturaleza biológica de los experimentos influye en la manera en que se hace el análisis estadístico.
	Bioética y normativa para el manejo de líneas celulares en instituciones de investigación y educativas, como el Instituto de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), o el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), donde se llevará a cabo el PAP.	Cuento con una certificación por parte de CITI Program en <i>Funcionario institucional/fir mante: Investigación en seres humanos</i> (ID de registro: 56616913).	Es de mi conocimiento que las instituciones cuentan con un Comité de Ética, en especial si se trabaja con líneas celulares humanas, y que éste brinda la documentación necesaria para llevar a cabo los experimentos y mantener un orden ético en concordancia con la sociedad para mantener el orden y la armonía.	Razón de que las normas de Bioética están implicadas en todas las etapas del cultivo de MSC.	Comprendí que existen normas de Bioética a considerar desde la obtención de la línea celular con el cultivo primario, así como su disposición final tras dar término al trabajo de investigación.
<b>Habilidades</b>	Biología celular, respecto al cuidado de los cultivos celulares en el laboratorio.	Acredité la materia de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales, en la cual mantuve la viabilidad de	Soy capaz de mantener la viabilidad de un cultivo de células animales, conociendo las necesidades de éste, predecir su	Agudez en el manejo del cultivo de MSC, especialmente en condiciones de esterilidad.	El periodo de tiempo prolongado de manejo de las MSC durante la ejecución de los experimentos es adverso para preservación de la línea celular. La

		tres líneas celulares.	evolución, y tomar decisiones si se presentara algún evento inesperado, que es el primer paso para llevar a cabo experimentos de esta índole.		práctica en este PAP me permitió aumentar la agilidad de mis movimientos, conservando las BPL.
	Manejo de biosensores, biorreactores y equipo para el cultivo celular.	En prácticas de laboratorio aprendí a usar correctamente el equipo indispensable para el cultivo, como la campana de bioseguridad, incubadoras, biorreactores de tanque agitado, sensores (pH, OD, temperatura), entre otros.	Sé configurar el equipo según lo requiera el cultivo o proceso para que cumplan con su función como es debido y aprovechar al máximo su uso.	Monitoreo contante del equipo relacionado con su mantenimiento y correcto funcionamiento.	Apliqué la habilidad de monitorear periódicamente el equipo que se utiliza (p. ej. la incubadora). Comprendí que la configuración del equipo es tan importante como la preservación del mismo.
	Empleo de BPL.	Empleé las BPL con resultados favorables en las prácticas de laboratorio, comparables con los reportados con la literatura.	No solo conozco las BPL, puedo emplearlas. Esto con la finalidad de reducir el error producido por el humano.	Refuerzo del conocimiento de las BPL mediante la práctica.	Reforcé mis habilidades para emplear las BPL debido a que las apliqué durante el curso del PAP
Actitudes	Trabajo simultáneo/multitask	En el laboratorio realicé varias tareas a la vez, prestando atención a cada una de ellas y siendo exitosa con todas.	Ejecutar varias tareas a la vez permite hacer eficiente el tiempo empleado en cada experimento.	Agudez en el manejo del cultivo de MSC, especialmente en condiciones de esterilidad.	La práctica me ha permitido reforzar la habilidad de hacer eficiente mi trabajo en el laboratorio
	Trabajo en equipo	A lo largo de mi experiencia como prospecto a ser Ing. en Biotecnología, hice trabajos en equipo que se llevaron con armonía y respetando las diferencias de los integrantes.	El equipo de trabajo es tan importante como el proyecto que se está elaborando, por lo que saber trabajar en equipo es de suma importancia para que éste concluya de manera satisfactoria	Coordinación adecuada con mi compañera, así como con mis asesores.	Aprendí a que el trabajo en equipo se favorece al facilitar un canal eficiente y constante de comunicación en el equipo.
	Pensamiento crítico	Empleé el pensamiento crítico en mis trabajos escolares y confirmé dudas o corroboré	El pensamiento crítico es de suma importancia en el ámbito científico para generar nuevo conocimiento y	Identificación temprana de las áreas de oportunidad y la resolución de problemas mediante la	Concluí que es necesaria la consulta de diversas fuentes para obtener un panorama completo y discernir la mejor opción de solución.

			información en la literatura.	mantener la objetividad.	consulta de diversas fuentes y la propia creatividad.	
--	--	--	-------------------------------	--------------------------	---	--

Al finalizar un proyecto, es importante reconocer las competencias adquiridas como parte de la culminación exitosa de las actividades. Gracias al ejercicio de introspección enlistado en la Tabla 11, he podido vislumbrar la manera en que surgieron nuevos conocimientos y maduraron las habilidades y actitudes respecto al inicio del periodo del PAP presente. Es importante reconocer los aspectos relacionados con el crecimiento personal, que también son parte del perfil de egreso del cual soy postulante en el ITESO.

Respecto a los conocimientos adquiridos y potencializados, he de reconocer la gran influencia que tuvieron las personas con las que trabajé a lo largo del semestre, gracias a las lluvias de ideas y el acompañamiento constante. Por mi parte, la lectura, la consulta de diversas fuentes y el refuerzo de éste con la práctica fueron uno de los aspectos más importantes en el ejercicio de mi PAP. Asimismo, las habilidades adquiridas y potencializadas se lograron gracias a las horas invertidas en el cultivo de MSC y la producción de los microportadores, que me permitió ganar experiencia, lo cual es invaluable para mi formación como biotecnóloga. Finalmente, las actitudes adoptadas en el semestre y el ejercicio de estas permitieron que el trabajo fuese no solo eficiente, sino más ameno y gratificante para mí como alumna.