

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 II



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

**4D08 Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental,
Energética y Alimentaria II**

**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**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, Ximena De Unánue Gutiérrez

Ing. en Biotecnología, Judith Vázquez Hernández

Profesor PAP: Dr. David José Mendoza Aguayo

Tlaquepaque, Jalisco, mayo 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.....	8
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	9
1.4. Planeación de alternativa(s).....	10
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	12
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	31
1.7. Bibliografía y otros recursos	38
1.8. Anexos generales.....	40
2. Productos	40
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	41
3.1 Sensibilización ante las realidades	41
3.2 Aprendizajes logrados	43

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 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, es parte de un proyecto iniciado en el semestre de Primavera 2020. El objetivo principal del presente proyecto fue generar cultivos en 3D de células madre mequiquimales de placente humana en andamios de PLA y microportadores de PLA, ambos recubiertos con colágeno. Se plantearon tres objetivos específicos: estandarizar la producción de microportadores de PLA por el método de emulsión por solvente, realizar pruebas de reticulación del colágeno por medio de dos distintos tratamientos físicos y mejorar la adherencia de células madre mesenquimales a andamios de PLA a partir de la hidrólisis del material.

Por tanto, en el presente proyecto se abordaron 2 técnicas para la reticulación del colágeno: tratamiento dehidrotermal (DHT) y tratamiento con luz ultravioleta (UV). Además, se analizó si el cambio en la rugosidad del PLA causado por la hidrólisis permitía una mejora en la adhesión de las células al material. Por otro lado, se produjeron microportadores desde cero, siguiendo una técnica de emulsión. Se concluye que la adición del DHT permitió una mejora en la reticulación del colágeno en comparación con el semestre de otoño 2022, mientras que una hidrólisis previa no benefició la adhesión ni la expansión celular. Finalmente, la producción de microportadores fue eficiente, estandarizándose un proceso reproducible. Se sugiere que en trabajos futuros se reevalúe el protocolo de esterilización de los microportadores para evitar su contaminación.

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 es llevado a cabo dentro de las instalaciones de Nivel 2 del Parque Tecnológico, es decir, en el Centro para la Gestión de la Innovación y la Tecnología (CEGINT) del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), encontrado específicamente en la Calle Independencia 1080 y siendo parte del Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales. El sitio de trabajo proporciona los insumos y herramientas necesarias para la ejecución del proyecto mismo.

El proyecto abordado es de tipo experimental, explicándose la metodología desarrollada a lo largo de semestres pasados, contando con la participación del Ing. Diego Padilla, la Ing. Amparo Sahagún, la Ing. Mariana Mercado y las estudiantes Ana Gabriela Alejandro y Elke Islas, continuando con la participación de las estudiantes en ingeniería en Biotecnología Ximena De Unánue y Judith Vázquez. A su parte, cuenta con la dirección y apoyo del Dr. David José Medoza Aguayo, la Mtra. Aida Guerrero, la Dra. Gabriela Porras y la Dra. Blanca Valdivia como asesores.

Objetivo general:

Generar cultivos en 3D de células madre mesenquimales de placenta humana en andamios de PLA (ácido poli láctico, por sus siglas en inglés) hidrolizados y microportadores de PLA, ambos recubiertos con colágeno.

Objetivos específicos:

- Estandarizar la producción de microportadores de PLA mediante emulsión y tamizado para la expansión de células madre en biorreactor Spinner Flask.
- Realizar pruebas de reticulación del colágeno por medio de tratamiento dehidrotermal y de luz ultravioleta en andamios de PLA.
- Mejorar la adherencia de células madre mesenquimales a andamios de PLA por medio de la hidrólisis del material.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

El cultivo de células animales parte de la remoción de un tejido de origen, siguiendo con su crecimiento a partir de un medio con los nutrientes y condiciones apropiadas. Por tanto, se

conoce como cultivo celular a aquel conjunto de técnicas que mantengan tales células de manera *in vitro* con el fin de que sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas sean preservadas [1].

El cultivo de tejido animal surge como continuación de la embriología dado que, en 1885, Wilhem Roux logró mantener células de embrión de pollo en solución salina por varios días. Por su parte, en 1907, Harrison fue considerado el primer científico en realizar cultivos de tejidos animales ya que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios, logrando observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos y estableciendo que el axón se formaba a partir de expansión en el cuerpo neuronal [2].

Una vez logrado lo anteriormente descrito, se buscó un medio nutritivo adecuado para estos cultivos, por lo que Burrows, en 1910, utilizó plasma de pollo con el fin de nutrir los explantes de tejidos embrionarios, obteniendo un crecimiento de tejido nervioso, corazón y piel. A partir de eso, Burrows, junto con Carrel demostraron que la vida del cultivo podía ser prolongada a partir de subcultivos. Inclusive, Carrel, en 1913, pudo mantener un cultivo de células de pollo durante 34 años [2].

En 1916, Rous y Jones emplearon extractos con tripsina, buscando así la disociación de células de embriones de pollo y estableciendo el primer cultivo celular. A su vez, presentaron métodos que se basaban en la manipulación de procesos a partir de condiciones de asepsia [2].

Avanzando hasta 1952, Gry estableció la primera línea celular humana conocida como HeLa, empleando un medio complejo y poco definido que incluía plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano. Sin embargo, no fue hasta 1965 que Ham pudo introducir el primer medio libre de suero que fuera capaz de mantener células de mamífero. Por otro lado, en 1975, Kohler y Milstein fueron capaces de establecer la primera línea celular que permitía la producción de anticuerpos monoclonales [2]. Finalmente, en 1998 se produjo cartílago por medio de ingeniería de tejidos y en 2007 se comenzó la reprogramación de células adultas para su conversión en células puripotenciales inducidas

[2]. Finalmente, en 1998 se produjo cartílago por medio de ingeniería de tejidos y en 2007 se comenzó la reprogramación de células adultas para su conversión en células puripotenciales inducidas [2].

Para clasificar los tipos de cultivos a partir de células animales, se debe tener en cuenta su capacidad de adherirse a una superficie, formando así una monocapa y permitiendo el crecimiento de una célula seguida de otras en una sola capa o en suspensión. Considerando la capacidad de adhesión, existen tres tipos de cultivos celulares. Los cultivos primarios se obtienen a partir de órganos o tejidos de un ser vivo, utilizando sustancias químicas o cortes mecánicos para su posterior transferencia y formación de un cultivo secundario; éste último crece en monocapa y presenta características propias de su origen. Por último, existen las líneas celulares conformadas por células que tienen la capacidad de sobrevivir, proliferar y crecer de manera indefinida [3]. Es recalable además que, el último paso consiste en la obtención de las células y su recuperación, ya sea por medio de métodos mecánicos o enzimáticos [1].

En cuanto a las aplicaciones de los tipos de cultivos celulares, se les encuentra en la industria farmacéutica a partir de la producción de proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, así como también en la producción de vacunas. Referente a la medicina, se tiene el uso de cultivos celulares para el reemplazo de tejidos tales como piel, hueso y cartílago conocido como terapia regenerativa [3].

No obstante, a pesar del amplio alcance del cultivo de tejidos, se suponen diversas desventajas debido a la sensibilidad de la técnica ya que el crecimiento de las células depende de condiciones estrictas de asepsia pues es mucho más lento que el de los contaminantes, además las células animales no tienen la capacidad de mantenerse vivas en ausencia de un medio de cultivo adecuado. Aunado a esto, es posible que ocurra una pérdida de las características fenotípicas propias del tejido del que se procede, conocido como desdiferenciación, pudiendo ser bueno o malo dependiente del objetivo del cultivo a trabajar [2]. Se entiende, entonces, la importancia del mantenimiento de las condiciones óptimas para lograr un alto nivel de propagación y viabilidad, así como rendimiento, siendo necesario el

control de parámetros como la temperatura, humedad, oxígeno, dióxido de carbono, pH, vitaminas, aminoácidos, presión osmótica, densidad celular, antibióticos, minerales y factores de crecimiento [1].

El presente proyecto se basa en la estandarización del proceso para la expansión de células madre en biorreactor, disminuyendo los costos del proceso y aumentando el rendimiento por medio de la implementación de microportadores. También se ha trabajado en la expansión y adherencia de células madre a andamios de PLA evaluando distintos tratamientos, con el fin de ejecutar posteriormente una diferenciación en células óseas.

1.2 Caracterización de la organización

El presente PAP se lleva a cabo en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), específicamente en el Centro para la Gestión de la Innovación y la Tecnología (CEGINT), ubicado a espaldas del campus principal. El proyecto cuenta con la dirección del Dr. David Mendoza y la orientación de la Mtra. Aida Guerrero y está bajo la coordinación del Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales (DPTI). Por su parte, los laboratorios que conforman al CEGINT son guiados por el Dr. Alejandro Arana y tienen como objetivo la implementación de proyectos guiados hacia el análisis constante de la realidad, enfocados en la salud, la alimentación y el medio ambiente con un crecimiento económico que no se deslinda de la ética profesional.

El espacio de trabajo fue el laboratorio de bioseguridad de nivel 2, que cuenta con un diseño ligado a los lineamientos de las buenas prácticas de manufactura. De acuerdo con el CEGINT [4], este laboratorio es apto para el trabajo con células de origen animal debido a que posee una meseta en forma de L en la periferia, válvulas de aire, vacío y agua, líneas para gases, detectores de humo, sensores de monóxido y dióxido de carbono, sensores de movimiento, campana de flujo laminar, incubadora de dióxido de carbono, microscopio invertido y contador celular. Además, se encuentra sujeto a un aforo máximo de 3 personas, evitando así contaminación en los cultivos.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

Las células madre son aquellas capaces de proliferar y que, a partir de las cuales, se generan células hijas, siendo éstas nuevas células madre o células especializadas procedentes de un proceso conocido como diferenciación, teniendo así una función más específica según los distintos linajes celulares (e.g. sanguíneas, cerebrales, óseas, entre otras). Debido a su múltiple división, posibilitan la reposición de un tejido, siendo entonces importantes dentro del área de la medicina regenerativa, así como también de la ingeniería de tejidos, inclusive la observación de la maduración de este tipo de células permite comprender mejor el desarrollo de enfermedades y afecciones [5].

No obstante, el proceso que conlleva el cultivo de células madre es largo, teniéndose distintos obstáculos tales como encontrar que se diferencien justo en el tipo de línea celular que se busca. El cultivo celular es aún más complejo debido al método de extracción y el medio de cultivo a utilizar para su crecimiento, necesitándose de más protocolos de estandarización [6].

En semestres pasados, el Ing. Diego Padilla y la Ing. Amparo Sahagún, bajo la supervisión y conducción del Dr. David Mendoza y la Mtra. Aída Guerrero, plantearon y desarrollaron un método que permitiera cultivos en 3D de células madre mesenquimales dentro de un biorreactor Spinner Flask, lo que aumentó 2.24 veces la producción celular y disminuyó un 47.7% los costos [7]. Por su parte, la Ing. Mariana Mercado buscó la estandarización de la cosecha, quedándose este problema inconcluso debido a una cuestión de contaminación persistente. En otoño 2021, se realizó un tratamiento con tripsina, obteniéndose una viabilidad del 52.1% [8]. Por consiguiente, en primavera 2022, la estudiante Ana Gabriela Alejandro cultivó células madre en andamios de ácido poliláctico (PLA) y buscó eliminar la contaminación a partir de distintas corridas y manipulando las concentraciones de la enzima, llegando a un punto óptimo de 0.035 mg/cm² [9]. En otoño 2022, siguiendo con la participación de la estudiante Ana Gabriela Alejandro y la incorporación de la estudiante Elke Islas, se sustituyeron los microportadores Corning por unos de PLA para disminuir costos y se mejoró el protocolo de recubrimiento de colágeno, aumentando la viabilidad celular en los sistemas, siendo tal que en el Spinner Flask se alcanzó una viabilidad del 89.0%, mientras que los andamios incrementaron hasta un 94.4% [10]. En primavera

2023, se seguirá trabajando con PLA, sin embargo, se harán ajustes para mejorar la adherencia del colágeno a dicho material por medio de tratamientos físicos y químicos. A su vez, se buscará una mejora en la producción de microportadores de PLA para estandarizar la morfología y el tamaño de partícula a través de una emulsión con solvente y tamización.

1.4. Planeación de alternativa(s)

La importancia del cultivo celular recae en las propiedades de las células madre debido a que tienen la capacidad de autoregenerarse. Además, estas células pueden diferenciarse en distintos tipos celulares, por lo que son indispensables en técnicas de producción de anticuerpos monoclonales, medicina regenerativa, producción de proteínas terapéuticas, así como su aplicación en terapias celulares y genéticas (e.g. cancer) [1].

En los Proyectos de Aplicación Profesional pasados, se estandarizó el cultivo de células madre mesenquimales en un reactor Spinner Flask estableciendo parámetros como el volumen de operación, la formulación del medio de cultivo y la cantidad de tripsina para la cosecha enzimática de las células adheridas a los microportadores Corning, se obtuvo así una viabilidad celular de hasta 95.6% y una cosecha de 4.6×10^8 células/mL [9]. Posteriormente, para disminuir los costos de producción se introdujeron microportadores de PLA obtenidos mediante trituración y recubiertos en colágeno, donde se alcanzó un rendimiento de 1.56×10^7 células/mL con una viabilidad del 98.04% [10]. Utilizando el protocolo de cultivo ya funcional y siguiendo la línea de disminuir costos mediante la producción propia de los microportadores de PLA, el presente PAP busca aumentar la producción de células mejorando la morfología de los microportadores, produciéndolos por emulsión para que sean esféricos y no haya riesgo de daño hacia las células, se esterilizarán y recubrirán con colágeno, explorando mejorar la adhesión del colágeno al material por medio de su reticulación física con tratamiento dehidrotermal y exposición a radiación ultravioleta (UV).

Con respecto a los andamios de PLA, en semestres anteriores se descubrió que con un tratamiento de colágeno la concentración y viabilidad celular aumentaban hasta 7.73×10^4 y 72.7%, respectivamente [8]. En cuanto al diseño del andamio, se obtuvo mayor viabilidad en los andamios con orificios en forma de paralelogramo y fondo, ya que proporcionan un

soporte a las células. En el presente PAP, se continuará usando la estructura del andamio con fondo y el tratamiento de colágeno. Para incrementar la adhesión de las células al PLA, se someterán los andamios a una hidrólisis alcalina para aumentar la rugosidad del material, también se buscará mejorar la fijación y fuerza del colágeno al PLA realizando reticulación del colágeno comparando dos métodos físicos: el tratamiento dehidrotermal (DHT) o con luz ultravioleta (UV). Con el propósito de retener a las células en el andamio, se producirá una estructura de agarosa para concentrar la expansión celular en el área deseada.

En la Tabla 1 es apreciable el plan de trabajo que se seguirá a durante el semestre primavera 2023. Por su parte, en la Tabla 2 se consideran los significados de cada abreviatura utilizada en la Tabla 1.

Tabla 1. Cronograma de actividades a seguir durante el semestre de primavera 2023.

Actividades	Recursos	Días	Enero		Febrero				Marzo				Abril		Mayo		
			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
Planeación																	
Investigación de mejoras		10		■	■												
Corrección de protocolos	-	10			■	■											
Expansión celular	F, CFL, CC, MI, I	5					■	■	■	■							
Conteo celular de expansión	C	1						■									
Corrida 1	A, CC, CFL, I	7					■	■									
Corrida 2	SF, A, CC, CFL, I	7							■	■							
Corrida 3	SF, A, CC, CFL, I	7									■	■					
Corrida 4	SF, A, CC, CFL, I	7											■	■			
Corrida 5	SF, A, CC, CFL, I	7													■	■	
Producción microportadores	CE, AM	3					■	■		■		■					
Esterilización	SF, A, CFL, UV	1				■											
Tratamiento colágeno	CFL, H, CV, UV					■											
Inoculación del reactor	SF, CC, CFL	1							■		■		■				

Inoculación de andamios	CC, CFL																		
Cosecha del reactor	SF, CFL	1																	
Cosecha de andamios	SF, CFL	1																	
Conteo celular de corrida	C	1																	
Análisis de resultados	-	5																	
Avances RPAP	GP, BV	1																	
Entrega final	-	1																	
Presentación PAP	-	1																	
Junta PAP	GP, BV	1																	
Junta asesores	DM, AG	1																	

Tabla 2. Abreviaturas de los recursos empleados.

Recursos	
Abreviatura	Significado
DM	Dr. David Mendoza
AG	Mtra. Aida Guerrero
GP	Dra. Gabriela Porras
BV	Dra. Blanca Valdivia
SF	Spinner Flask
A	Autoclave
I	Incubadora
C	Contador
CC	Cultivo celular
F	T-Flask
CFL	Campana de flujo laminar
MI	Microscopio invertido
CV	Cámara de vacío
AM	Agitador mecánico
CE	Campana de extracción
UV	Caja luz UV
H	Horno

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Con el fin de lograr el objetivo de generar cultivos en 3D de células madre mesenquimales de placenta humana en andamios y microportadores de PLA, se realizaron cinco corridas. Los tratamientos utilizados para la expansión celular en los andamios fueron: fijación de colágeno (secado en horno, tratamiento dehidrotermal y exposición a luz UV) y la hidrólisis alcalina. En cuanto al Spinner Flask, se buscó estandarizar la expansión celular utilizando microportadores de PLA producidos por emulsión con solvente y recubiertos con colágeno. A continuación, se presenta la metodología utilizada y los resultados obtenidos.

Estructuras de PLA utilizadas

Los andamios constan de láminas de PLA, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. David Mendoza, éstas fueron recortadas con cúter caliente para formar los andamios en cuadrados de 1 cm², tal como se observa en la Figura 1.



Figura 1. Lámina de PLA.

La producción de los microportadores se realizó por emulsión con solvente utilizando trozos de las láminas de PLA. Se preparó solución estabilizante compuesta por 0.5% de alcohol de polivinilo (PVA) en agua destilada agitando durante 1 hora con calor [11]. El PVA es un polímero sintético soluble en agua que forma puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno presentes en los grupos esteres mediante una aceleración en la hidrólisis de la matriz de PLA, así como una miscibilidad parcial [12].

Para obtener una solución clarificada de PLA, se disolvieron 1.5 g de trozos de PLA en 30 mL de cloruro de metileno (CH₂Cl₂), dado que este compuesto permite disgregar al polímero. Una vez que la solución mostró transparencia, se vertió en 150 mL de solución de PLA/CH₂Cl₂ ya con la agitación activada a 350 rpm en campana de extracción, utilizándose un vaso de precipitados de 250 mL (Figura 2) [11]. La propela utilizada tiene un diámetro de

4.7 cm (Figura 3). Es recalable la mención de la resistencia del PVA ante el CH_2Cl_2 , siendo tal que éste puede fungir como estabilizador dada su nula degradación al mezclarse [13]. La relación aceite/agua (O/W por sus siglas en inglés) de la emulsión fue de 1:5



Figura 2. Incorporación de PLA en emulsión en agitación.



Figura 3. Propela utilizada para la agitación de la emulsión

Continuando con el proceso, la emulsión se sometió a agitación en un agitador mecánico durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se recuperaron los microportadores por filtración con membrana de $40\ \mu\text{m}$ (Figura 4), para que, finalmente, al cosechar se pudieran separar las células de los microportadores. Se enjuagaron los microportadores varias veces con agua destilada y se dejaron en desecador durante 2 días (Figura 5) [11].



Figura 4. Recuperación de microportadores.



Figura 5. Secado de microportadores de PLA en el desecador.

Hidrólisis alcalina de estructuras de PLA

Las estructuras de PLA, pese a que favorecen la adhesión de las células madre, carecen de porosidad suficiente para la optimización de la fijación celular. Por tanto, se realizan procedimientos que permiten modificar tal textura [14]. Uno de estos métodos es la hidrólisis alcalina.

La hidrólisis alcalina de las estructuras de PLA se llevó a cabo utilizando hidróxido de sodio (NaOH), el cual causa un incremento en la rugosidad del material y la densidad de ácido carboxílico en la superficie, propiciando la adherencia de las células madre [15]. Esto se debe a que el sodio reacciona con el PLA, formando una sal en la reacción de desesterificación y aumentando la hidrofiliidad [14]. Se sumergieron los andamios de PLA en solución de NaOH 0.1 M con agitación constante a 65°C durante 45 min [15], en el caso de los microportadores, se realizó el mismo procedimiento durante 20 min, sin agitación e incubando a 37°C.

Esterilización y recubrimiento de colágeno

Es necesario mantener esterilidad en el cultivo de células ya que esto propicia un cultivo proliferable y óptimo. Para mantener esta característica, se trabajó dentro de la campana de

flujo laminar durante todos los procedimientos realizados. El recubrimiento de las estructuras con colágeno se fundamenta en la mejora en la adhesión de las células a la molécula de PLA [8].

Para la esterilización de las estructuras de PLA (microportadores y andamios), se colocaron en cajas petri y se sumergieron en una serie de soluciones. Primero se sumergieron las estructuras en solución de Surfanios estéril al 0.5% hasta cubrirlas, dejando reposar durante 10 minutos. Este producto es utilizado para la eliminación de bacterias y moho gracias a su capacidad de función como detergente y desinfectante [16]. Después, se realizó un lavado de las estructuras durante 10 minutos en PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, por sus siglas en inglés) grado célula animal, retirándolas posteriormente. El PBS es una solución buffer conformada por cloruro de sodio, fosfato de sodio y, en algunos casos, cloruro de potasio y fosfato de potasio, ayudando a mantener un pH constante e isotónico [17]. En el caso de los andamios, se retiraron de cada solución con pinzas estériles. Por su parte, a los microportadores se les retiró cada solución con pipeta, ayudándose de un filtro de 40 μm estéril para recuperar los microportadores absorbidos por la pipeta.

Para continuar con la esterilización de las estructuras de PLA, se utilizó una caja UV. Primero se desinfectaron el interior de la caja y el aluminio con etanol al 70%. Se acomodó el aluminio al interior para reflejar la luz y se realizó una corrida de 3 min de UV de 254 nm. Se procedió a exponer las estructuras de PLA a la luz UV durante 18 minutos (Figura 6). A tal longitud de onda, se provoca un daño en los ácidos nucleicos dado a la formación de enlaces entre nucleótidos debido a la absorción de energía del ADN y ARN celular, resultando en una desactivación de los microorganismos y su replicación [18].



Figura 6. Esterilización de estructuras de PLA.

Las estructuras de PLA desinfectadas se utilizaron en t-flasks y en el biorreactor Spinner Flask. Éste último se lavó con agua y jabón y se dejó secar para su esterilización. Dentro de la campana de flujo laminar, se cubrió la superficie interior del reactor con Sigmacote sin diluir, dejándose secar durante 10 minutos y después enjuagándose con agua destilada. Este reactivo es una solución de un organopolissilozano clorado en heptano, el cual permite la formación de una película covalente microscópicamente fina sobre el vidrio, repeliendo el agua e impidiendo la adsorción superficial de proteínas básicas, en este caso, aquellas encontradas en la matriz extracelular (integrinas y cadherinas) [19].

Por último, el biorreactor permaneció en el horno a 100°C por 30 minutos para lograr una mejor fijación del Sigmacote y se esterilizó en autoclave [20]. Una vez siliconado, se enjuagó con agua destilada después de cada corrida (por máximo 20 corridas) y se repitió la esterilización en autoclave. Es importante señalar que el Spinner Flask que se utilizó tiene una fisura en la tapa central, por lo que se cubrió con cinta y aluminio durante todo el experimento para evitar contaminación.

La solución de colágeno utilizada para las estructuras de PLA constó de 20 mg de colágeno en 20 mL de Buffer TES 50mM, pH 7.4 con 0.36mM de cloruro de calcio, se mantuvo en constante agitación a 35°C durante un día antes de usarse para disolver. Se colocaron las estructuras de PLA en una caja Petri y se cubrieron con solución de colágeno, dejándose reposar durante 1 min y, al final, se retiraron de la solución [8].

Fijación de colágeno

Una vez recubiertas con colágeno las estructuras de PLA, se realizaron tres tratamientos distintos para determinar la mejor fijación del colágeno: secado en horno, tratamiento dehidrotermal (DHT) y exposición a luz UV posterior al secado en horno. Cabe destacar que la reticulación o fijación del colágeno se define como el proceso de formación de enlaces covalentes o enlaces químicos de secuencias relativamente cortas para unir dos cadenas poliméricas [15]. El tratamiento por radiación ultravioleta (UV) consiste en la inducción de

la formación de enlaces covalentes al encontrarse la molécula de proteína cerca de un radical libre. A su vez, DHT hace referencia a un método físico de entrecruzamiento que evita productos de reacción potencialmente citotóxicos y proporciona resistencia y reabsorción de las fibras de colágeno [21].

El secado en el horno se realizó a 70°C durante 24 horas [10] (Figura 7a). En cuanto a la reticulación dehidrotermal, se utilizó una caja Petri de vidrio estéril y se aplicó calor con ayuda de una placa de calentamiento cubierta con aluminio a 100°C dentro de la cámara de vacío durante 2 días (Figura 7b) [21]. La reticulación por exposición a luz UV a 254 nm durante 15 min se realizó con la caja utilizada para esterilizar [21] (Figura 7c). El secado en horno y el tratamiento dehidrotermal se realizaron posicionando las estructuras en cajas Petri invertidas para propiciar el intercambio de gases.

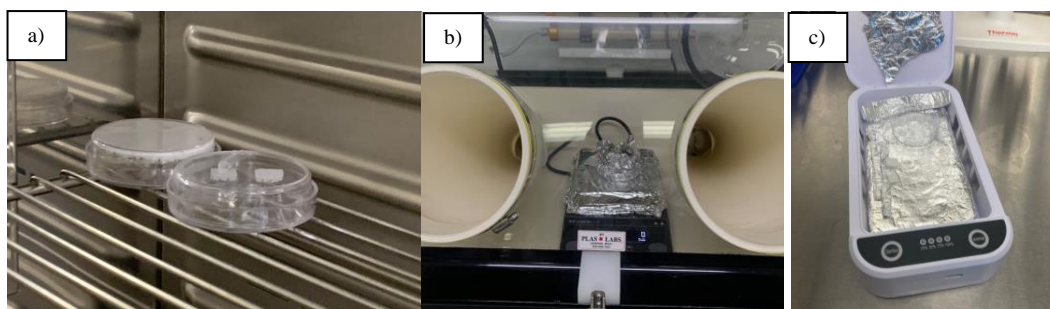


Figura 7. Tratamientos para la fijación del colágeno. a) Secado en horno a 70°C. b) Tratamiento DHT al vacío a 100°C. c) Exposición a UV a 254 nm.

Cultivo de los sistemas

Se considera como sistema al siguiente conjunto de elementos: el contenedor, el medio de cultivo, las células y la(s) estructura(s) de PLA. En el presente trabajo se realizó el cultivo celular en dos sistemas distintos: el primero contenido en t-Flask y utilizando el andamio como estructura de adhesión celular, mientras que el segundo fue contenido en el biorreactor Spinner-Flask y utilizando a los microportadores de PLA como estructuras de expansión celular.

Las células madre mesenquimales de placenta humana fueron proveídas por la Mtra. Aida Guerrero en todas las ocasiones. El inóculo se encontraba resuspendido en solución salina y

se centrifugó a condiciones de 2000 rpm, a 4°C durante 6 min. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y resuspendió el botón en 2 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, por sus siglas en inglés). Este reactivo es el medio más adecuado para fenotipos de células adherentes [22]. El conteo y determinación de viabilidad se realizaron antes de la entrega con el contador externo, y se trabajó con dicha información para determinar el volumen a inocular en el Spinner Flask y en los andamios durante las primeras dos corridas. No obstante, en las corridas 3, 4 y 5 se realizaron conteos por medio del contador de colonias Corning del ITESO, resuspendiendo el botón en 1.0 y 0.5 mL de solución salina (Spinner Flask y andamios, respectivamente), para así obtener resultados más certeros, eliminando la intermitencia del fenol. Las células a inocular fueron 15,000 células/cm², siendo así 15,000 células viables en cada andamio y 7.56x10⁶ células viables en el Spinner Flask. Las células sobrantes se inocularon en T-Flasks con el fin de monitorear la calidad del inóculo y contar con una reserva de células en el laboratorio.

En cuanto al medio de cultivo (MC) utilizado en los sistemas, se preparó la composición con base en la Tabla 3. En los andamios y el Spinner Flask se utilizó medio con SFB (Suero Fetal Bovino) al 2.5% el día “cero” para que las células se adaptaran al reactivo. Este reactivo funge como suplemente del medio del cultivo celular, permitiendo mejorar el crecimiento y la adhesión celular [23]. Por su parte, el antibiótico-antimicótico utilizado, de la marca *biowest*, contiene penicilina, estreptomycin y anfotericina B [24].

Tabla 3. Concentración de reactivos para el MC (medio de cultivo).

Reactivo	Concentración
SFB	2.5, 5 o 10%
Antibiótico	100X
L-glutamina	200 mM
DMEM	0.0

Después del día cero, se modificó la concentración del SFB de 2.5 a 5.0 %, tal como se muestra en la Tabla 4. En el caso de los T-Flask se utilizó una concentración de SFB al 10% desde el inicio. Cabe señalar que se aforó hasta lograr el volumen requerido con referencia al DMEM.

Tabla 4. Cronograma de actividades de corrida en andamios y Spinner Flask.

Día	Andamios	Spinner Flask
0	Inoculación en 5 mL de MC al SFB 2.5%	Inoculación en 25 mL de MC al SFB 2.5% Agregación de 0.35 g de microportadores
1	Cambio del 50% del MC con MC al SFB 5%	Ajuste del volumen de operación a 50 mL con MC al SFB 5% Agregar 1.04 g de microportadores
2	Incubación	Incubación
3	Incubación	Incubación
4	Cambio del 50% del MC con MC al SFB 5%	Cambio del 50% del MC con MC al SFB 5%
5	Incubación	Incubación
6	Cambio del 50% del MC con MC al SFB 5%	Cambio del 50% del MC con MC al SFB 5%
7	Cosecha	Cosecha

Todas las incubaciones se realizaron en condiciones estándar de 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. El MC se aclimató durante 15 minutos en incubación previo a cada uso.

En el día “cero”, para la inoculación en el Spinner Flask, se acondicionaron en incubadora 0.35 g de microportadores en 25 mL de MC con SFB al 2.5% durante 3 h dentro del biorreactor. Después se inoculó el MC con las células requeridas y se incubó durante la noche, para así permitir adherencia de las células a los microportadores y su adaptación al medio de cultivo. En cuanto a la inoculación en los andamios, se colocaron dentro de los T-Flask, acomodándolos de manera vertical para impedir que las células se adhirieran a la pared tratada. Se añadieron 0.5 mL de DMEM para aclimatarlos en incubación durante 30 min. Posteriormente, se retiró el DMEM, se dejó caer el inóculo en el centro de cada andamio y se incubaron durante 3 horas para que las células se adhirieran al material. Finalmente, se aforó con MC con SFB al 2.5% al volumen de operación de 5 mL y permanecieron en incubación (Figura 8).



Figura 8. Andamios en incubación

Ajuste de los sistemas

En el día “uno” se realizó un ajuste en el volumen de operación del Spinner Flask a 50 mL añadiendo MC con SFB al 5% y 1.04 g de microportadores previamente acondicionados en MC durante 15 min en incubación (Figura 9). Esto se llevó a cabo con el fin mantener un medio de cultivo fresco y óptimo para el crecimiento de las células. Se comenzó la agitación de 30 rpm por 30 min cada 4 h, permaneciendo en incubación (Figura 10). Por su parte, a los andamios se les realizó un cambio de MC del 50% al volumen de operación (2.5 mL).



Figura 9. Aclimatación de microportadores para el día de ajuste del Spinner-Flask



Figura 10. Incubación del Spinner Flask con agitación activada.

Cambio de MC y monitoreo del experimento

Los cambios de MC se realizaron con aquel que contenía SFB al 5% en los días “cuatro” y “seis”, como se describe en la

Después del día cero, se modificó la concentración del SFB de 2.5 a 5.0 %, tal como se muestra en la Tabla 4. En el caso de los T-Flask se utilizó una concentración de SFB al 10% desde el inicio. Cabe señalar que se aforó hasta lograr el volumen requerido con referencia al DMEM.

Tabla 4. En el Spinner Flask se esperó a que los microportadores se asentaran y se tomaron 25 mL de MC con ayuda de una pipeta estéril y cuidando de no tomar microportadores. A los andamios se les reemplazaron 2.5 mL del MC. Para el monitoreo de los sistemas, se separó 1 mL de muestra para su observación en el microscopio invertido en búsqueda de contaminación o características destacables, siendo documentado con fotografías. Enseguida del cambio de MC, se retornaron los sistemas a la incubadora.

Cosecha de los sistemas

Con el objetivo de recuperar las células adheridas a los sistemas (microportadores y andamios) se realizó la cosecha mediante técnica enzimática, utilizando Tripsina 0.25% EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Esta enzima es una mezcla radiada que contiene proteasas, las cuales

se derivan de páncreas porcino, recibiendo así una capacidad digestiva que permite la disociación celular y del tejido primario [25]. Este proceso es necesario debido a que las células madre se adhieren a la superficie dada la formación de una matriz, debiendo degradarla para lograr células en suspensión [26].

Para la cosecha del Spinner Flask se tomó una muestra de 1 mL para su observación en el microscopio invertido, buscando signos de contaminación o de anclaje celular a los microportadores. Se vertió todo el contenido (50 mL) del reactor en tubo Falcon de 50 mL estéril y se centrifugó a 2600 rpm durante 6 min a 4°C para, posteriormente, desechar el sobrenadante. Se añadieron a los microportadores 5 mL de solución HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, por sus siglas en inglés) sin sales y se retiró la solución tres minutos después. El uso de HBSS proviene de su capacidad de lavado de células previa a la disociación, así como el transporte de muestras y la dilución de células para el recuento [27].

Después del lavado, se agregó la Tripsina 0.25% EDTA a una proporción de 0.035 mg/cm² y se incubó a 37°C y 180 rpm durante 16 min. La proporción de tripsina se estandarizó durante el semestre de primavera 2022. Una vez terminado el proceso de tripsinización, se desactivó la reacción añadiendo 15 mL de HBSS con sales. Se filtró el volumen con un filtro de 40 micras para remover los microportadores de las células en solución. El volumen recuperado se centrifugó a 1700 rpm por 4 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante con micropipeta y se resuspendió el botón celular en 2 mL de solución salina al 0.85% estéril.

La cosecha de las células en los andamios siguió un protocolo parecido. Se tomó una muestra de 1 mL para la observación en el microscopio invertido siguiendo el borde del andamio. Se decantó el MC de los T-Flask y se añadió a los microportadores 1 mL de solución HBSS sin sales para enjuagarlos. Posteriormente, se retiró la solución tres minutos después. Se agregó 1 mL de Tripsina 0.25% EDTA y se incubó a 37°C y 180 rpm durante 6 min. Se desactivó la reacción añadiendo 2 mL de HBSS con sales. Se traspasó el volumen de cada andamio a un tubo Falcon, se centrifugó a 1700 rpm por 4 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de solución salina 0.85% estéril.

La concentración y viabilidad celular se determinaron utilizando el contador de colonias Corning, realizando al menos tres conteos por muestra para el cálculo del promedio. Se cuidó que el tiempo

entre la resuspensión de la muestra y el conteo no rebasaran los 30 min. Para preparar la muestra se realizó tinción con azul de tripano en relación 1:1, cargando 10 μ L en la cámara de conteo Corning, el tiempo entre la tinción y el conteo no rebasó el minuto.

Caracterización de microportadores en el SEM

Se caracterizaron muestras de estructuras de PLA (microportadores y andamios) en el microscopio electrónico de barrido (SEM), con el fin de evaluar el potencial de las superficies para el anclaje celular o de buscar señales de adhesión celular. El SEM es un dispositivo que genera un haz de electrones con el fin de iluminar la muestra por medio de diferentes detectores que recuperan los electrones generados en la interacción de la superficie de la misma. Finalmente, se crea una imagen que denota las características superficiales de los microportadores de PLA, es decir, forma, textura y composición química. Para realizar este proceso, la muestra debe ser previamente secada y cubierta con un elemento conductor de electricidad [28]. Algunas de las muestras analizadas tenían células adheridas, a éstas fue necesario realizarles un pretratamiento para fijar a las células, se les retiró el medio de cultivo, se enjuagaron con Hanks sin sales y después se colocaron en solución 2.5% glutaraldehído durante 1 h a 4 °C, finalmente se enjuagaron 3 veces en PBS 1X durante 10 min cada baño. Para la deshidratación de las muestras, éstas se colocaron en cajas Petri, se sumergieron en etanol y se evaporó por medio del horno a 70°C. Los baños de etanol fueron a las siguientes concentraciones: 30%, 50%, 70%, 90% y 100%, se repitió la concentración de 100 % al terminar la serie. Las muestras se fijaron en un portaobjetos con cinta de carbón, fijada a la vez con cinta de cobre, sopleteando con aire cada muestra. Se recubrieron las muestras con 12 nm de oro [29] y se montaron en los pines metálicos como se muestra en la Figura 11. Después, se observaron en el SEM a 10 kA, tomando medidas del diámetro y documentando fotografías relevantes para su posterior comparación.

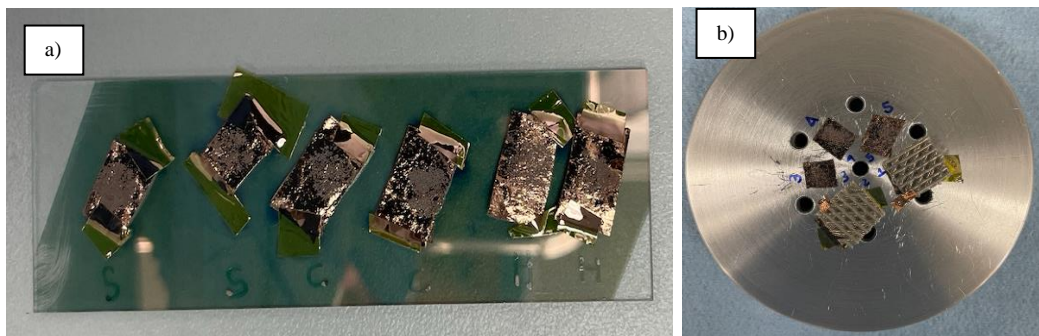


Figura 11. Montaje de muestras: a) para realizar recubrimiento en oro y b) para su observación en el SEM.

Análisis y discusión de resultados

Durante el periodo de primavera 2023 se realizaron cinco corridas experimentales de expansión celular en andamios y en Spinner Flask. La diferencia entre ellas yace en el diseño de experimentos y mejoras en el uso del equipo de conteo celular. En cuanto a la producción de microportadores por emulsión, se realizaron nueve emulsiones, en las cuales se modificaron variables como velocidad de agitación, equipo agitador y escala del proceso.

El protocolo para la producción de microportadores de PLA se detalló basándose en pruebas experimentales: primero se realizó la emulsión a una escala de producción de 3 g de PLA, agitación con agitador magnético y sin estabilizante (PVA), lo que llevó a la formación de cuerpos de PLA aberrantes debido a que la agitación no fue lo suficientemente turbulenta (Figura 12a). Después se ajustó la escala para producir 1.3 g de PLA, sin estabilizante (PVA) y utilizando una propela casera, las partículas lograron ser más homogéneas, pero aún no eran del tamaño deseado (Figura 12b). En el tercer intento se utilizó un agitador mecánico con velocidad de agitación de 400 rpm y se implementó el estabilizante (PVA), logrando producir las microesferas (Figura 4). Posteriormente, se realizaron pruebas incrementando la escala de producción a 1.5 g de PLA y variando la agitación a 350, 400 y 450 rpm. Se logró el objetivo de producir los microportadores con morfología homogénea, con la agitación de 350 rpm se obtuvo el mejor rendimiento que fue de un 96%, estableciendo así un protocolo reproducible.

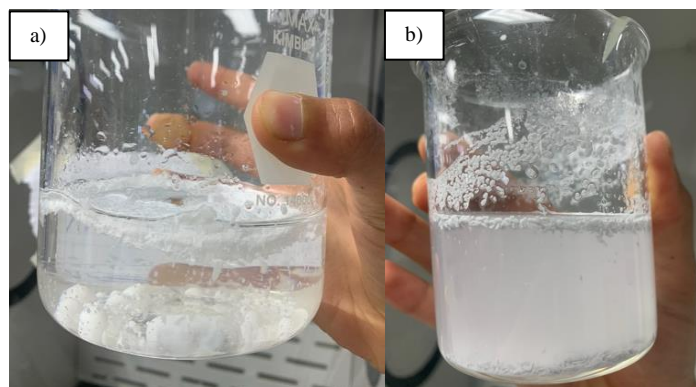


Figura 12. Primeros intentos de producción de microportadores de PLA: a) agitación con agitador magnético y b) agitación con propela casera.

En cuanto al análisis de cuatro muestras de microportadores en el SEM (Figura 13), se variaron parámetros como la velocidad de agitación, el tratamiento posterior (colágeno o hidrólisis) y sus efectos en el tamaño de partícula. Los resultados de las mediciones y el análisis estadístico se exponen en la Tabla 5.

Se caracterizó el tamaño de los microportadores como se muestra en la Figura 14. Como era de esperarse, el diámetro de los microportadores no fue menor a $40\ \mu\text{m}$ dado a la filtración realizada al recuperarlos de la emulsión, confirmando que en la cosecha sí se logran separar de las células y los microportadores no causan interferencia en el conteo celular. El efecto de la agitación impacta el tamaño de partícula: a mayor agitación, menor será el diámetro del microportador; utilizando como base la agitación de 400 rpm, hubo un aumento de un 16% en las partículas producidas a 350 rpm, mientras que en las producidas con agitación de 450 hubo un decremento de 13%, por otra parte, el tratamiento con colágeno aumentó el diámetro en un 14%. El diámetro de los microportadores Corning recubiertos con colágeno (utilizados en Primavera 2022), fue de 125 a $212\ \mu\text{m}$ [30], en cambio, los producidos en el presente proyecto tuvieron un diámetro de $97.1\ \mu\text{m}$ en promedio con una agitación de 350 rpm, se estima que el recubrimiento con colágeno aumenta $11\ \mu\text{m}$ el diámetro, por lo que los microportadores producidos a 350 rpm recubiertos con colágeno tendrían un diámetro de $109\ \mu\text{m}$. El efecto de la agitación también impactó el rendimiento de microportadores producidos en la emulsión, siendo de 88.7% con 400 rpm y de 96.0% con 350 rpm, lo anterior sucede debido a que hay más partículas con un diámetro menor a $40\ \mu\text{m}$ en la emulsión de 400 rpm

y en la filtración éstas se pierden. En la continuación del proyecto se sugiere realizar pruebas reduciendo la agitación de la emulsión a 300 y 250 rpm, para llegar al rango de diámetro de los microportadores Corning.

Se calculó por su parte el costo de la elaboración de los microportadores por emulsión, siendo éste de \$10.4 por gramo. El precio de los microportadores Corning recubiertos con colágeno es de \$356 por gramo [31]. Aunque no se toman en cuenta los costos de esterilización y recubrimiento en colágeno, se aprecia el potencial que existe de producir microportadores 30 veces más económicos que los comerciales.

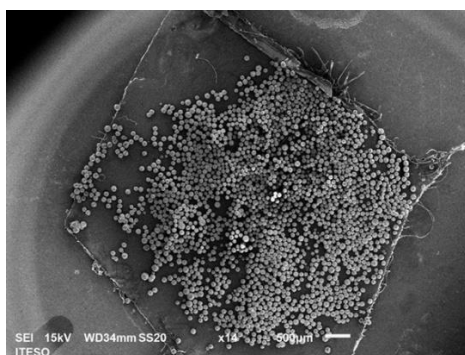


Figura 13. Microportadores vistos en SEM x14.

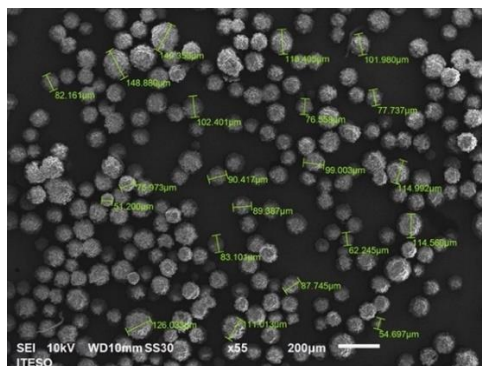


Figura 14. Medición de diámetro de microportadores vistos en SEM x55.

Tabla 5. Resultados de medición de microportadores en el SEM.

	PLA	PLA	PLA+Colágeno	PLA hidrolizado
Agitación (rpm)	400	350	400	450
Diámetro (µm)	84.0	97.2	95.8	73.4
Desviación estándar	22.8	31.9	26.3	11.2
CV	27.1%	32.8%	27.5%	15.3%

El análisis morfológico de los microportadores muestra que se tratan de esferas con una superficie irregular (Figura 15). Sin embargo, el método utilizado para la producción de microportadores de PLA por medio de emulsión logró que éstos tuvieran una superficie más suave que la obtenida por medio de molienda de láminas de PLA durante Otoño 2022, permitiendo así disminuir un posible daño a las células en el cultivo. Las características de la superficie de los microportadores con distintos tratamientos sí muestran características distintas entre sí (Figura 15). A diferencia del microportador sin tratamiento (Figura 16a y Figura 17a), el microportador recubierto con colágeno muestra la adherencia de dicho componente en forma de grumos irregulares (Figura 16b y Figura 17b); el microportador hidrolizado tiene un relieve menos redondeado (Figura 16c, Figura 17c) y además son observables puntos blancos (Figura 18), con una escisión probablemente causada por la corrosión del hidróxido de sodio; el microportador producido a 350 rpm muestra porosidad (Figura 16d y Figura 17d), la porosidad en los microportadores puede incrementar el anclaje celular a través del aumento del área superficial y la reducción de la densidad de la estructura, facilitando así la penetración celular y la difusión de nutrientes, el crecimiento celular dentro de la partícula protege a las células de estrés en el proceso de cultivo [31].

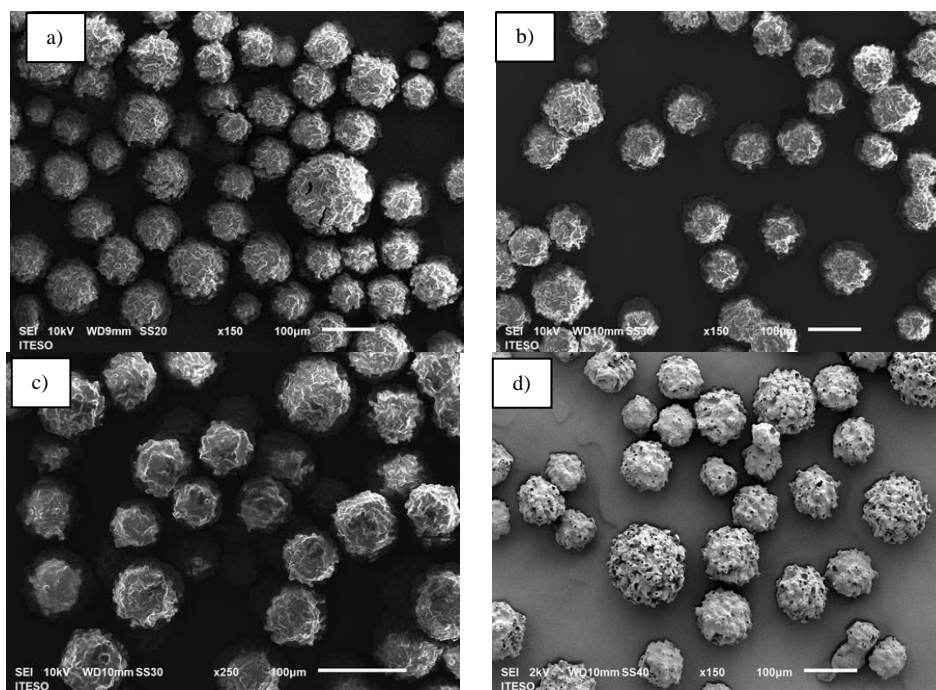


Figura 15. Conjunto de microportadores: a) 400 rpm, b) 400 rpm recubiertos en colágeno, c) 450 rpm hidrolizados y d) 350 rpm vistos en SEM.

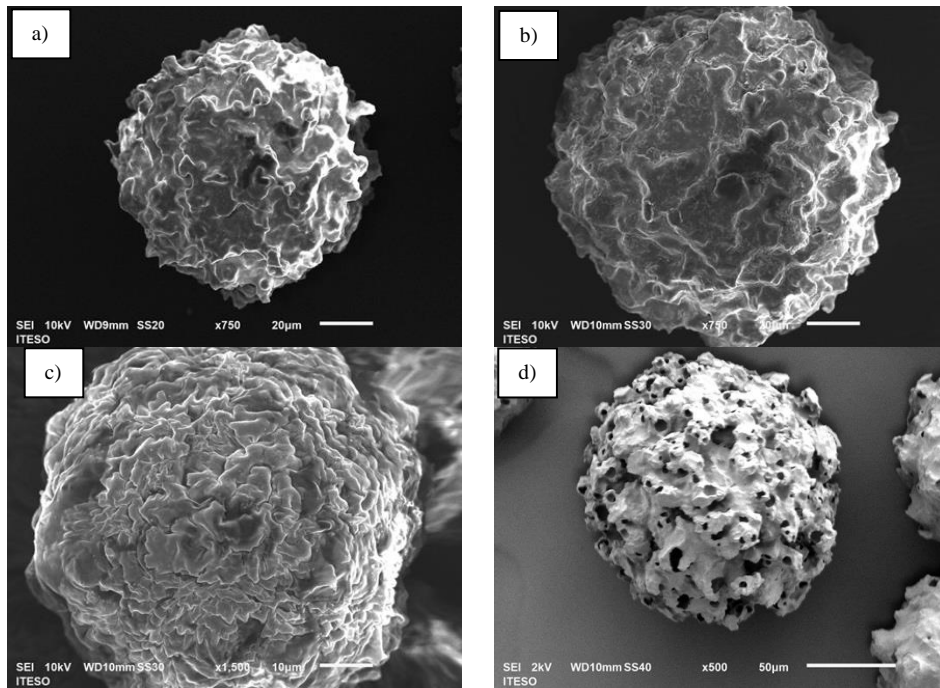


Figura 16. Microportador a) 400 rpm, b) 400 rpm recubiertos en colágeno, c) 450 rpm hidrolizados y d) 350 rpm vistos en SEM.

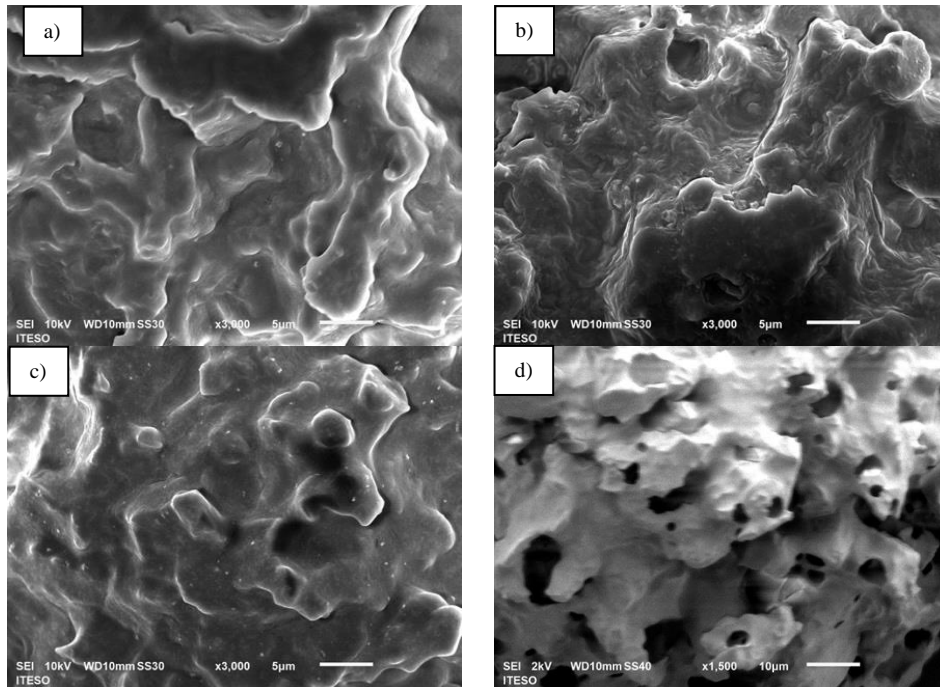


Figura 17. Superficie de microportador: a) 400 rpm, b) 400 rpm recubiertos en colágeno, c) 450 rpm hidrolizados y d) 350 rpm visto en SEM.

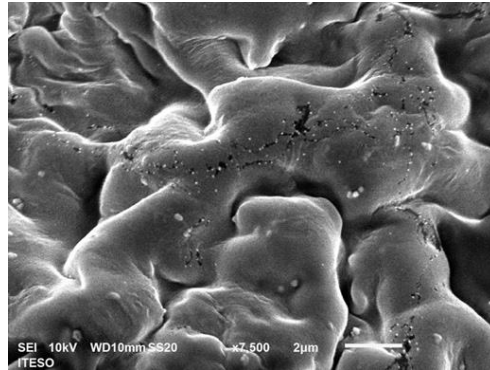


Figura 18. Superficie de microportador hidrolizado visto en SEM x8000.

En la primera corrida sólo se realizó la expansión de las células en andamios debido a que el protocolo para la producción de los microportadores seguía en fase de prueba. El diseño experimental de las corridas 1 y 2 se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Diseño de experimentos de andamios en las corridas 1 y 2.

Andamio	Tratamientos					Células
	Hidrólisis	Colágeno	Secado	DHT	Secado- UV	
1	x	x	x			x
2	x	x		x		x
3	x	x	x		x	x
4		x		x		x
5	x	x		x		

En la primera corrida se implementó una estrategia para limitar la expansión y adherencia celular a sólo la superficie del andamio [15]. Para esto se realizó el cultivo celular en cajas Petri con una estructura de agar, la cual fue preparada con agua Mili-Q y agarosa al 1.5%, con pH ajustado a 7.4, dándole forma a la estructura con ayuda de un bisturí estéril. Los andamios se acomodaron en el centro y se siguió el protocolo de cultivo previamente descrito ajustando los volúmenes de operación. Lamentablemente la composición del agar no fue la correcta debido a que absorbió todos los nutrientes del medio de cultivo, siendo al inicio completamente transparente y al final de la corrida de un color rosa fuerte (Figura 19). Al

realizar cambios de MC, su color rosa característico era ya amarillo. Este fenómeno imposibilitó a las células crecer en el andamio. Se cree que hubo una posible migración de las células hacia el agar. El conteo de las células cosechadas no fue posible, ya que la concentración celular se mantuvo por debajo del rango mínimo de conteo. El uso de la estructura de agarosa como línea de mejora no se volvió a retomar en las siguientes corridas. Se investigó un protocolo de mejora para la preparación de la composición de la agarosa que consiste en realizar una solución de agarosa al 2% en DMEM, esterilizar y una vez formada la estructura deseada, aclimatar en MC completo una noche precedente a su uso. En las corridas 2, 3, 4 y 5 se utilizaron T-Flask en lugar de cajas Petri, con la conformación visible en la Figura 8.

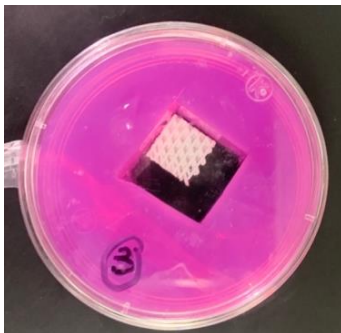


Figura 19. Estructura de agarosa al final de la corrida 1.

En la segunda corrida el volumen de inóculo se calculó con base en el conteo y viabilidad realizado por el contador celular externo. Al cosechar se resuspendieron las células en DMEM. En la Figura 20 se observa uno de los conteos procesados por el equipo de conteo. Al observar la muestra se descubrió que los andamios contaban con contaminación bacteriana.

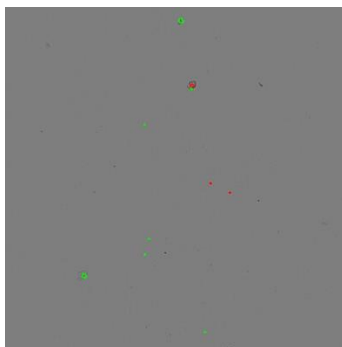


Figura 20. Cuento de células cosechadas en el andamio 3, corrida 2.

Los resultados de la segunda corrida se muestran en la Tabla 7, siendo tal que aquel con mayor nivel de viabilidad se obtuvo por parte del andamio con hidrólisis y reticulación del colágeno en UV, alcanzando un valor del 74.3%, mientras que el de menor nivel fue el andamio con hidrólisis y reticulación del colágeno por DHT. En cuanto al rendimiento de células viables producidas, se alcanzó un valor de 5.09 células viables/células inoculadas en el andamio sin hidrólisis y con reticulación de colágeno DHT, y el menor rendimiento lo obtuvo nuevamente el andamio con hidrólisis y reticulación del colágeno por DHT. Ahora evaluando el efecto de la hidrólisis (andamios 2 y 4), la hidrólisis del andamio resultó en un nulo crecimiento celular.

Tabla 7. Resultados expansión celular de la corrida 2.

Parámetro		Número de Andamio				
		1	2	3	4	5
Viabilidad	%	16.7%	0.00%	74.3%	46.9%	0.00%
Concentración	células/mL	2.2E+04	0.0E+00	8.3E+04	1.6E+05	0.0E+00
Células totales	células	2.2E+04	0.0E+00	8.3E+04	1.6E+05	0.0E+00
Rendimiento	células viables/ células inoculadas	0.24	0.00	4.13	5.09	0.00

La tercera, cuarta y quinta corrida de andamios siguió el diseño experimental de la Tabla 8. El volumen de inóculo se calculó con base en el conteo y viabilidad realizado por el contador Corning resuspendido en DMEM, sin embargo, al cosechar se resuspendieron las células en solución salina al 0.85% para que el conteo no tuviera interferencia por parte del rojo fenol.

En la Figura 21 y Figura 22 se muestran algunos conteos procesados por el equipo de conteo Corning, el primero del inóculo utilizado y el segundo de la cosecha.

Tabla 8. Diseño de experimentos de andamio en la corrida 3, 4 y 5.

Andamio	Tratamientos					Células
	Hidrólisis	Colágeno	Secado	DHT	Secado-UV	
1	x	x	x			x
2	x	x		x		x
3	x	x	x		x	x
4		x	x		x	x
5		x		x		x
6	x	x		x		

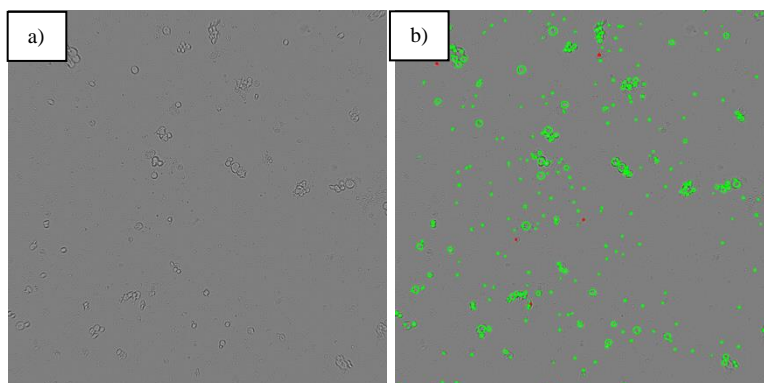


Figura 21. Conteo y viabilidad celular del inóculo de la corrida 3.

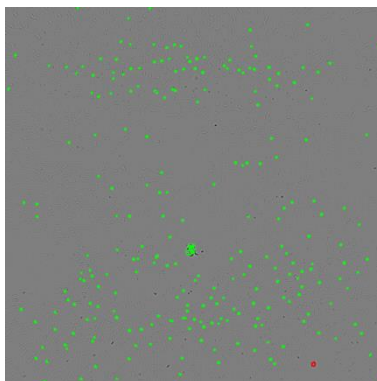


Figura 22. Conteo y viabilidad celular de células cosechadas en el andamio 5, corrida 3.

Los resultados de expansión celular de las corridas 3 y 4 se muestran en la Tabla 9. En cuanto a la corrida 5, todos los sistemas sufrieron de contaminación bacteriana alta, por lo que los resultados no se muestran en dicha tabla.

Evaluando el parámetro de viabilidad, se considera deseable un valor mayor al 85%, y un valor muy bajo con el 20%. Por tanto, en la corrida 3 el mayor nivel se obtuvo con los andamios 1, 4 y 5, mientras que el andamio 3 obtuvo el valor más bajo. En la corrida 4, el mayor nivel se obtuvo con los andamios 3 y 5.

En cuanto al rendimiento de células viables adheridas a los andamios con respecto a las células viables inoculadas, se busca un valor deseable mayor a 1, indicando así que no hubo pérdida de células. En la corrida 3 se alcanzó mayor rendimiento en los andamios 1 y 5, mientras que en los andamios 2 y 3 hubo pérdida de células. En la corrida 4, el mayor rendimiento se obtuvo con el andamio 3, mientras que en el andamio 2 hubo pérdida celular. Los resultados de la expansión en andamios de todas las corridas muestran que la hidrólisis del PLA no favorece al anclaje y la expansión celular. En cuanto al método de fijación del colágeno al material, al no haber repetitibilidad en entre las repeticiones no se definió cuál de los tratamientos mejoran a la fijación del colágeno en el PLA.

Tabla 9. Resultados expansión celular de las corridas 3 y 4 .

Parámetro		Número de Andamio					
		1	2	3	4	5	6
CORRIDA 3							
Viabilidad	(%)	98.1%	26.7%	0.00%	89.7%	97.3%	57.2%
Concentración	células/mL	3.2E+05	3.6E+04	0.0E+00	1.1E+05	1.4E+06	2.3E+05
Células totales	células	3.2E+05	1.8E+04	0.0E+00	5.4E+04	7.2E+05	1.2E+05
Rendimiento	células viables/ células inoculadas	20.8	0.323	0.00	3.24	46.9	4.41
CORRIDA 4							
Viabilidad	(%)	84.0%	80.2%	94.3%	83.1%	85.4%	81.8%
Concentración	células/mL	1.6E+05	2.7E+04	2.0E+06	1.9E+05	2.3E+05	1.6E+05
Células totales	células	8.0E+04	9.0E+03	6.5E+05	9.4E+04	1.1E+05	7.8E+04
Rendimiento	células viables/	4.46	0.481	41.0	5.21	6.49	4.25

*Cifras en color verde representan los valores más altos del parámetro.
Cifras en color rojo representan los valores más bajos del parámetro.

Se analizaron réplicas de los andamios 5 (con células) y 6 (sin células) de la corrida 4 en el SEM para buscar señales de adhesión celular a la superficie. En la Figura 23ab se observan en el andamio 5 estructuras ancladas a la superficie que no se encontraron en el andamio sin células (Figura 23c), por lo que podrían ser restos de las proteínas de la matriz celular.

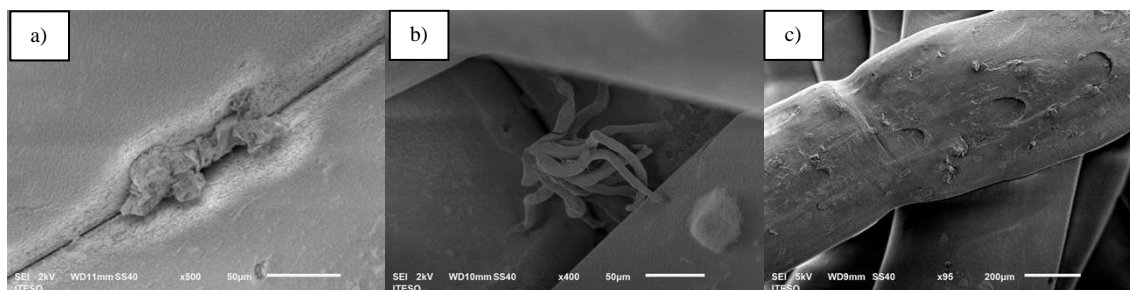


Figura 23. Muestras: a) y b) andamio 5 inoculado, c) andamio 6 no inoculado visto en el SEM.

Los resultados de la expansión celular en el Spinner Flask se muestran en la Tabla 10. En las corridas 2 y 3 se utilizaron microportadores recubiertos con colágeno fijado con secado en horno a 70°C. Como se aprecia en la Figura 24, después de 96 horas de cultivo se observan moléculas de colágeno en el medio, impidiendo que el recubrimiento cumpla su función de favorecer el anclaje de las células a la superficie de los microportadores. Es por lo anterior que, en las corridas 4 y 5, se implementó el tratamiento de reticulación DHT del colágeno en los microportadores; el rendimiento promedio al fijar el colágeno con secado fue de 0.096, mientras que al fijar al colágeno por DHT se obtuvo un valor de 0.118, demostrando así que dicho tratamiento favoreció el anclaje celular. A su vez, se identificó contaminación bacteriana en todas las corridas; su origen fue confirmado por una prueba de esterilidad realizada a los microportadores (Figura 25), no obstante, ésta fue disminuyendo ya que se realizaron mejoras en el método para la esterilización de los microportadores entre cada una, aplicando etanol al 70% antes de los surfanios, y al exponerlos en la luz UV se extendieron en una caja Petri de vidrio de 20 mL formando una capa más delgada. En cuanto al cultivo, hubo pérdida celular, como lo indica el rendimiento menor a uno en cada una de las corridas,

aproximadamente el 10% de las células viables inoculadas se anclaron a la superficie de los microportadores.

Tabla 10. Resultados de cultivo celular en Spinner Flask.

Parámetro		Número de corrida				
		1	2	3	4	5
Viabilidad	%	-	70%	97.9%	90.9%	86.8%
Concentración	células/mL	-	2.0E+05	3.8E+04	8.10E+05	1.2E+06
Células totales	células	-	4.0E+05	8.3E+04	8.10E+05	1.2E+06
Rendimiento	células viables/ células inoculadas	-	0.059	0.132	0.101	0.134

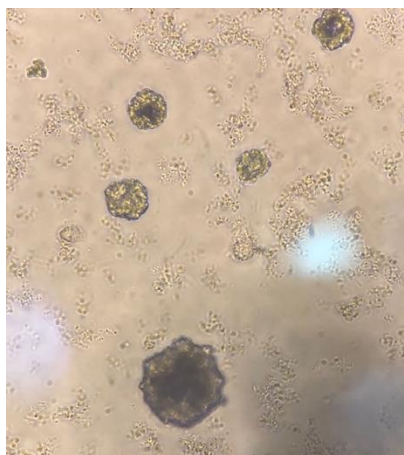


Figura 24. Muestra cultivo en Spinner Flask a las 96 h, corrida 2.

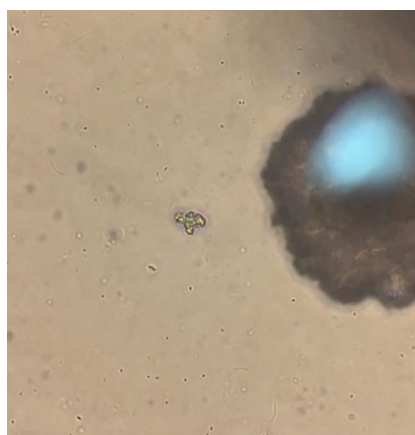


Figura 25. Contaminación bacteriana en microportadores identificada en prueba de esterilidad.

Se realizó un análisis de comparación cualitativa con el propósito de detectar señales de adhesión celular en los microportadores por medio de dos métodos: observación en el microscopio invertido y en el SEM. La observación de microportadores en el microscopio invertido comparó dos muestras: recubiertos en colágeno con reticulación por DHT y recubiertos en colágeno con reticulación DHT inoculados (muestra obtenida de la corrida 5 en Spinner Flask en el 7mo día de cultivo). En la Figura 26a se observan las partículas de colágeno dispersas, y en la Figura 26b se muestra la prueba de la adherencia celular a un microportador. En el SEM se analizaron microportadores de la corrida 4 recubiertos con colágeno mediante la técnica de reticulación DHT, preparando dos muestras: la primera de los microportadores sin inocular como control negativo (Figura 27a) y la segunda obtenida en el sexto día de la corrida 4 (Figura 27bc). Se lograron identificar estructuras adheridas a los microportadores ausentes en los microportadores control negativo, sugiriendo un posible rastro de adhesión celular; la frecuencia de dichos rastros fue baja.

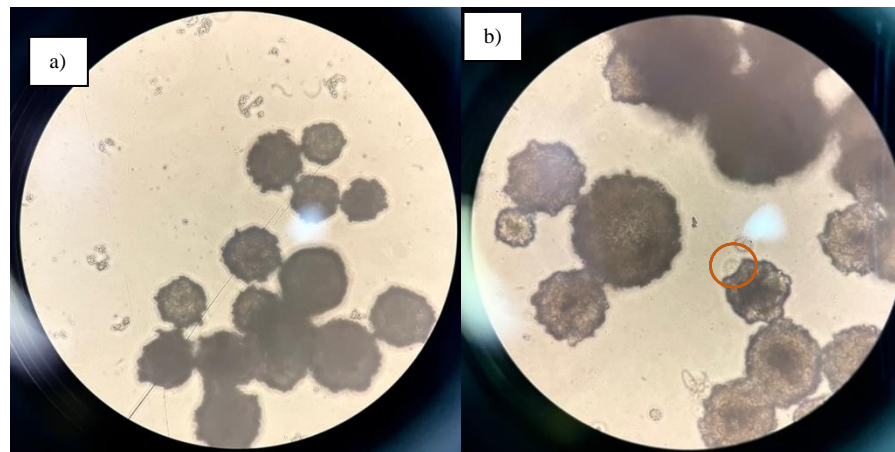


Figura 26. Microportadores a) recubierto con colágeno reticulado con DHT y b) recubiertos con colágeno reticulado con DHT y cultivados con células madre durante 7 días en Spinner Flask

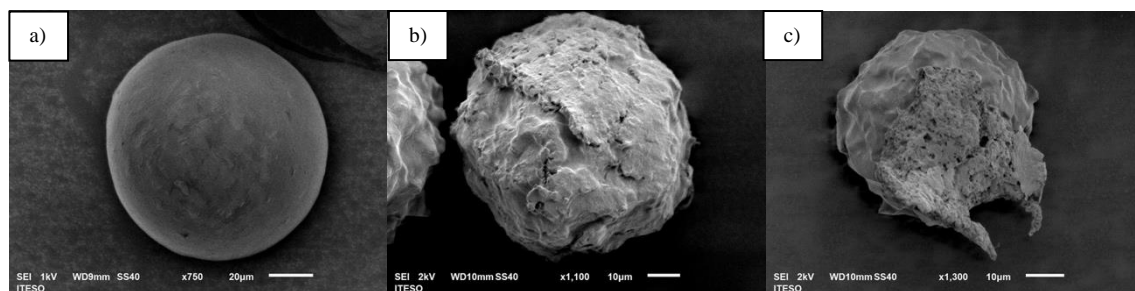


Figura 27. Microportadores a) recubierto con colágeno reticulado con DHT y b) c) recubiertos con colágeno reticulado con DHT y cultivados con células madre durante 6 días en Spinner Flask

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Los resultados obtenidos demuestran que una hidrólisis previa al material utilizado, es decir PLA, contrario a la literatura, resulta no ser benéfico en cuanto a la adhesión celular. Por su parte, en cuanto a la reticulación de colágeno, se observa que un método físico como DHT permite una mayor expansión celular en comparación con los otros métodos estudiados. Asimismo, se determinó una nueva técnica para la producción de microportadores, por medio de una emulsión, estandarizando el proceso en la elaboración de los mismos. Es probable que se pueda incrementar el tamaño de las partículas si se disminuye la agitación. Se sugiere llevar a cabo una investigación y aplicación de técnicas pertinentes para la normalización de protocolos que mejoren el proceso de esterilización de los microportadores.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1 M. E. Castaño, «Cultivos celulares,» *Biogénesis* , pp. 29 - 45, 2007.
]
- [2 Universidad de Cornell, «Capítulo 1: Introducción al cultivo celular,» EHU, 2012. [En línea]. [Último acceso: 23 febrero 2023].
- [3 Y. Y. Lozano, D. C. Ochoa y Á. C. Zapata, «Cultivos de células animales: historia, aplicaciones y perspectivas,» *Ámbito Investigativo*, vol. 4, n° 1, 2019.
- [4 ITESO, «Laboratorios ITESO,» ITESO, 2023. [En línea]. Available: <https://laboratorios.iteso.mx/dpti-laboratorio-de-biotecnologia/>. [Último acceso: 23 febrero 2023].
- [5 Mayo Clinic, «Células madre: qué son y qué hacen,» 18 Mayo 2022. [En línea]. Available: <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/bone-marrow-transplant/in-depth/stem-cells/art-20048117>. [Último acceso: 26 Enero 2023].
- [6 California's Stem Cell Agency, «Las células madre como terapias,» California Institute for Regenerative Medicine, 2022. [En línea]. Available: <https://www.cirm.ca.gov/our-progress/las-c%C3%A9lulas-madre-como-terapias>. [Último acceso: 27 Enero 2023].
- [7 M. A. Sahagún, «Desarrollo y estandarización de cultivo 3D de células madre mesenquimales humanas,» Jalisco, 2021.
- [8 M. Mercado Coello, «Estandarización de cultivo en 3D de células madre mesenquimales humanas en andamios de PLA,» Jalisco, 2022.
- [9 A. G. Alejandro, «Estandarización de la cosecha de células madre mesenquimales de placenta humana cultivadas en reactor Spinner Flask,» Jalisco, 2022.

- [1 E. V. Islas Semadeni y A. G. Alejandro Enríquez, «Estandarización de cultivo en 3D 0] de células madre mesenquimales humanas en un reactor Spinner Flask y en andamios de PLA en el CEGINT, ITESO,» Jalisco, 2022.
- [1 Y. Hong, C. Gao , Y. Xie, Y. Gong y J. Shen, «Collagen-coated polylactide 1] microspheres as chondrocyte microcarriers,» *Elsevier, Vol. 16, No. 32*, pp. 6305-6313, 2005.
- [1 L. Yanping, W. Hanghang, W. Zhen, L. Qian y T. Nan, «Simultaneous Enhancement 2] of Strength and Toughness of PLA Induced by Miscibility Variation with PVA.,» *Polymers*, vol. 10, 2018.
- [1 R. S. Raghuvanshi, S. Goyal , O. Singh y A. Panda, «Stabilization of dichloromethane- 3] induced protein denaturation during microencapsulation,» *Pharm Dev Technol*, vol. 3, nº 2, pp. 269-276, 1998 .
- [1 M. Sabee, M. Meer, K. Nurulain, Y. Badrul y Z. A. Hamid, «Characterization and In 4] Vitro Study of Surface Modified PLA Microspheres Treated with NaOH,» *Journal of Polymer Materials*, vol. 33, pp. 191-200, 2016.
- [1 B. Teixeira, P. Aprile y R. Mendonça, «Evaluation of bone marrow stem cell response 5] to PLA scaffolds manufactured by 3D printing and coated with polydopamine and type I collagen,» Febrero 2018. [En línea]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29480562/>. [Último acceso: Febrero 2023].
- [1 Biolab, «Surfanios Premium - detergente desinfectante suelos y superficies,» Biolab, 6] 2023. [En línea]. Available: <https://www.ddbiolab.com/product/0N-21-51>.
- [1 Científica SENNA, «Buffer (PBS),» Científica SENNA, 2023. [En línea]. Available: 7] <https://www.cientificasenna.com/producto/buffer-pbs/>.
- [1 Logiclean, «Desinfección y Esterilización con Luz Ultravioleta,» Logiclean, 2017. [En 8] línea]. Available: <https://logicclean.es/la-desinfeccion-esterilizacion-luz-ultravioleta/#:~:text=Acci%C3%B3n%20Germicida%20de%20la%20Luz%20Ultravioleta,-Debido%20a%20su&text=Los%20microorganismos%20se%20desactivan%20por,corta%20principalmente%20a%20254%20nm>.
- [1 Merck, «Sigmacote,» Merck, 2022. [En línea]. Available: 9] <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/sl2>.
- [2 Sigma-Aldrich, «Product Information Sigmacote,» 2016. 0]
- [2 K. Weadock, E. Miller y L. Bellincampi, «Physical crosslinking of collagen fibers: 1] Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment,» Wiley, 1995. [En línea]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.820291108>. [Último acceso: Febrero 2023].
- [2 Merck, «Medios y tampones clásicos,» Merck, 2023. [En línea]. Available: 2] <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-media-and-buffers/classical-media-and-buffers>.
- [2 L. Escobar, S. Morantes, C. Cordero y F. Aristizábal, «Implementación de estrategias 3] in vitro para evaluar la funcionalidad de un suero fetal bovino colombiano,» *SciELO*, vol. 40, nº 2, 2011.

- [2] Biowest, «L0010 – Antibiotic-Antimycotic 100X,» Biowest, 2023. [En línea].
 4] Available: <https://biowest.net/antibiotic-antimycotic-100x-l0010/>.
- [2] GIBCO, «3800. TRYPsin-EDTA (0.25%), PHENOL RED 100ML - GIBCO,» CTR
 5] Scientific, 2023. [En línea]. Available: <https://ctrscientific.com/products/trypsin-edta-0-25-phenol-red-100ml-gibco>.
- [2] Q. Rafiq, K. Brosnan, K. Coopman, A. Nienow y C. Hewitt, «Culture of human
 6] mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor,» *PubMed*,
 vol. 35, n° 8, pp. 1233-1245, 2013.
- [2] GIBCO, «Gibco™ HBSS, sin calcio, sin magnesio, sin rojo fenol,» Fishersci, 2023.
 7] [En línea]. Available: <https://www.fishersci.es/shop/products/gibco-hbss-without-calcium-magnesium-phenol-red-4/12549069>.
- [2] Scai uma, «Microscopía Electrónica de Barrido,» Scai Uma, 2023. [En línea].
 8] Available: <https://www.scai.uma.es/areas/micr/sem/sem.html>.
- [2] Z. Haifeng, M. Xiyuan y D. Zijing, «Three dimensional printed macroporous polylactic
 9] acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size
 rat calvarial defect model,» Febrero 2016. [En línea]. Available:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14686996.2016.1145532>. [Último
 acceso: 15 Marzo 2023].
- [3] N. Strathearn y A. Pardo, «Parameters to Consider When Expanding Cells on Corning
 0] Microcarriers,» Corning Incorporated, Kennebunck.
- [3] S. Xudong, S. Lei y J. Jian, «Biodegradable Polymeric Microcarriers with Controllable
 1] Porous Structure for Tissue Engineering,» Diciembre 2009. [En línea]. Available:
<https://doi.org/10.1002/mabi.200900224>. [Último acceso: Abril 2023].

1.8. Anexos generales

[Este apartado es opcional, entendiéndose por anexos generales todo lo que de sustento al documento para su mejor comprensión, como planes de trabajo detallados, cronogramas, materiales elaborados, bitácoras, fichas de trabajo, fotografías, gráficas, estadísticas, etc.]

2. Productos

Ficha descriptiva del producto 1.

Nombre y código del PAP	Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental, Energética y Alimentaria II (4D08B).
Nombre del proyecto	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.
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Protocolo para una mejora en la reticulación de colágeno de andamios y microportadores a partir de una técnica física conocida como tratamiento dehidrotermal. Es un protocolo que pueden utilizar personas que busquen y fomenten la continuidad del proyecto en otoño 2023.
Autores:	Ximena De Unánue Gutiérrez y Judith Vázquez Hernández

Ficha descriptiva del producto 2.

Nombre y código del PAP	Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental, Energética y Alimentaria II (4D08B).
Nombre del proyecto	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.
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Es una técnica para la elaboración de microportadores con base en un proceso de emulsión, así como su posterior recubrimiento de colágeno. Es un protocolo que pueden utilizar personas que busquen y fomenten la continuidad del proyecto en otoño 2023.
Autores:	Ximena De Unánue Gutiérrez y Judith Vázquez Hernández

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

Ximena De Unánue Gutiérrez:

Ser parte del presente proyecto me permitió contribuir a un trabajo que tiene como objetivo el bienestar personal, impactando en la salud de las personas y la vida digna, así como la calidad de vida de los mismos dado que busca beneficiar a personas con necesidad de terapia regenerativa. Por su parte, me acercó al área clínica y médica de la biotecnología dadas las posibles aplicaciones finales del PAP, es decir, la terapia regenerativa. Para esto, es necesario tomar en cuenta diversos factores que permiten la optimización del producto final, basándose éstos en la búsqueda de la accesibilidad y factibilidad de lo llevado a cabo, disminuyendo los recursos y costos de operación y permitiendo una estandarización del proceso mismo. Por su parte, la ética profesional es de suma importancia, debido a que, para la obtención de un resultado que realmente cumpla su propósito, es necesario el transmitir la información verídica.

En cuanto al área biotecnológica, personalmente pude aprender más en cuanto a la búsqueda y resolución de problemas, adquisición de literatura externa y estudio de los propios cultivos celulares utilizados con el fin de proponer soluciones ante problemáticas que se iban presentando, pudiendo unir, finalmente, lo experimental y lo investigado de una manera más vasta. Finalmente, pude apreciar de una manera más tangible la responsabilidad como biotecnólogo y el desarrollo de los proyectos dentro de esta área que pueden proveer de ventajas a la sociedad, sobre todo dentro del área clínica y médica.

Judith Vázquez Hernández

Tener la oportunidad de añadir valor al presente proyecto me abrió un mundo en el área de la Biotecnología médica. El cultivo de células madre mesenquimales tiene aplicaciones en la medicina regenerativa y el tratamiento de una gran variedad de enfermedades, mejorando en gran medida la calidad de vida de las personas.

Una de las limitaciones es la expansión de las células, ya que se requiere de un área superficial de anclaje que es muy limitada en los métodos de cultivo convencionales en 2D. El desarrollo de protocolos de expansión utilizando microportadores aumenta el área de anclaje, pero una limitante es el costo de los mismos. En el proyecto, el desarrollo de microportadores más económicos podría hacer de los tratamientos con células madre más accesibles para las personas candidatas a tratamientos de esta índole.

La regeneración de tejidos utilizando las células madre como tratamiento puede beneficiarse utilizando andamios como superficie de anclaje, para que así las células diferenciadas al tejido a tratar puedan impantarse con facilidad en el área a dañada. El uso del PLA como superficie de anclaje es biodegradable, por lo que sería biocompatible. Dicha característica es importante ya que se puede hablar de implantaciones de los andamios sin rechazos, o incluso ver a los microportadores como “andamios inyectables”.

Algunas consideraciones éticas sobre el proyecto es el origen de las células madre; ha sido controversial el uso de células madre embrionarias debido a que implica la destrucción de embriones para su aislamiento, entrando en el paradigma sobre en qué momento comienza la vida humana y los derechos que tiene en cada etapa de desarrollo. El proyecto utiliza células madre mesenquimales aisladas de placenta humana, así que no hay ningún problema ético en su uso para la investigación, que al final beneficiará a la salud de una gran cantidad de personas.

3.2 Aprendizajes logrados

Ximena De Unánue Gutiérrez:

En el presente PAP pude practicar técnicas de cultivos animales vistas en semestres anteriores, pensando que éstas se encontraban olvidadas cuando realmente no fue así. Por su parte, al trabajar de manera independiente, es decir, sin la supervisión de un maestro o siguiendo prácticas dadas por los supervisores, pude tener más confianza en mí y en mis técnicas de manejo de los materiales y equipos, así como de los mismos cultivos celulares utilizados. Por su parte, pude adquirir más conocimientos a partir de otros protocolos recuperados de la literatura y hacerles frente a las problemáticas surgidas. En un principio fue complicado el saber por dónde se iba a comenzar y sobre todo cómo formular un producto funcional para lo que se buscaba resolver, sin embargo, una vez avanzado el proyecto fue posible entender que esto no es tan difícil, tan sólo se debe tener una buena base de investigación previa y estar atento a cualquier incierto que surja para su pronta resolución. Mencionado lo anterior, puedo establecer que aprendí más de la búsqueda de soluciones y esto me generó valentía al momento de equivocarme, ya que muchas veces de estos mismos errores se generaba un mayor conocimiento y entendimiento del tema. Por su parte, al trabajar en equipo pude aprender más de mi compañera e incluso del manejo de tiempos según los objetivos planteados para el proyecto.

Finalmente, lo más rescatable es que aprendí a estandarizar un proceso, siendo que anteriormente recibía las cantidades específicas para la correcta adhesión y expansión celular. Además, comprendí cómo llevar a cabo la producción de microportadores y el correcto uso de éstos, dado que no los había utilizado previamente.

Judith Vázquez Hernández

Lo más retador para mí durante el desarrollo del proyecto fue el inicio. Ya existían protocolos optimizados durante semestres pasados, así que requirió de mucho tiempo de estudio para el entendimiento de cada protocolo involucrado y su fundamento teórico, algo crucial al momento de tener que tomar decisiones para resolver imprevistos de la mejor manera. Para desarrollar las propuestas de mejora, se necesito de una investigación profunda, en donde desarrollé habilidades para identificar ideas que pudieran ser factibles en el contexto del proyecto tomando en cuenta los recursos disponibles en el ITESO, también fui muy meticulosa en que ningún detalle se nos escapara para que al momento de realizar los

experimentos supiéramos exactamente qué hacer. La habilidad de planeación de actividades de manera independiente involucró coordinarnos con cuatro laboratorios distintos para lograr obtener los resultados y análisis deseados.

Sobre la marcha surgieron imprevistos que me enseñaron a evaluar las posibles causas del problema y actuar desde las tangentes adecuadas, a dialogar con mi compañera para tomar la mejor decisión en conjunto. El platicar las problemáticas con compañeros y maestros nos ayudó a ingeniar soluciones e identificar de qué manera mejorar algún aspecto del experimento.

Aprendí que la estandarización de un proceso nuevo no es fácil. Además, aplicar protocolos que le funcionaron a otros investigadores implica realizar ajustes a los recursos y materiales disponibles, en específico con la producción de los microportadores y el tratamiento dehidrotermal.

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

Tabla 11. Inventario de competencias- Ximena De Unánue Gutiérrez

	Competencia		Evidencia	Relevancia/ Fortaleza*	Competencias nuevas	Competencias potencializadas
Categoriza las competencias en conocimientos, habilidades y actitudes.	Conocimientos	Aislamiento de células madre por medio de distintos métodos.	Se llevó a cabo el proceso a través de los métodos de explantes y digestión enzimática, estableciendo, propiamente, la concentración	Puedo aislar y propagar <i>in vitro</i> las células madre a utilizar, conociendo fundamentos básicos de distintas	Comprendí técnicas especializadas y estandarizadas para llevar a cabo el proceso.	Puedo aislar y propagar <i>in vitro</i> las células madre a utilizar, sabiendo escoger la mejor técnica según las condiciones que se tengan. Además, ahora

Escribe la o las evidencias de cada competencia y su relevancia.		del medio de cultivo.	técnicas, así como facilitar el entendimiento de una nueva técnica que pueda utilizarse, teniendo las bases y “cimientos” previos.		no cuento únicamente con bases, sino también con información específica a tratar.
	Criopreservación de células madre.	Se llevó a cabo el pertinente almacenamiento, tanto del cultivo primario como de las líneas celulares establecidas, por medio de la criopreservación.	Puedo ayudar en el proceso de almacenamiento con el fin de mantener la viabilidad y funcionalidad celular, evitando pérdidas de la línea celular por contaminación o cambios genéticos.	No se llevaron a cabo estas técnicas, sin embargo, comprendí el uso de distintas técnicas para la reticulación de colágeno en andamios y microportadores, así como la formulación y producción de los últimos mencionados.	Finalmente, comprendo el mejor método para la reticulación de colágeno, analizando los demás utilizados, así como las ventajas y desventajas de todos. Perfeccioné a su vez el tamaño de los microportadores, comparándose

		<p>Descongelación y expansión de células animales.</p>	<p>Se llevó a cabo un proceso de descongelación mediante la técnica de descongelación rápida con el fin de recuperar las células aisladas y expandirlas para obtener el mayor número de células posibles, siendo tal que los cultivos <i>in vitro</i> deben mantenerse en condiciones rigurosas de cultivo e incubación, evitando así pérdidas en su capacidad de proliferación y potencial diferenciación.</p>	<p>Puedo realizar la descongelación de las células madre por medio de la técnica aprendida, evitando la alteración y pérdida en su expansión y proliferación.</p>		<p>con el tamaño comercial óptimo.</p>
--	--	--------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	----------------------------------------

		<p>Conteo y viabilidad celular.</p> <p>Se llevó a cabo un conteo celular por medio del uso de cámara de Neubauer y colorante azul de tripano para la visualización de la viabilidad celular.</p>	<p>Puedo realizar el procedimiento de exclusión de colorantes con el fin de lograr el conteo de las células viables, teniendo en cuenta que las células vivas no toman ciertos colorantes, mientras que las muertas sí, facilitando así la visualización a partir de la morfología celular.</p>	<p>Se llevó a cabo el entendimiento de distintos dispositivos nuevos para el conteo celular, no obstante, se tenían aún problemas de comprensión en algunos casos y dificultad para deducir la presencia de células en la imagen.</p>	<p>Perfeccioné el uso del dispositivo <i>Corning</i> para el conteo celular, aprendiendo a su vez sobre los factores de dilución y la importancia de éstos, así como el uso de colorante esencial y evitar alteraciones con otros (e.g. rojo fenol).</p>
	Habilidad	<p>Realicé un proyecto bajo la definición de</p>	<p>Puedo reconocer si llevar a cabo</p>	<p>Se reconocieron aquellas ideas</p>	<p>Reconozco la importancia de la factibilidad</p>

		factibilidad y viabilidad.	producto mínimo viable con el fin de transformar algo factible a viable.	un proyecto es factible, es decir, que se pueda hacer y también comprender si éste es viable, es decir, que valga la pena llevarlo a cabo.	que debían llevarse a cabo dada su factibilidad y se descartaron aquellas que no tenían sentido o eran muy complicadas.	antes que la viabilidad, dado que, aunque una idea parezca buena y replicable, puede que finalmente el objetivo de la misma no aporte significativamente a los resultados o sea inútil en el proceso, llegando incluso a afectar lo realizado.
		Análisis metódico del proceso.	Generalmente, antes de comenzar un proyecto, observar los procesos y calcular los reactivos específicos a utilizar.	Puedo optimizar los recursos al conocer, primeramente, a fondo el proceso, comprendiendo las cantidades necesarias para evitar un desperdicio	Se analizó el proceso con el fin de estandarizar el cultivo celular, buscando la disminución de residuos y uso de equipos.	Tomo en cuenta distintos detalles minuciosos que antes no, pudiendo estandarizar procesos importantes en los proyectos (en este caso específico, sé estandarizar procesos de reticulación de

				en cuanto a los recursos.		colágeno y producción de microportadores).
	Análisis de la metodología y literatura.	En anteriores proyectos, sé investigar con anticipación un proceso y, a partir de esto, discernir lo que se llevará a cabo, teniendo como base previa distintos documentos de experimentación (literatura).	Puedo investigar a partir de lo ya realizado, tanto en ITESO como en fuentes externas, con el fin de comprender los mejores métodos para llevar a cabo, así como de ideas novedosas que puedan mejorar el proceso.	Se leyeron los distintos rPAPs precedentes al presente, pudiendo comprender las problemáticas y perspectivas. A su vez, se estudiaron distintos protocolos recuperados de diversos autores, analizando los procesos a realizar.	Conozco cómo seguir “el hilo” de un proyecto dada una investigación previa, juntando las posibles ideas (perspectivas) de los anteriores participantes con protocolos (literatura), para así encontrar la mejor solución y el avance del proceso.	
	Análisis de las ideas con el fin de lograr cierto objetivo, así	En el área de la biotecnología es necesario saber los pros y contras de	Puedo analizar el problema y buscar la solución	A partir de los problemas presentados se buscó mejorar la técnica.	Se piensa en las distintas maneras de resolver las problemáticas	

		como la rápida resolución de problemas.	cierta solución, con el fin de encontrar la más apta según la problemática presentada.	que sea más adecuada, comprendiendo el panorama general, así como cada punto a favor o en contra, debido a que siempre es necesario tener varias opciones y estudiarlas hasta encontrar la óptima.		abordadas, así como tener varias resoluciones ante esto por si una no funciona o en dado caso de que ambas respuestas sean de utilidad, pero una optimice más el proceso que otra.
	Actitudes	Disposición para el trabajo colaborativo y diálogo crítico.	He llevado a cabo proyectos en equipo, manteniendo la cooperación y evitando el deterioro del trabajo.	Puedo comprender las distintas habilidades de cada participante y buscando que la cooperación ocurra de manera cordial,	Mantuve comunicación constante y la búsqueda de un buen ambiente de trabajo.	Comprendo las diferencias de cada integrante y los tiempos de los mismos, así como las aptitudes con el fin de relegar tareas y objetivos, permitiendo que cada uno disfrute

				siendo un ambiente sano para todos.		del proceso y el ambiente generado.
	Facilidad de adaptación en distintas áreas.	Me he adaptado a distintas áreas de mi carrera, comprendiendo y analizando cada una.	Puedo llevar a cabo distintas situaciones que, a su vez, involucren distintas áreas laborales que se encuentran en mi carrera.	Pude a cabo dos distintos de cultivos, siendo éstos 2D y 3D para su final optimización.		Reconozco las distintas áreas de mi carrera, aprendiendo aquellas que más me gustan y comprendo, siendo el estudio de cultivos celulares una de mis favoritas.
	Rápida resolución de problemas.	Me he adaptado a los problemas que puedan ocurrir al enfrentarme a un proyecto científico de investigación y experimentación.	Puedo comprender y analizar las problemáticas presentadas, concentrándome en encontrar diversas soluciones para su	Se analizaron las situaciones presentadas y las diversas soluciones para la resolución de problemas.		Entiendo los distintos resultados para la posterior toma de decisiones, manejando las buenas prácticas de laboratorio y fomentando el trabajo en equipo.

				estudio y posterior elección de aquella que sea más apta según la situación presentada.		
		Análisis basado en la bioética.	Cursé el eje de debates que lleva por título “Bioética”.	Puedo entender los límites de la ciencia y discernir entre lo que está bien o mal en la presente área de estudio, priorizando siempre el bien social.	Trabajé con base en la honestidad, responsabilidad y ética profesional.	Me rijo por la honestidad y ética, reconociendo que los resultados verídicos son aquellos que permiten el éxito de proyectos con enfoque en el bien común.

El análisis de competencias antes, durante y después del proyecto es de suma importancia dado que se puede realizar una introspección del crecimiento que se obtuvo después de llevar a cabo tal experimentación, observando a su vez si las competencias adquiridas se relacionaron con los objetivos del proyecto. En el caso específico del presente trabajo, fue posible reconocer que los conocimientos en cuanto a cultivos celulares eran muy básicos, trabajando siempre bajo la supervisión de personas con un mayor conocimiento, sin embargo, al momento de regirte por tu mismo y ayudarte con tu equipo, es posible aprender más a partir de errores, así como también por parte de la vasta investigación que se debe realizar

con el fin de darle seguimiento al proyecto y resolver problemáticas surgidas. Cabe recalcar que a su vez se comprendieron las distintas limitantes que se tienen en este campo, pudiendo así ahondar en las áreas de mejoras hasta poder ser experta en un tema que realmente me apasiona. Se puede establecer a partir de lo anterior que ahora cuento con las habilidades suficientes para llevar a cabo un proyecto y experimentación desde cero, pudiendo, finalmente, estandarizar los procesos de interés.

Tabla 12. Inventario de competencias- Judith Vázquez Hernández

	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.	Conocimientos	Características de las células madre y su potencial en medicina regenerativa	Materia de Cultivo de Células y Tejidos Animales en ITESO y materia de Células Madre y Diferenciación en Universidad de Namur.	Las aplicaciones de las células madre en medicina regenerativa me dan una certeza del alcance de dicha estrategia.	Tratamientos de regeneración de tejidos óseos
		Protocolos para la expansión de células madre mesenquimales en T-Flask	Materia de Cultivo de Células y Tejidos Animales en ITESO. Se aislaron células madre mesenquimales de tejido de placenta humana y se cultivaron en T-Flask exitosamente.	El fundamento del proceso de cultivo de las células madre es de suma importancia, sé que la expansión de los cultivos permite generar un banco de células interno y para no depender de	Protocolo para la expansión de células madre en sistemas 3D: Spinner Flask y en andamios

			proveedores externos.		
	Protocolo para la criopreservación de células madre mesenquimales	Materia de Cultivo de Células y Tejidos Animales en ITESO.	La criopreservación eficiente de las células madre permite contar con dichos recursos cuando el proyecto lo necesite de manera inmediata.		
	Proceso de diferenciación de células madre y estrategias de investigación	Materia de Células Madre y Diferenciación en Universidad de Namur.	El objetivo a largo plazo es la diferenciación de las células madre a osteocitos, y es importante que la etapa actual esté encaminada en esa misma línea.		
	Metodología para el uso de biorreactores	Materia de Biorreactores en ITESO. Se realizó un proyecto de cinética microbiana con toma de muestra para el análisis de metabolitos y	Los principios de la utilización del biorreactor, las variables que puede controlar y el seguimiento de la cinética	Protocolo de Spinner Flask para la expansión de células madre	Métodos para permitir la adaptación de las células madre, como aumentar poco a poco la concentración de SFB o la aclimatación de los

		densidad de biomasa.	de crecimientos microbianos me permite comprender rápidamente las singularidades y requerimientos de cada caso específico.		microportadores previo a su uso.
	Metodología para conteo celular con cámara de Neubauer y viabilidad.	Materia de Microbiología en ITESO. Se realizó una práctica de conteo celular y determinación de viabilidad por tinción.	La cantidad de células y su viabilidad son variables cuantitativas de suma importancia para el estudio de cultivos celulares.	Metodología para el conteo celular en contador Corning	Técnica eficiente para la preparar la muestra con azul de metileno y los tiempos máximos de duración del proceso para que la viabilidad no se vea afectada.
	Habilidades Planteamiento de diseño de experimentos eficiente	En el PAP de Biocontrol realizamos un diseño de experimentos con combinaciones de tres factores distintos, fue necesaria una planeación certera desde el inicio para que el rumbo del proyecto resultara exitoso.	El diseño del experimento define en gran medida el impacto que tendrá el proyecto, una buena planeación puede ahorrar tiempo, recursos y generar resultados relevantes.		

	Análisis crítico de resultados	Durante la carrera de Ing. En Biotecnología he realizado el análisis de resultados de cada práctica de laboratorio, requiriendo la evaluación de todos los factores que pueden afectar los resultados y llegando a conclusiones fundamentadas, aun cuando no son los esperados.	La planeación y realización del experimento conlleva un esfuerzo significativo por lo que el análisis eficiente de dichos resultados es necesario. Las conclusiones a las que llega el análisis determinan el rumbo de las decisiones posteriores.		Análisis de resultados cualitativos haciendo comparación con un control negativo relevante.
	Análisis de resultados utilizando herramientas estadísticas	Materia de Diseño de Experimentos en ITESO. En el PAP de Biocontrol utilicé StatGraphics para el análisis de los resultados cuantitativos, lo que le dio fortaleza a la investigación.	El uso de herramientas Estadísticas me permite definir las diferencias entre los tratamientos planteados en el diseño de experimentos, llevando así a conclusiones acertadas.	Comunicación de resultados complejos de una manera simple y acertada.	Mejoré mi capacidad de identificar posibles fuentes de variación en los resultados.
	Resolución de problemas de manera analítica	Durante diversos proyectos me he enfrentado a	Gestionar problemas o contratiempos	Estudio de los fundamentos de cada protocolo	

		circunstancias que no son las esperadas, en las que analizar cada parte y priorizar los factores permite solucionarlo más fácilmente y buscar alternativas creativamente.	de manera eficiente es una habilidad que se pone en práctica cada día, ser capaz de hacerlo analíticamente ahorra tiempo y recursos.	para ajustar los parámetros necesarios y que el experimento pueda seguir teniendo validez.	
	Investigación y elaboración de protocolos	En el PAP de Biocontrol fue necesaria la investigación de protocolos y de ajustarlos a nuestro contexto específico.	La investigación de metodologías es una habilidad importante en el ámbito científico, ya que cada año hay innovaciones que pueden optimizar los protocolos actuales.	Identificación de la factibilidad de soluciones revisadas en bibliografía tomando en cuenta los recursos disponibles.	Mejoré mi manera de buscar artículos relevantes utilizando palabras clave.
	Actitudes Iniciativa	Trabajé como becaria y yo sola tenía que plantear proyectos de mejora viables y aterrizados.	Las ideas nuevas y la creatividad son bastante valoradas, siempre hay aspectos que mejorar en los procesos.	Creatividad para la solución de problemas.	

	Comunicación asertiva	Fui capitana del equipo de atletismo de ITESO, al momento de resolver conflictos o de plantear ideas, el resultado está bastante afectado por la manera en la que se comunicaba.	Las relaciones humanas requieren de comunicación asertiva para el éxito de los objetivos compartidos.	Identificación de las habilidades propias y las de cada miembro del equipo para asignar actividades individuales.	
	Compromiso y perseverancia	Tanto en proyectos como en el ámbito deportivo, he sido comprometida a dedicarle tiempo de calidad para que los resultados lleguen hacia el objetivo	Para llegar a los objetivos planteados es necesario tener la voluntad, creerse capaz y hacer lo necesario para conseguirlos.		Mejoré la organización de mis actividades para tener un equilibrio en mis días.
	Cuestionamiento	En proyectos o procesos, me cuestiono y hago preguntas de manera constructiva para encontrar así puntos posibles de mejora, cuando encuentro vacíos suelo investigar maneras para reforzarlos o mejorarlos	Cuestionar la manera de trabajar abre las puertas a nuevas necesidades que satisfacer.	Escrupulosa en los detalles de los protocolos a seguir, planteamiento de posibles escenarios para prepararse.	

	Curiosidad y disposición de aprender	Durante trabajos en equipo he investigado por mi cuenta, escuchado y dialogado con mis compañeros y maestros, esto porque el intercambio de ideas nos permite construir un proyecto más fuerte e innovador, soy consciente de que no sé todo y siempre hay algo nuevo que aprender del otro.	La disposición de aprender cosas nuevas me lleva a estar atenta a las personas que me rodean y a las oportunidades que se me presentan.	Interés en experiencias e ideas de otras personas.	Confianza en mis conocimientos y capacidades.
--	--------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------	-----------------------------------------------

Al comparar las competencias que tenía antes del PAP y las que cuento ahora que ya se cerró el proyecto me doy cuenta de todas los conocimientos, habilidades y actitudes que aprendí o potencialicé. Es muy enriquecedor tener presente el crecimiento que tuve en tan sólo cuatro meses. En cuando a conocimientos, adquirí nueva información debido a la investigación que realizamos para la elaboración del protocolo y también al estudiar los protocolos ya estandarizados con anterioridad. Creo que las competencias adquiridas fueron lo que más valoré de el presente ejercicio, ya que ahora soy capaz de implementar mejoras factibles a un proyecto y aterrizarlas en experimentación; la capacidad de respuesta frente a contratiempos es de gran valor. Las actitudes de compromiso, comunicación, asertividad, iniciativa y apertura son de muy valiosas para mi futura carrera profesional.