



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO



INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA.

Nombre del alumno y prestador del servicio: Ariadna Ximena Palacios Bautista

Matrícula: 2192036394

Correo: 2192036394@alumnos.xoc.uam.mx

Institución: Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”

Proyecto: EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO DE FUCOXANTINAS, FUCOIDANO y TOCOTRIENOLES DE PALMA EN RATONES CON CÉLULAS GIGANTES DE CÁNCER DE HUESO”

Asesor externo: Laura Sánchez Chapul

Asesor interno: Patricia Martínez Cruz

Fecha de inicio: 17 de julio del 2023

Fecha de término: 17 de enero del 2024

Calzada. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX.

08 de marzo del 2024

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL.

**ACTIVIDADES EN APOYO PARA EL
DESARROLLO DEL PROYECTO DE
“EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO
DE FUCOXANTINAS, FUCOIDANO y
TOCOTRIENOS DE PALMA EN
RATONES CON CÉLULAS GIGANTES DE
CÁNCER DE HUESO”**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.	4
OBJETIVO GENERAL.	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	5
ACTIVIDADES REALIZADAS.	1
METAS ALCANZADAS.	37
RESULTADOS.	37
CONCLUSIÓN.	45
REFERENCIAS.....	45
ANEXOS	47

INTRODUCCIÓN.

Dentro de los tratamientos comúnmente empleados contra el cáncer se encuentran las cirugías, radioterapia y la quimioterapia, esta última como sabemos se dirige a las células que se dividen y proliferan rápidamente, por lo tanto, también se ven afectadas las células normales que tienen un alto potencial de proliferación. Actualmente los nuevos agentes terapéuticos están diseñados para atacar a células específicas, denominada terapia dirigida, sin embargo este tipo de terapias tampoco están exentos de efectos secundarios, debido a esto, la preocupación sobre la toxicidad, la resistencia de las células tumorales y desarrollo de cáncer secundarios a partir de esto se ha generado el interés de explotar productos naturales para tratamiento del cáncer, tal es el caso de los tocotrienoles de palma, el fucoidano y la fucoxantina.

La fucoxantina es un carotenoide perteneciente a la familia de las xantofilas que es producido por organismos marinos como las macroalgas del género *Fucus* y microalgas como *Phaeodactylum tricornutum*, esta ha demostrado tener algunos beneficios como fitonutrientes, efectos antiinflamatorios, antidiabéticos, antiobesidad y anticancerígenos. Por otra parte, la vitamina E es un antioxidante liposoluble que comprende dos clases principales, los tocoferoles y los tocotrienoles. Los tocotrienoles provienen del aceite de palma, debido a que esta es una fuente rica de ellos, se han demostrado que estos son particularmente eficaces en la quimioprevención y el tratamiento de los cánceres de mama, colorrectal, páncreas, próstata e hígado. Por último, el fucoidano es un tipo de polisacárido que proviene de algas pardas, este ha demostrado una amplia gama de actividades biológicas como antiinflamatorios, anticancerígenos, antivirales, antioxidantes, anticoagulantes, antitrombóticos, antiangiogénicos.

Como se puede destacar uno de sus efectos biológicos de estas moléculas es que pueden actuar como anticancerígenos, y aunque ya se ha estudiado su efecto en diferentes tipos de cáncer, la propuesta de este proyecto va dirigido a evaluar su efecto anticancerígeno en el cáncer de hueso.

El cáncer de hueso, representan menos del 1% de los cánceres diagnosticados cada año y se asocian con una morbilidad y mortalidad significativas. El diagnóstico oportuno es un desafío, debido a la presentación tardía del paciente, los síntomas inespecíficos que imitan las lesiones musculoesqueléticas comunes y la baja sospecha por parte de los médicos.

Debido a querer buscar nuevas alternativas para tratamiento contra cáncer este proyecto tiene el objetivo principal de evaluar el efecto biológico de fucoxantinas, fucoidano y tocotrienoles de palma en ratones con células gigantes de cáncer de

hueso. La determinación de las moléculas evaluadas, se realizará mediante pruebas de citotoxicidad.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto biológico del fucoidano, fucoxantina y los tocotrienoles de palma, en la línea celular de células gigantes de cáncer de hueso (TIB-223 ATCC), y en ratones atímicos Balb-C Nu Nu con xenotransplantes de células TIB-223 ATCC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Desarrollar y conocer el fundamento de técnicas de cultivo celular, PCR en tiempo real y Western Blot
2. Identificar y analizar por Western Blot, la cadena pesada de miosina (MHC) del músculo esquelético de ratones atímicos Balb-C Nu Nu, para evaluar el efecto de los suplementos en el musculo esquelético.
3. Evaluar el efecto citotóxico de los tocotrienosles de palma en cultivo celular de células TIB-223.
4. Determinar si los tratamientos presentan un efecto citotóxico para las células, amplificando los genes implicados en el proceso de apoptosis en células gigantes de cáncer de hueso (TIB-223 ATCC), y de ratones atímicos Balb-C Nu Nu con xenotransplantes de células TIB-223 ATCC.

ACTIVIDADES REALIZADAS.

Durante las dos primeras semanas de mi estancia en el laboratorio de enfermedades neuromusculares, realicé actividades de capacitación como el manejo correcto de la micropipeta, empleo de autoclave, la distribución y el manejo adecuado de los diferentes equipos en el laboratorio.

Para cumplir con los objetivos planteados, se realizaron las actividades que se describen a continuación:

1. Preparación de medios de crecimiento.
2. Congelación de células TIB-223-ATCC.
3. Descongelación y expansión de células TIB-223-ATCC.
4. Siembra de células TIB-223-ATCC.

5. Western blot.
6. Ensayo de citotoxicidad.

1.- PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CRECIMIENTO.

Las células necesitan estar en un ambiente adecuado con factores que favorecen su proliferación, debido a esto fue necesario preparar medio de crecimiento, mismo que fue empleado durante todas las actividades del servicio social. El procedimiento se describe a continuación.

Reactivos/ Materiales

- Suero fetal bovino (SFB)
- Antibiótico Antimicótico (A/A).
- Medio McCoy 5A modificado
- Tubos de 50 ml

Procedimiento

Para preparar un volumen de 50 ml se agregó el 10% (5 ml) de SFB, 1% (0.5 ml) de A/A y lo que restó de medio McCoy para llegar al volumen final. Esto se realizó en completa esterilidad, trabajando en la campana de flujo laminar. Una vez que se agregaron todos los reactivos se procedió a homogenizar y se mantuvo a 4 °C.

El SFB es importante ya que ayuda a mantener el crecimiento celular y satisfacer los requisitos metabólicos. El medio A/A (contiene Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B), ayuda a evitar la contaminación por hongos o levaduras en las líneas celulares.

NOTA. Esto se visualiza de una manera más descriptiva en el diagrama 1 en la parte de anexos.

2.- CONGELACIÓN DE CÉLULAS TIB-223-ATCC.

Cuando se observaba (en el microscopio) en las botellas de cultivo que el medio de crecimiento se encontraba saturado de células TIB-223-ATCC era necesario realizar este procedimiento, esto para conservar células para posteriores experimentos. Este procedimiento se describe a continuación.

Reactivos/ Materiales

- Células TIB-223-ATCC
- SFB
- DMSO (Dimetilsulfóxido)
- Tripsina-EDTA
- Criotubos
- Tubos falcón de 15 ml
- Medio de crecimiento Medio McCoy 5A modificado
- PBS (buffer fosfato salino)

Procedimiento

Se decantó el medio de crecimiento de la botella de cultivo, después se realizaron lavados con PBS para eliminar el medio de crecimiento, para que la tripsina realice su función. Cabe destacar que se realizaban tres lavados con 2 mL para T75 (botellas de cultivo de un vol. 60 ml) y con 1 mL para T25 (botella de cultivos de un vol. de 10ml).

Después de los lavados, se agregó la tripsina-EDTA aproximadamente de 2 a 3 mL para T75 y 1 mL para T25, se dejó incubando durante 5 minutos a 37°C. La tripsina-EDTA es una enzima que permite que las células en monocapa se desprendan de la superficie de la botella de cultivo, formando así una suspensión celular. Una vez transcurridos los 5 minutos de incubación, se corrobora que las células se hubieran desprendido correctamente, esto se realizó visualizando en el microscopio, donde se observó las células desprendidas de las botellas de cultivo; después se inactivo la tripsina con medio de crecimiento McCoy (debido a que la tripsina es toxica para las células), siendo el SFB el que ejerce esa acción. Posteriormente se llevó a centrifugar a 1500 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante sin perder el pellet. Finalmente se agregó al pellet de células el 10% de DMSO y SFB hasta completar un volumen de 1ml; se llevó a criotubos y se etiqueto correctamente colocando la fecha, el pase, la línea celular y se congelo a -70°C.

Es importante mencionar que la cantidad de criotubos con células que podemos llevar a almacenar a -70°C depende del tamaño del pellet que se forme después de finalizar la centrifugación.

NOTA. Esto se visualiza de una manera más descriptiva en el diagrama 2 en la parte de anexos.

3.- DESCONGELACIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS TIB-223-ATCC.

Cuando se iniciaba un nuevo experimento o la repetición de uno y las células TIB-223-ATCC no eran las suficientes procedíamos a realizar este procedimiento. Este procedimiento se describe a continuación.

Reactivos

- Células TIB-223-ATCC congeladas
- Medio de crecimiento Medio McCoy 5A modificado
- Botellas o placas de cultivo
- Tubos falcón de 15 ml

Procedimiento

Como primer paso se procedió a descongelar un vial de células TIB-223-ATCC, esto de la siguiente manera: se agregó 500 µl de medio de crecimiento y con ayuda de la micropipeta se homogenizo para que el pellet se descongelara completamente. Una vez que se descongelaba, se colocaba la suspensión celular en un tubo de 15 ml con medio y se llevaba a centrifugar durante 10 min a 1500 rpm, esto se realizó para retirar el DMSO ya que es toxico para las células. Posterior a esto se eliminó el sobrenadante y se recuperó el pellet de células.

Mientras las células se centrifugaban, se agregó el medio de crecimiento a las botellas de cultivo (las botellas T75 se les agrega aproximadamente 10 mL y a las T25 5 mL del medio de cultivo) y se metieron a incubar a 37°C, esto para que el medio este en la temperatura adecuada y sea más fácil para las células en adaptase.

Una vez que finalizo la centrifugación, el sobrenadante se eliminó y las células del pellet se resuspendieron con golpes leves, agregando 1 ml de medio de crecimiento y homogenizando con la micropipeta, finalmente esto se agregó en las botellas con medio de cultivo previamente preparadas y se incubaron a 37°C. Es importante mencionar que antes de meterlas a la incubadora se recomienda dar unos golpes leves a botellas para que se distribuyan adecuadamente las células en las botellas.

NOTA. Esto se visualiza de una manera más descriptiva en el diagrama 3 en la parte de anexos.

4.- SIEMBRA DE CÉLULAS TIB-223-ATCC.

Para algunos experimentos que realice fue necesario evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad, en los cuales fue indispensable tener un número de células en específico para llevar un seguimiento claro de los resultados al aplicar algún tratamiento, debido a esto se realizó este procedimiento, el cual se describe a continuación.






Reactivos

- Células TIB-223-ATCC expandidas
- Medio de crecimiento Medio McCoy 5A modificado
- Tripsina-EDTA
- Azul tripano
- PBS (buffer fosfato salino)
- Cámara de Neubauer
- Placas o botellas de cultivo.

Procedimiento

Antes de iniciar siempre es impórtate elegir el material de cultivo en el cual se sembraría, usualmente en empleaba botellas o placas. Cada uno de los materiales de cultivo que se emplearon para sembrar tienen una capacidad máxima de células, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1. Materiales para cultivo celular y su descripción.

	T25	T75	6 pozos	12 pozos	24 pozos
Descripción					
Células (100%)	2.5×10^6	7.5×10^6	9.5×10^5	3.8×10^5	1.9×10^5
Vol. mL	5 – 7.5	15 – 22.5	1.9 – 2.9	0.760 -1.14	0.380 – 0.570

Una vez que se determinaba el material de cultivo donde se sembraría y la cantidad de células que colocarían en cada una de ellas, se calculó la cantidad total de células necesarias para el experimento, con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células} = \frac{(Nct)(\% \text{ de cn})}{100\%}$$

- **Nct:** Número de células totales que le caben a una botella o placa de cultivo.
- **% de cn:** porcentaje de células que necesito en cada caja o botella de cultivo para el experimento.

Es importante mencionar que se contemplaban la cantidad total de placas o botellas que se empleaban para considerar el número total de células necesarias en el experimento.

Antes de iniciar se revisaba en el microscopio que tuviéramos la confluencia de células necesarias para el experimento; posteriormente se retiró el medio y lavamos (3 lavados con 2 mL para T75 y con 1 mL para T25) con PBS para eliminar todo el medio posible.

Una vez que se realizaron los lavados se agregó la tripsina-EDTA y se dejó incubando durante 5 minutos a 37°C. Una vez transcurridos los 5 minutos de incubación, se corroboró que las células se hayan desprendido correctamente observando al microscopio, posteriormente se inactivo la tripsina con medio de crecimiento que contiene SFB y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min, después se decantó el medio, sin perder el pellet. Finalmente se agregó 1 ml de medio de crecimiento y se homogenizó correctamente hasta deshacer el pellet y el volumen se completó con 1 mililitro de medio de crecimiento. Es importante mencionar que el volumen final de la suspensión dependerá del tamaño del pellet, este se puede modificar cuando las células se contabilicen.

Después de que obtuvimos la suspensión celular, las células se contabilizaron en la cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer posee dos superficies reticuladas (retículos) para el conteo de las células y dos columnas laterales que poseen una altura de 0.1 mm por encima del retículo, esta posee una subdivisión de nueve cuadrantes, de los cuales solo resultan de utilidad los cuatro laterales (sirven para el conteo de leucocitos) y el central.

Para contabilizar las células en la cámara de Neubauer se hizo una mezcla con 10 µl de la suspensión celular más 10µl de azul de tripano (que ayuda a identificar células viables de las no viables), esta se homogenizó bien antes de colocarlo en la cámara. Es importante que antes de tomar los 10 µl de la suspensión celular se debe de homogenizar muy bien para tomar una alícuota representativa, esto para tener resultados más confiables.

Una vez que se llenaron las cámaras se procedió a contabilizar las células viables en el microscopio, esta se visualizará de la siguiente manera.

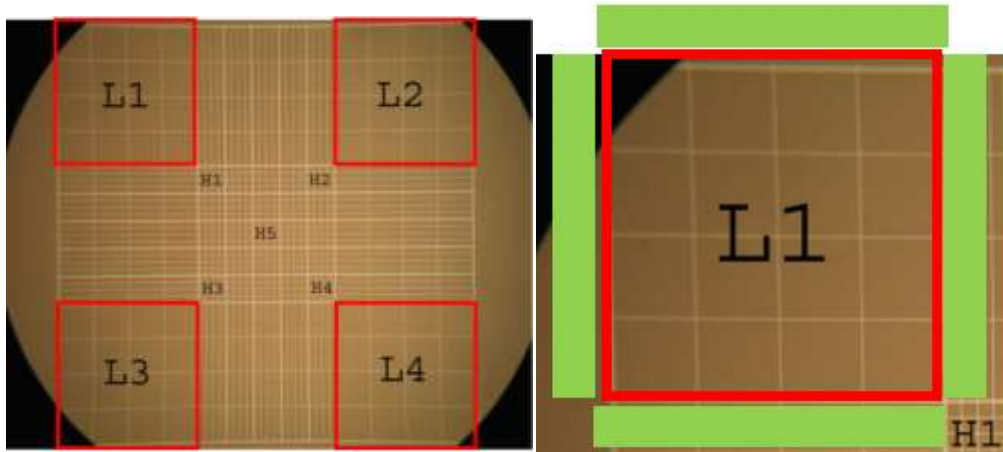


Figura 1. Diagrama para contabilizar en la Cámara de Neubauer (Imagen modificada de Gómez A. 2019)

Solo se contabilizaron los cuadrantes de color rojo (fig.1), si las células llegan a salir o estar en los espacios verdes (fig.1), estas no se contarán, también es importante mencionar que las células que se teñían de color azul se descartaron, debido a que no son células viables (son células muertas).

Una vez que se contabilizaron las células en la cámara se realizó los cálculos siguientes:

1. Se calculó el promedio de los cuatro cuadrantes de cada una de las cámaras.
2. Se calculó el promedio de los promedios de las dos cámaras.
3. Se aplicó la siguiente formula.

$$TC = (\text{Promedio de las células})(2)(\text{vol. de la suspensión celular})(10000)$$

Una vez obtenido el total de células (TC) se realizó un cálculo que nos fue de utilidad para determinar el volumen que sería necesario tomar de la suspensión celular para preparar una nueva suspensión celular con las células necesarias para sembrar en placas o botellas del experimento, esto se realizó como se describe a continuación.

1. Fue necesario saber el volumen que tendríamos que tomar para tener las células que necesitamos.

$$\text{vol. para la nueva suspensión} = \frac{(\text{células necesarias})(\text{vol. suspensión celular})}{\text{Numero de células total}}$$

2. Se calculó el volumen total de la nueva suspensión, se consideró que a cada placa o botella se le agregó 1 ml.

$$\text{Vol. necesario} = (\text{numero de placas o botellas})(1\text{ml})$$

3. Se restaron los ml de la nueva suspensión celular al volumen necesario

Medio de crecimiento necesario = vol.necesario – vol.de la nueva suspensión

Una vez que se preparó la suspensión con el número de células necesarias para el experimento, se procedió a llenar con medio de crecimiento el número de botellas o placas, es importante mencionar que se tuvo en cuenta el ml que se agregó con células para no excederse del volumen de la placa o botellas. Finalmente se agregó el ml de la suspensión celular que contiene el número de células que se ocuparon para el experimento, esta se colocó de forma de estriado y se homogenizó bien con la micropipeta para que proliferaran correctamente y se incubaron a 37 °C.

NOTA. Esto se visualiza de una manera más descriptiva en el diagrama 4 en la parte de anexos.

5.- WESTERN BLOT

Esta técnica se utilizó para la identificación de la cadena pesada de miosina (MHC) en músculo esquelético de ratones atímicos Balb-C Nu-Nu con xenotransplantes de células gigantes de cáncer de hueso, se les administró de manera oral tres tratamientos cada día durante dos semanas como se visualiza en la tabla.

Tabla 2. Tratamientos administrados a los ratones atímicos Balb-C Nu-Nu.

SUJETO	COLOR	TRATAMIENTO
1	Azul	Control
2	Azul	Control
3	Rojo	2.1
4	Azul	Control
5	Rojo	2.1
6	Rojo	2.1
7	Rojo	2.1
8	Rojo	2.1
9	Verde	4.0
10	Verde	4.0
11	Verde	4.0
12	Verde	4.0
13	Amarillo	10.0
14	Amarillo	10.0
15	Amarillo	10.0
16	Amarillo	10.0

- **Azul** – Control se les administró un vehículo (ciclodextrina)
- **Rojo** - 2.1 Antocianinas, xantofilas y polifenoles de manzana.
- **Verde** – 4.0 Fucoxantina
- **Amarillo** – 10.0 Fucoidano y tocotrienoles de palma

El western blot lo conforman diferentes procedimientos para poder lograr el objetivo de la técnica, los cuales son: obtención del tejido (músculo), extracción y cuantificación de proteínas, evaluación de la integridad de las proteínas por electroforesis, para su posterior transferencia a papel de nitrocelulosa e identificación con anticuerpos.

1. Obtención de tejido: corte del músculo esquelético

Para la extracción de las proteínas del músculo esquelético de los ratones fue necesario realizar cortes que nos permitieron solo tomar una muestra representativa de todo el músculo y así reservar el resto del músculo para posteriores experimentos. Los cortes se hicieron en frío para no perder la integridad de las proteínas. El equipo empleado para realizar estos cortes fue un criostato; este equipo es empleado en el procesamiento de muestras para diagnóstico o identificación histológica o histopatológica, se utiliza principalmente para obtener cortes de tejido congelado. A continuación, se describe el procedimiento que se llevó a cabo para realizar los cortes.

Reactivos / Materiales

- Corcho
- Navaja
- Cúter
- Marcador
- Tubos eppendorf con 100 µl de buffer de RIPA
- Muestras de músculo
- Pegamento para fijar músculo

Procedimiento

Se ajustó a la temperatura y el tamaño del corte del criostato adecuado para trabajar, en este caso la temperatura fue a -20°C y el tamaño del corte a 10 micras. Mientras el equipo llegó a la temperatura adecuada, se procedió a fijar los músculos en los corchos, se colocó un poco de pegamento en el corcho y encima de este el músculo, esto se repitió con todas las muestras. Una vez que el equipo llegó a la temperatura adecuada, en la platina se colocó el corcho con el músculo y se comenzaron a realizar los cortes, se hicieron un aproximado de 50 a 80 cortes de cada músculo. Finalmente, los cortes se colocaron en los tubos eppendorf con 100 µl de buffer RIPA y se almacenaron a -20°C.

2. Extracción de proteínas

Una vez que se obtuvieron los cortes de las muestras, se procedió a realizar la extracción de proteínas. Este procedimiento se puede realizar empleando; detergentes, ultrasonidos, digestión enzimática, métodos mecánicos, congelación y descongelación entre otras. En este caso para la extracción de proteínas empleamos un detergente denominado RIPA en el cual, los cortes fueron depositados y se almacenaron a -20°C . El buffer RIPA es un reactivo capaz de lisar tejidos o células y extraer proteínas, el cual contiene las siguientes soluciones; PMSF en DMSO, ortovanadato de sodio en agua y un coctel de inhibidor de proteasas, sin embargo, para la extracción de proteínas de los músculos esqueléticos de los ratones, también se empleó el ultrasonicador para poder romper el tejido y extraer la gran mayoría de proteínas, esto se realizó como se describe a continuación.

Reactivos / Materiales

- Muestras congeladas con buffer RIPA
- Centrifuga
- Buffer RIPA
- Etanol al 70%
- Gasas
- Agua destilada o inyectable
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Ultrasonicador
- Shaker

Procedimiento

Antes de comenzar se descongelaron las muestras (cortes del musculo con buffer RIPA) que se dejaron almacenadas a -20°C , después de que se descongelaron se les agrego 100 μl más de buffer RIPA y se colocaron en el refrigerador a 4°C mientras se preparó el equipo. Como primer paso se prepararon tubos con agua destilada y etanol al 70%, estos se emplearon para enjuagar el equipo entre cada muestra; una vez que estuvieron listos los tubos, se prendió el equipo y se limpió con agua y etanol la parte que se introdujo al tubo de la muestra y se secó con una gasa, posteriormente se colocó la muestra en el ultrasonicador por 10 segundos, esto se repitió por triplicado para cada una de las muestras. Una vez que finalizamos con las muestras, el equipo se limpió con agua y etanol. Es importante recordar que las muestras siempre estén en refrigeración (-4°C) ya que la proteína se puede degradar.

Finalmente se colocaron las muestras en agitación constante durante 30 minutos a 4°C. Una vez finalizado el tiempo de agitación se llevaron a centrifugar a 15000 rpm a 4°C durante 20 minutos.

Una vez que finalizó el tiempo de centrifugación se extrajo el sobrenadante de cada una de las muestras y se colocó en un nuevo tubo, esto se realizara con cada una de las muestras y se almacenaran a -20°C. Algunas notas importantes para recordar de este paso son las siguientes.

NOTAS:

- Etiquetar correctamente cada una de las muestras.
- Tratar de no llevarnos pellet (ahí se encuentra restos del tejido que no son de nuestro interés).
- Si el pellet no se visualiza, usualmente está del lado de la pestaña del tubo.
- Cambiar la puntilla en cada una de las muestras.
- Realizarlo lo más rápido posibles para evitar la degradación de las proteínas.
- El pellet no es necesario conservarlo

3. Cuantificación de proteínas

Una vez que se realizó la extracción de proteínas del músculo, no sabemos exactamente la cantidad de proteínas que tenemos, por lo cual, el siguiente paso fue cuantificarlas. La cuantificación de las proteínas es importante para realizar la electroforesis que es el siguiente paso del western blot; la cuantificación me sirve para determinar el volumen que necesitaremos para la electroforesis para tener la misma cantidad de proteínas.

Existen diferentes métodos que nos permiten la cuantificación de proteínas, como lo son: ensayo de Lowry, ensayo de bicinoninico, ensayo de Bradford, entre otros. Para este experimento empleamos el ensayo de Bradford, este es un ensayo colorimétrico, que con el cambio de color nos permite determinar la presencia de proteínas en una muestra, sin embargo, para tener un resultado cuantitativo es necesario realizar una curva estándar que nos permitirá a partir de una interpolación con las absorbancias (ABS) conocer la concentración de proteínas de una muestra.

Antes de comenzar fue importante realizar alícuotas del sobrenadante que obtuvimos, esto para evitar contaminación en toda la muestra o que se nos puedan degradar todas las proteínas. A continuación, se describen los materiales/reactivos y procedimiento.

Reactivos / Materiales

- Muestras congeladas con buffer RIPA

- Agua inyectable
- Placa de 96 pozos
- Reactivo de Bradford
- Tubos
- Refrigerantes

Procedimiento

Se obtuvieron alícuotas de 40 µl de cada uno de los sobrenadantes de las muestras, posteriormente se realizaron diluciones 1:20 con agua inyectable, se colocó primero los 19 µl de agua inyectable en los 16 tubos y por último el microlitro de las muestras en cada uno de los tubos, esto debido a que los volúmenes de las muestras son más pequeños y finalmente se almacenaron a 4 °C.

Una vez que se obtuvieron las diluciones de las muestras, se realizó la curva estándar con BSA (Albúmina bovina) para determinar la concentración de las muestras en relación con su ABS.

Para la curva estándar se preparó un stock de 2 mg/ml a partir de una solución de BSA con una concentración de 40 mg/ml. Los cálculos que se realizaron se muestran a continuación.

Cálculos:

C1 – 40 mg/ml

$$C1V1 = C2V2$$

$$V1 = (C2)(V2)/(C1)$$

V1 – ?

C2 – 2 mg/ml

$$V1 = \frac{\left(2 \frac{mg}{ml}\right)(1 ml)}{40 \frac{mg}{ml}} = 0.05 ml = 50 \mu l$$

V2 – 1 ml

El stock de BSA [2 mg/ml] con un volumen de 1 ml se preparó con 950 µl de agua inyectable + 50 µl de BSA [40 mg/ml].

Una vez que se obtuvo el stock se procedió a realizar la curva estándar como se muestra en la siguiente tabla 3.

Tabla 3. Curva estándar de BSA

# TUBO	VOLUMEN DEL ESTANDAR	FUENTE DE ESTANDAR	VOLUMEN DEL DILUYENTE	CONCENTRACIÓN FINAL DEL TUBO
2	30 µl	Stock [2 mg/ml]	10 µl	[1500 µg/ml]
3	20 µl	Stock [2 mg/ml]	20 µl	[1000 µg/ml]
4	20 µl	Tubo 2	20 µl	[750 µg/ml]
5	20 µl	Tubo 3	20 µl	[500 µg/ml]
6	20 µl	Tubo 5	20 µl	[250 µg/ml]
7	20 µl	Tubo 6	20 µl	[125 µg/ml]
BLANCO				

Una vez finalizada la curva estándar se cuantificó la cantidad de proteína (BSA) de la curva y de las muestras mediante el ensayo de Bradford. En una placa de 96 pozos se colocó la curva estándar por triplicado y cada una de las muestras por duplicado como se muestra en la siguiente figura.



Figura 2. Distribución de la curva estándar de BSA y las muestras.

Una vez que las muestras se colocaron en la microplaca, se procedió a agregar 250 µl de reactivo de Bradford a cada uno de los pozos, se homogenizó cada pozo con la micropipeta. Se procederá a incubar a temperatura ambiente con agitación constante durante 5 minutos. Después del tiempo de incubación se procede a realizar la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 595 nm.

Al finalizar la lectura el equipo nos arrojó una serie de resultados (absorbancias) que nos permitieron junto con la ecuación de la línea recta, determinar las concentraciones. A continuación, se ejemplifica con las ABS de uno de los controles como se obtuvieron las concentraciones.

Control 1 – Pocillo A4 – 0.623 Pocillo A5 – 0.65

1. Se calculó el promedio de las dos lecturas

$$\text{Promedio} = \frac{0.623+0.65}{2} = 0.6365$$

2. Se realizó el despeje de la ecuación de la recta.

$$ABS = (A)(\text{concentración}) + B \quad \text{concentración} = \frac{ABS - B}{A}$$

3. Se sustituyeron los valores en la ecuación

Datos:

A= 0.000489 B= -0.00948

$$\text{Concentración} = \frac{0.6365 - (-0.00948)}{0.000489} = 1301.6455 \mu\text{g/ml}$$

4. Se multiplica por el factor de dilución.

$$(1301.6455 \mu\text{g/ml}) (20) = 26032.9094 \mu\text{g/ml.}$$

Este procedimiento se repitió para las 16 muestras que se tenían.

4. Evaluación de la integridad de las proteínas

Una vez que se obtuvieron las concentraciones de las proteínas de cada una de las muestras, se procedió a realizar una evaluación de la integridad de estas. Esta evaluación nos permitió verificar si los cálculos de la cuantificación se realizaron de manera correcta y si las proteínas aún no han comenzado a degradar debido a la manipulación en cada procedimiento.

La evaluación de la integridad de las proteínas se realizó mediante la electroforesis. El fundamento de este procedimiento se basa en que mediante la carga eléctrica que ejerce el equipo, las proteínas migrarán de un polo negativo a uno positivo, permitiendo la separación de proteínas dependiendo de su peso molecular. Para esta técnica se realizaron los siguientes procedimientos:

- La preparación de las muestras con el buffer de carga.
- Preparación de los geles.
- Preparación del buffer de corrida.
- La electroforesis.

A continuación, se describen los materiales/reactivos y procedimiento que se emplearon para realizar el proceso.

Reactivos/Materiales

- Extracto de proteínas de músculo de ratón
- Tubos eppendorf
- Buffer de carga
- Tubos falcón de 15 ml
- Agua inyectable
- 30 % acrilamida/bis desgasificada
- Gel buffer resolving
- Gel buffer stacking
- SDS (dodecilsulfato sódico)
- Materiales para montar los geles
- Cámara de electroforesis
- Tris/Glycine/SDS10x
- Fuente de poder

Procedimiento

Como primer paso se realizó la preparación de los geles. Las muestras se colocan en los geles para que puedan migrar de un polo a otro, separándolas dependiendo de su peso molecular. Las proteínas son separadas debido a que en el gel se forman unas especies de redes (gracias a sus componentes) donde las proteínas más pequeñas les resultara fácilmente pasar mientras que a las más grandes se les dificultara.

El gel está compuesto por dos geles, el resolving y el stacking. El stacking es el gel donde se depositan las muestras y el resolving donde las proteínas correrán y se separarán dependiendo de su peso molecular.

Como primer paso se armó la base para preparar los geles, se colocaron los vidrios de 0.1 mm y se acomodaron en la base ajustándolos para evitar que la solución que se agregó se derrame. Una vez listos se procedió a preparar el gel resolving al 9% de acrilamida; éste porcentaje hace referencia a la cantidad de acrilamida que se agregara, ente mayor sea el porcentaje, las proteínas de bajo peso molecular podrán separarse mejor. En un tubo de 15 ml se colocó lo que se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Reactivos para la preparación del gel resolving.

REACTIVOS	CANTIDAD	USO
Primeros reactivos		
Agua destilado o inyectable	4.4 ml	-
30 % acrilamida/bis desgasificada	3	se emplea para crear la matriz del gel

gel buffer resolving	2.5	regula el pH del gel
SDS	0.1	imparte la carga negativa a las proteínas
Segundos reactivos		
APS	50 µl	inicia la reacción de polimerización
TEMED	5 µl	acelera la reacción de la polimerización de la acrilamida

Una vez que se agregaron todos los reactivos se corroboró que el volumen final fuera de 10 ml y se homogenizó. Finalmente se agregó la segunda parte de los reactivos, se homogenizó y se depositó en la base de vidrio, la cual ya se había preparado previamente, esta solución solo se agregó hasta la marca como se visualiza en la figura 3, finalmente se dejó de 15 a 30 minutos para que polimerizara.

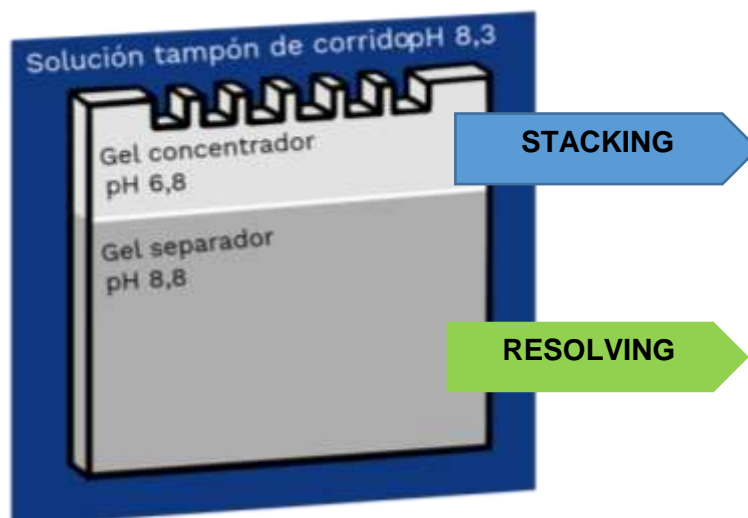


Figura 3. Gel para electroforesis (imagen modificada de Maldonado. M, & Jorrín J. 2016)

Una vez que polimerizó la parte del resolving se procedió a preparar la parte de stacking al 4%, agregando los reactivos que se visualiza en la tabla 5.

Tabla 5. Reactivos para la preparación del gel stacking.

REACTIVOS	CANTIDAD	USO
Primeros reactivos		
Agua destilado o inyectable	6.1 ml	-
30 % acrilamida/bis desgasificada	1.3	se emplea para crear la matriz del gel
gel buffer resolving	2.5	regula el pH del gel
SDS	0.1	imparte la carga negativa a las proteínas

Segundos reactivos		
APS	50 µl	inicia la reacción de polimerización
TEMED	10 µl	acelera la reacción de la polimerización de la acrilamida

Se corroboró el volumen (10 ml) y se llevó a homogenizar. Finalmente se colocó los segundos reactivos y se llevó a homogenizar. Se retiró el metanol que se había agregado y se colocó la solución del stacking hasta que se desborde para evitar la formación de burbujas y finalmente se colocó el peine de 0.1 mm, se dejó de 15 a 30 min para que polimerizara. Es importante mencionar que se agregaron las soluciones de ambos geles lo más rápido posible, ya que al agregar el APS y el TEMED la reacción de polimerización comienza de inmediato.

Posteriormente se prepararon alícuotas de las muestras con el buffer de carga, se eligieron diez muestras aleatoriamente para este experimento, las cuales fueron las siguientes:

Control 1	Muestra 6 – 2.1
Control 2	Muestra 9 – 4.0
Muestra 3 – 2.1	Muestra 10 – 4.0
Control 4	Muestra 13 – 10.0
Muestra 5 – 2.1	Muestra 14 – 10.0

Antes de iniciar la preparación de las muestras con el buffer de carga, se realizaron cálculos que nos permitieron saber la cantidad (µl) que se tomaría de cada muestra y la cantidad del buffer de carga que se colocó. A continuación, se describe los cálculos que se realizaron ejemplificado con el control 1.

Concentración del control 1 - 26420.4499 µg/ml.

Para cada muestra se requirió 60 µg de proteína.

1. Se realizó una relación para determinar el volumen requerido para tener la cantidad de proteína necesaria.

$$1 \text{ ml} \text{ ----- } 26420.4499 \text{ µg} \quad \frac{(60 \text{ µg})(1\text{ml})}{26420.4499 \text{ µg}} = \mathbf{0.002271 \text{ ml}}$$

$$? \text{ ----- } 60 \text{ µg}$$

2. Los mililitros obtenidos se pasaron a microlitros.

$$(0.002271 \text{ ml}) (1000) = \mathbf{2.2710 \text{ µl}}$$

3. Se calculó la cantidad de buffer de carga que se agregó para la muestra.

$$(2.2710 \mu\text{l}) / 3 = \mathbf{0.7570 \mu\text{l}}$$

Para el control 1 se agregó 2.2710 μl de la muestra + 0.7570 μl de buffer de carga para un volumen total de 3.028 μl .

Es importante agregar el buffer de carga, ya que debido a sus componentes permiten que las proteínas puedan migrar y visualizar cuando termine la corrida de estas. El buffer contiene; Tris HCl (encargado de regular el pH 8.3), SDS (desnaturaliza a la proteína y proporciona la carga negativa), β -mercapto (ruptura de los puentes de disulfuro), glicerol (proporciona densidad) y azul de bromofenol (ayuda a visualizar la corrida de las proteínas).

Una vez que se tuvieron los cálculos se prepararon las alícuotas agregando primero el volumen de la muestra y por último el volumen del buffer.

Las muestras se colocaron durante 2 minutos en agua hirviendo (esto se emplea para provocar la desnaturalización de la proteína) y se procedió a preparar el buffer de corrida, este buffer proporciona el medio para la transmisión de la corriente eléctrica y mantiene el pH sin variaciones mientras se realiza la corrida de las proteínas. Se preparó un volumen de un litro, se agregó el 10% (100 ml) de tris/Glycine/SDS10x en una probeta y el volumen se completó con agua destilada, se homogenizó y se reservó.

Se procedió a montar la cámara para electroforesis, se colocó primero los geles y se agregó el buffer de corrida en la cámara, una vez que esto estuvo listo se retiraron los peines de los geles y se colocaron las muestras en los pozos con ayuda de una micropipeta, una vez que se cargaron todas las muestras se colocó la tapa de la cámara y se conectó a la fuente de poder, se corrió a 90 v por dos horas y las muestras empezaron a migrar como se visualiza en la figura 4.



Figura 4. Electroforesis de las proteínas

Una vez que termino la corrida, el equipo se apagó y se desmonto el gel, se pasó a un recipiente y se le agrego azul de comassie (colorante que nos permitirá visualizar las proteínas en el gel) cubriendo todo el gel, se dejó en constante movimiento durante 20 minutos, al finalizar los 20 minutos se realizaron lavados con agua para retirar la mayor parte del colorante del gel.

5. Electroforesis

Una vez que se evaluó la integridad de las proteínas, se realizó nuevamente la electroforesis, esta vez colocando las dieciséis muestras, el procedimiento se realizó exactamente como se describió en la parte de integridad de las proteínas con las siguientes condiciones:

1. Se prepararon dos geles con el resolving al 9% y el stacking al 4%.
2. La electroforesis se realizó a 90 v durante 2 horas.

Cabe destacar que en este paso se agregó un marcador de peso molecular en los geles, este marcador sirve para poder identificar el peso de las proteínas y visualizar donde podría estar la proteína de interés.

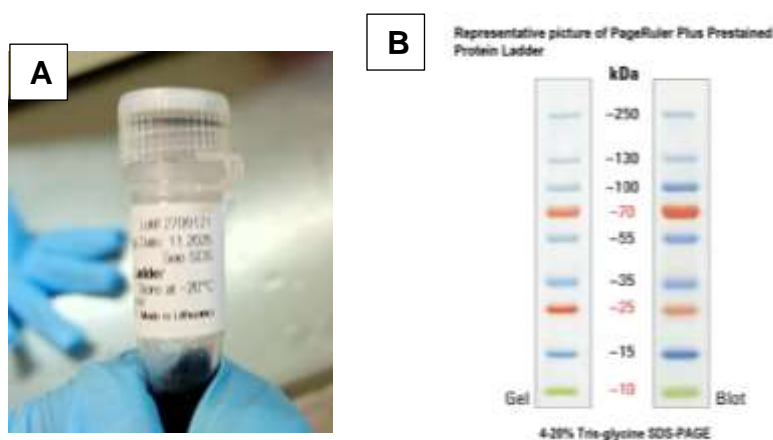


Figura 5. A. Marcador de proteínas **B.** Diagrama de los pesos moleculares de la proteína.

El marcador se agregó con un volumen de 3 μ l al inicio del gel y con 1 μ l al final del gel, el marcador que se empleó se visualiza en la figura 5, al igual que su diagrama de pesos moleculares.

Las muestras se acomodaron de la siguiente forma:

GEL 1	GEL 2
Marcado 3 μ l	Marcado 3 μ l
Control 1	Control 4
Control 2	Muestra 11 – 4.0
Muestra 3 – 2.1	Muestra 12 – 4.0
Muestra 5 – 2.1	Muestra 15 – 10.0
Muestra 9 – 4.0	Muestra 16 – 10.0
Muestra 10 – 4.0	Muestra 6 – 2.1
Muestra 13 – 10.0	Muestra 7 – 2.1
Muestra 14 – 10.0	Muestra 8 – 2.1
Marcado 1 μ l	Marcado 1 μ l

6. Transferencia e inmunodetección de proteínas por western blot

Después de finalizar la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF mediante carga eléctrica. Las membranas pueden ser de materiales como: celulosa, nitrocelulosa, difluoruro de polivinilideno (PVDF), acetato de celulosa. Esto se realiza debido a que el gel no permite que las proteínas puedan permanecer ahí por mucho tiempo, impidiendo realizar la identificación de la proteína con anticuerpos, sin embargo, la membrana tiene la capacidad de mantener intacta a la proteína y nos permite realizar la identificación. A continuación, se describe el procedimiento y los materiales/reactivos que se emplearon en esta técnica.

Materiales/reactivos

- Gel con las proteínas
- Papel filtro
- Fibras
- Membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF)
- Cámara de transferencia
- Fuente de poder
- Metanol
- Agua destilada
- Buffer Tris 10%

Procedimiento

Antes de que la electroforesis terminara, se procedió a preparar el buffer de transferencia, debido a que este tiene que estar frío para realizar el procedimiento.

Se preparó un litro de esta solución, en una probeta se colocó el 20% (200 ml) de metanol, 700 ml de agua destilada y 10 % (100 ml) buffer Tris 10%; se homogenizo bien y se almaceno a -20°C. Este buffer previene la deformación del gel durante la transferencia e incrementa la unión de la proteína a la membrana.

Media hora antes de que la electroforesis terminara, en un recipiente se colocó un poco del buffer de transferencia, en este se colocó en forma de sándwich la fibra, el filtro, membrana de PVDF, el filtro y la fibra, corroborando que estas se humedecieran con el buffer. Esto se realizó una vez más debido a que realizo la corrida de dos geles. Se llevó nuevamente a -20 °C.

Una vez que la electroforesis termino el equipo se apagó y se desmonto, con cuidado se desprendieron los geles de los vidrios y se colocaron en un recipiente con de buffer de transferencia.

En un caset de transferencia (figura 6A) se colocó en el polo positivo, la fibra, el filtro la membrana, el gel, filtro y fibra como se muestra en la figura 6B, posterior a esto se cerró el caset tratando de no formar burbujas, todo esto se realizó en el recipiente con buffer donde se encontraban los filtros, membranas y fibras. Se colocaron los casets de los dos geles en la cámara de transferencia, se agregaron refrigerantes y se llenó la cámara con buffer de transferencia, se cerró, se conectó a la fuente de poder, se conectó seleccionando las siguientes condiciones: 250 A durante dos horas y media. Toda la transferencia se llevó a una temperatura de 4°C.

Una vez finalizada la transferencia, se desmonto la cámara, las membranas se pasaron a un recipiente con rojo de ponceau, este colorante permite visualizar las bandas de proteínas en las membranas. Este se dejó unos minutos, se retiró el colorante y las membranas se lavaron con agua destilada, finalmente se dejaron secando.

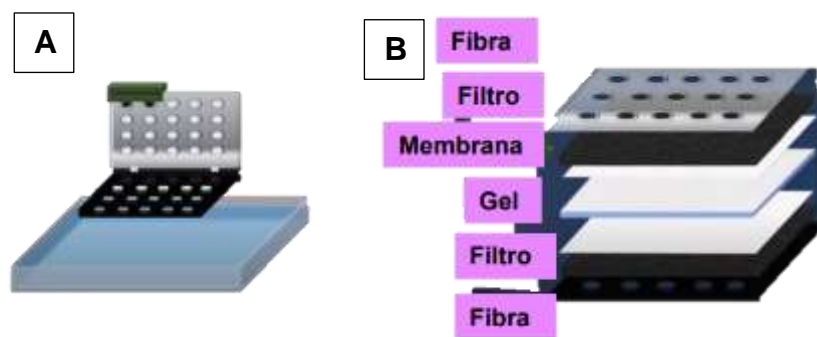


Figura 6. A. Caset de transferencia B. Diagrama para realizar el sándwich de transferencia (imagen modificada de Maldonado. M, & Jorrín J. 2016)

7. Identificación de la MHC con anticuerpos

Con ayuda de la transferencia se logró separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular, con ello se identificó aproximadamente el sitio donde la MHC podría estar presente, pero debido a que hay diferentes proteínas con los mismos pesos moleculares no tenemos certeza de que la proteína de interés este presente; para identificar a MHC empleamos anticuerpos (Ab) para la proteína, estos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales; los anticuerpos monoclonales suelen ser más específicos, mientras que los policlonales son más sensibles, lo que resulta relevante si se pretende detectar proteínas menos abundantes en la muestra. El fundamento de la identificación de proteínas empleando Ab, se basa en emplear dos Ab, uno primario y otro secundario.

El primario tiene un sitio de unión único que reconoce proteínas específicas, los anticuerpos secundarios, se unirán de forma selectiva a los anticuerpos primarios, estos sirven para transportar el marcador de detección y amplificar la señal emitida. El marcador unido a los anticuerpos secundarios suele ser una biotina o una enzima reportera, como la fosfatasa alcalina (FA) o la peroxidasa de rábano (HRP), donde la enzima unida al anticuerpo desencadena una reacción con el sustrato luminiscente generando luz y emitiendo una señal, con esto es posible visualizar las bandas. A continuación, se describe el procedimiento, materiales/reactivos empleados para este procedimiento.

Materiales/Reactivos

- Anticuerpo primario MHC
- Anticuerpo primario GAPDH
- Anticuerpo secundario goat α -mouse (HRP)
- Leche descremada
- Solución salina tamponada (TBS 10x)
- Membranas de PVDF

Procedimiento

Después que las membranas estuvieron completamente secas, el siguiente paso fue identificar la parte de interés para cortar la membrana. Se cortaron de 70 kDa a 250 kDa para MHC y de 25 kDa a 55 kDa para GAPDH (es una proteína de referencia empleado como control, para tener una buena interpretación del western blot). Las membranas se colocaron en recipientes pequeños. Después de que se cortaron las membranas, se procedió a realizar la solución de bloqueo, esta sirve para bloquear toda la membrana y evitar que el anticuerpo se adhiera a otros sitios que no contiene proteína. Se preparó una solución de 50 ml al 2% de leche descremada, se añadió 2.5 g de leche descremada en 50 ml de TBS, se homogenizo y se agregó esta

solución a las membranas que se encontraban en los recipientes, se corroboró que se cubrieran correctamente y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante una hora.

Para los anticuerpos primarios se realizaron diluciones, para MHC una dilución 1:400 mientras que para GAPDH 1:1000. Estas se prepararon de la siguiente manera. Se agregó 3000 µl para cada membrana, se prepararon soluciones de 6000 µl para cada anticuerpo, a continuación, se describen los cálculos que se realizaron para cada uno.

MHC dilución 1:400

1 µl de Ab MHC ----- 400 µl TBS $\frac{(6000 \mu\text{l}) (1 \mu\text{l})}{400 \mu\text{l}} = 15 \mu\text{l Ab MHC en } 6000 \mu\text{l TBS}$

? µl Ab MHC ----- 6000 µl TBS

GAPDH dilución 1:1000

1 µl de Ab MHC ----- 1000 µl TBS $\frac{(6000 \mu\text{l}) (1 \mu\text{l})}{1000 \mu\text{l}} = 6 \mu\text{l Ab GAPDH en } 6000 \mu\text{l TBS}$

? µl Ab MHC ----- 6000 µl TBS

Una vez que finalizó el tiempo de incubación se procedió a realizar lavados con TBS, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno en constante movimiento. Se agregó los 3 ml de la solución de anticuerpo primario como corresponde y se dejó incubando a 4 °C en constante movimiento durante toda la noche.

Se preparó la solución con el anticuerpo secundario, para las cuatro membranas se empleó el anticuerpo secundario goat α-mouse con una marca de HRP, la solución que se preparó fue de 12 ml y la dilución del anticuerpo fue 1:3000, los cálculos se muestran a continuación.

Anticuerpo secundario goat α-mouse dilución 1:3000

1 µl de Ab secundario goat α-mouse ----- 3000 µl TBS

? µl Ab secundario goat α-mouse ----- 12000 µl TBS

$\frac{(12000 \mu\text{l}) (1 \mu\text{l})}{3000 \mu\text{l}} = 4 \mu\text{l Ab GAPDH en } 12000 \mu\text{l TBS}$

Después de 18 horas se retiró el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS, finalmente se agregó 3 ml del anticuerpo secundario a cada membrana y se incubó una hora a temperatura ambiente en constante movimiento. Una vez que finalizó el tiempo de incubación se realizaron nuevamente tres lavados con TBS de 5 min cada uno y se realizó la lectura en el equipo de inmunofluorescencia.

NOTA. Esto se visualiza de una manera más descriptiva en el diagrama 5 en la parte de anexos.

6.- ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CULTIVOS CELULARES

Los ensayos de citotoxicidad son técnicas que nos permiten determinar si alguna molécula, químico o fármaco tendrá un efecto toxico en las células. El ensayo de toxicidad se realizó para evaluar el efecto anticancerígeno de los tocotrienoles de palma en células de cáncer de hueso (TIB-223-ATCC) mediante el ensayo de anaranjado de acridina. Este ensayo es una tinción en la que se emplea anaranjado de acridina y bromuro de etidio (BrEt).

Los resultados obtenidos se analizaron mediante citometría de flujo y por microfotografías, los materiales/reactivos y el procedimiento que se realizó se describe a continuación.

Materiales/Reactivos

- Células TIB-223-ATTC
- Medio de crecimiento Medio McCoy 5A modificado
- PBS (buffer fosfato salino)
- Tripsina-EDTA
- Placas de 6 pozos
- Chamber slides de 8 pozos
- Tubos de 15 ml
- Tubos de 50 ml
- Tubos eppendorf
- Agua destilada
- Bromuro de etidio (BrEt)
- Naranja de acridina
- Tubos de citometría
- Tocotrienoles de palma

Procedimiento

Previamente se expandieron células TIB-223-ATTC suficientes para el experimento. Este ensayo por citometría de flujo se realizó por triplicado y para las microfotografías se realizó por duplicado, se describen los puntos que se llevaron a cabo en este ensayo.

1. Siembra de células TIB-223-ATCC

Para citometría de flujo

La siembra de las células TIB-233-ATCC se realizó en placas de 6 pozo, la capacidad en cada pozo es de 950000 células, y se empleó una confluencia del 5%. Los cálculos que se describen a continuación se realizaron para determinar la cantidad de células necesarias para este ensayo.

Cálculos.

Se calcularon el total necesarias para cada pozo.

1 placa tiene 6 pozo = 1 pozo tiene capacidad para 950000 células

Se sembró el 5% de células en cada pozo = $\frac{(5\%)(950000 \text{ celulas})}{100\%} = 47500 \text{ células}$

1 pozo necesito 47500 células, para la placa necesito (considero 1 pozo de exceso):

$$(47500 \text{ células}) (7) = 332500 \text{~} 333000 \text{ células para cada placa}$$

Para el experimento se requirieron 3 placas por lo cual el total de células necesarias para el experimento son:

$$(3) (333000 \text{ células}) = 999000 \text{ células}$$

Para las microfotografías

La siembra de las células TIB-233-ATCC se realizó en chamber slides, estas contienen ocho pozos y la capacidad en cada pozo es de 80000 células, y se empleó una confluencia del 50%. Los cálculos que se describen a continuación se realizaron para determinar la cantidad de células necesarias para este ensayo.

Cálculos.

Se calcularon el total necesarias para cada pozo.

1 chamber slides tiene 8 pozo = 1 pozo tiene capacidad para 80000 células

Se sembró el 50% de células en cada pozo = $\frac{(50\%)(80000 \text{ celulas})}{100\%} = 40000 \text{ células}$

1 pozo necesito 40000 células, para la chamber slides necesito (considero 1 pozo de exceso):

(40000 células) (9) = **360000 células para cada una chamber slides.**

Para el experimento se requirieron 2 chamber slides por lo cual el total de células necesarias para el experimento son:

(3) (360000 células) = **720000 células**

Después de obtener el total de células necesarias, se revisó en el microscopio las células que se expandieron para verificar que tuviéramos la confluencia de células necesarias para los experimentos; posteriormente se retiró el medio y lavamos tres veces con 2 ml de PBS para eliminar todo el medio posible. Una vez que se realizaron los lavados se agregó 2 ml de tripsina-EDTA y se dejó incubando durante 5 minutos a 37°C. Una vez transcurridos los 5 minutos de incubación, se corroboró que las células se hayan desprendido correctamente observando al microscopio, posteriormente se inactivo la tripsina-EDTA con medio de crecimiento y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min, después se decantó el medio, sin perder el pellet. Finalmente se agregó 1 ml de medio de crecimiento y se homogenizo correctamente hasta deshacer el pellet y el volumen se completó con 2 mililitro de medio de crecimiento.

Para contabilizar las células en la cámara de Neubauer, se hizo una mezcla con 10 µl de la suspensión celular más 10µl de azul de tripano, se homogenizo y se colocó en la cámara. Una vez que se contabilizaron las dos cámaras se realizaron los siguientes cálculos:

1. Se calculó el promedio de los cuatro cuadrantes de cada una de las cámaras.

	Primera cámara	Segunda cámara
	138	142
	106	104
	135	140
	105	112
PROMEDIO	121	124.5

2. Se calculó el promedio de los promedios de las dos cámaras.

$$\text{PROMEDIO} = (121 + 124.5) / 2 = \mathbf{122.75}$$

3. Se aplicó la siguiente formula.

$$TC = (122.75)(2)(3 \text{ ml})(10000) = \mathbf{7365000 \text{ células}}$$

4. Se calculó el volumen de la suspensión final con la cantidad de células total (considera que a cada pozo se le agregó 1 ml de esa suspensión)

Placas de 6 pozos – 3 placas con 6 pozos cada una = 18 pozos (considerar 1 extra)

La capacidad es de 1.9 a 2.9 ml para cada pozo, se agregó 1 ml de suspensión celular en cada pozo

Placas de 6 pozos – **necesitamos una suspensión de 19 ml**

Chambers slides – 2 chambers slides con 8 pozos cada una = 16 pozos (considerar 1 extra)

La capacidad es de 500 µl para cada pozo, se agregó 400 µl de suspensión celular en cada pozo

Chambers slides – **necesitamos una suspensión de 6.8 ml**

5. Se calculó el volumen que se tomó de la suspensión de 3 ml para las chambers slides y placas de 6 pozos

Placas de 6 pozos – necesitamos 999000 células

$$\text{vol. para la nueva suspensión} = \frac{(999000 \text{ células})(3 \text{ ml})}{7365000 \text{ células}} = 0.4069 \text{ ml} = \mathbf{407 \mu l}$$

Chambers slides – necesitamos 720000 células

$$\text{vol. para la nueva suspensión} = \frac{(720000 \text{ células})(3 \text{ ml})}{7365000 \text{ células}} = 0.2932 \text{ ml} = \mathbf{293 \mu l}$$

6. Se realizó la suspensión celular para cada ensayo.

Placas de 6 pozos – suspensión de 19 ml con 999000 células

(Volumen de la alícuota 19 ml) – (407 µl de la suspensión celular) = 18593 µl

Se agregó en un tubo de 50 ml: 407 µl de la suspensión celular + 18593 µl medio de crecimiento

Chambers slides – suspensión de 6.8 ml con 720000 células

(Volumen de la alícuota 6.8 ml) – (293 µl de la suspensión celular) = 6507 µl

Se agregó en un tubo de 50 ml: 293 µl de la suspensión celular + 6507 µl medio de crecimiento.

Después se procedió a agregar medio de crecimiento a las placas de 6 pozos se les agrego 1.5 ml y a las chambers slides 100 µl a cada pozo. Finalmente, a las chambers slides se las agrego 400 µl de la suspensión que preparamos para esta y a las placas de 6 pozos 1 ml de la suspensión que se prepararon para esta. Se incubo a 37°C.

2. Aplicación del tratamiento

Después de 24 horas se corroboró que las células proliferaron correctamente y se procedió a realizar la aplicación del tratamiento, este se aplicó como se visualiza en la siguiente imagen.

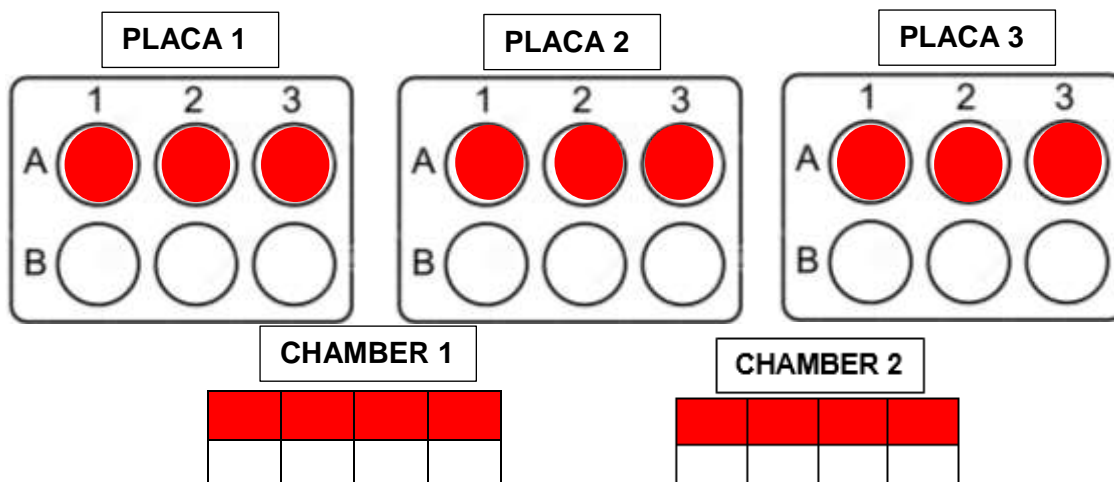


Figura 7. Diagrama de la aplicación del tratamiento, las partes coloreadas de rojo serán a los pozos que se aplicara tratamiento. El resto de los pozos serán los controles.

El tratamiento se preparó de la siguiente forma; la dosis letal 50 de los tocotrienoles de palma fue de 4.3 µg/ml, a continuación, se describen los cálculos realizador para preparar la solución.

Tratamiento para placa de 6 pozos [4.3 µg/ml]

1. Se calculó el volumen final de la solución. A cada placa se le agregara 2 ml de tratamiento, este solo se colocó a tres pozos de cada placa.

(2 ml de tratamiento) (9 pozos) = 18 ml (se consideró 1.5 ml de exceso) = **19.5 ml**

2. Se calculó la cantidad de tocotrienoles de palma que se agregaron.

Solución stock



$$C1V1 = C2V1$$
$$C2 = [4.3 \mu\text{g/ml}] \quad V2 = 19.5 \text{ ml}$$
$$C1 = [50000 \mu\text{g/ml}] \quad V1 = ?$$

$$V1 = C2V1/C1$$
$$V1 = (4.3 \mu\text{g/ml}) (19.5 \text{ ml}) / 50000 \mu\text{g/ml}$$
$$V1 = 1.677 \mu\text{l}$$

Se agregó en un tubo de 50 ml: 19498.323 ml de medio de crecimiento + 1.677 µl del stock de tocotrienoles de palma [50000 µg/ml].

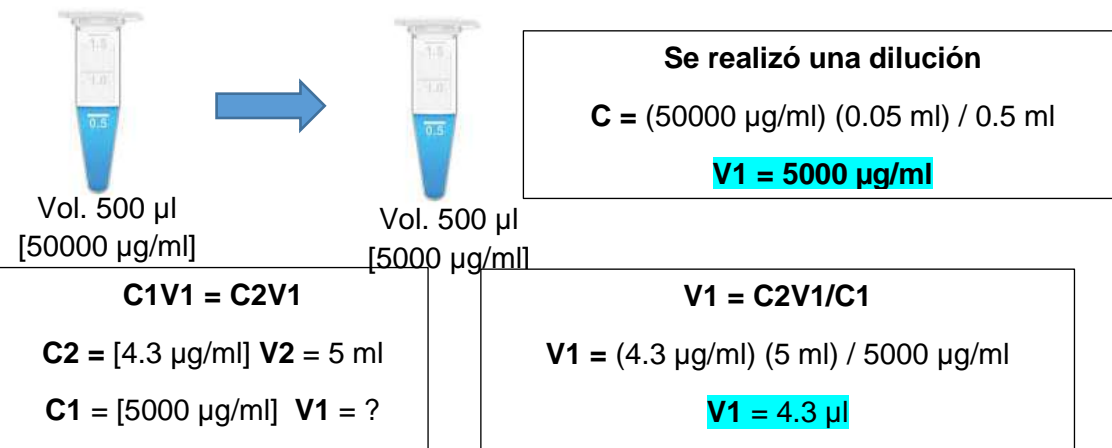
Tratamiento para chambers slides [4.3 µg/ml]

1. Se calculó el volumen final de la solución. A cada placa se le agregara 500 µl de tratamiento, este solo se colocó a cuatro pozos de cada chamber slides.

(500 µl de tratamiento) (8 pozos) = 4 ml (se consideró 1 ml de exceso) = **5 ml**

2. Se calculó la cantidad de tocotrienoles de palma que se agregarían.

Solución stock



Vol. 500 µl [50000 µg/ml] → Vol. 500 µl [5000 µg/ml]

Se realizó una dilución
 $C = (50000 \mu\text{g/ml}) (0.05 \text{ ml}) / 0.5 \text{ ml}$
V1 = 5000 µg/ml

C1V1 = C2V2
C2 = [4.3 µg/ml] V2 = 5 ml
C1 = [5000 µg/ml] V1 = ?

V1 = C2V1/C1
V1 = (4.3 µg/ml) (5 ml) / 5000 µg/ml
V1 = 4.3 µl

Se agregó en un tubo de 50 ml: 4995.7 ml de medio de crecimiento + 4.3 µl del stock de tocotrienoles de palma [50000 µg/ml].

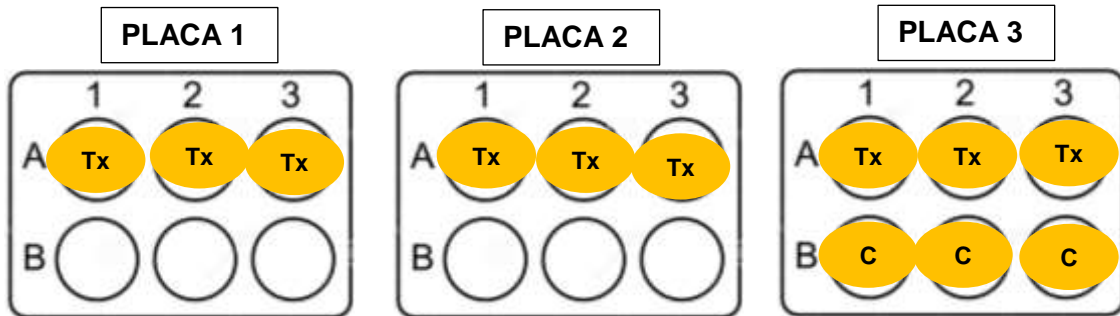
Después de preparar los tratamientos, se agregaron 2 ml del tratamiento solo 3 pozos de cada placa y a los pozos restantes solo se les cambio el medio. Se incubaron a 37°C durante 14 horas.

3. Preparación del naranjado de acridina y bromuro de etidio.

Una vez que transcurrieron las 14 horas procedimos a preparar las alícuotas de anaranjado de acridina y bromuro de etidio para cada ensayo como se describe a continuación.

Solución de naranja de acridina + bromuro de etidio para placa de 6 pozos [1 mg/ml]

La solución de anaranjado de acridina y bromuro de etidio se agregó a los pozos que tenían tratamiento y a tres controles que se muestran en el siguiente diagrama.



1. Se calculó el volumen total que se necesitaría para el ensayo.

Se agregó 1 ml de esta solución en cada pozo que está marcado en el diagrama.

El total de pozos para este ensayo son $12 \times 1 \text{ ml} = \text{volumen total } 12 \text{ ml}$

2. Se calculó la cantidad necesaria de naranjado de acridina y bromuro de etidio para la solución.

Solución stock de naranjado de acridina



$$C1V1 = C2V1$$

$$C2 = [1 \text{ mg/ml}] \quad V2 = 12 \text{ ml}$$

$$C1 = [240 \text{ mg/ml}] \quad V1 = ?$$

$$V1 = C2V1/C1$$

$$V1 = (1 \text{ mg/ml}) (12 \text{ ml}) / 240 \text{ mg/ml}$$

$$V1 = 50 \mu\text{l}$$

Solución stock de bromuro de etidio



$$C1V1 = C2V1$$

$$C2 = [1 \text{ mg/ml}] \quad V2 = 12 \text{ ml}$$

$$C1 = [242.3 \text{ mg/ml}] \quad V1 = ?$$

$$V1 = C2V1/C1$$

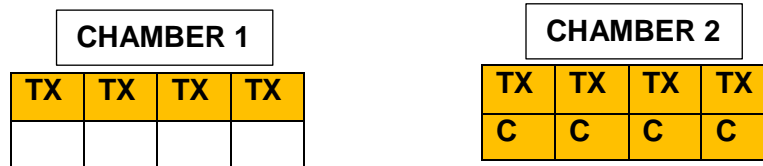
$$V1 = (1 \text{ mg/ml}) (12 \text{ ml}) / 242.3 \text{ mg/ml}$$

$$V1 = 49.53 \mu\text{l}$$

Se agregó en un tubo de 15 ml: 49.53 µl de bromuro de etidio + 50 µl de naranjado de acridina + 11900.47 µl.

Solución de naranjado de acridina + bromuro de etidio para chambers slides [100 µg/ml]

La solución de anaranjado de acridina y bromuro de etidio se agregó a los pozos que tenían tratamiento y a tres controles que se muestran en el siguiente diagrama.



1. Se calculó el volumen total que se necesitaría para el ensayo.

Se agregó 500 µl de esta solución en cada pozo que está marcado en el diagrama.

El total de pozos para este ensayo son 12 x 500 µl = **volumen total 6 ml**

2. Se calculó la cantidad necesaria de naranjado de acridina y bromuro de etidio para la solución.

Solución stock de naranjado de acridina



$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_2 = [100 \mu\text{g/ml}] \quad V_2 = 6 \text{ ml}$$

$$C_1 = [240000 \mu\text{g/ml}] \quad V_1 = ?$$

$$V_1 = C_2V_2/C_1$$

$$V_1 = (100 \mu\text{g/ml}) (6 \text{ ml}) / 240000 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = 2.5 \mu\text{l}$$

Solución stock de bromuro de etidio



$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_2 = [100 \mu\text{g/ml}] \quad V_2 = 6 \text{ ml}$$

$$C_1 = [242300 \mu\text{g/ml}] \quad V_1 = ?$$

$$V_1 = C_2V_2/C_1$$

$$V_1 = (100 \mu\text{g/ml}) (6 \text{ ml}) / 242300 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = 2.48 \mu\text{l}$$

Se agregó en un tubo de 15 ml: 2.48 µl de bromuro de etidio + 2.5 µl de naranjado de acridina + 5995.02 µl.

NOTA: Una vez que se realizan las soluciones, se cubrieron con papel aluminio, debido a que los reactivos son fotosensibles.

4. Ensayo de naranjado de acridina

Una vez que estuvieron listas las alícuotas se realizó el ensayo como se describe a continuación.

Citometría de flujo - Placas de 6 pozos

Después de haber transcurrido aproximadamente catorce horas de haber aplicado el tratamiento, se retiró el medio y se lavó con PBS (con 500 µL por lo menos 3 veces o hasta que se vea transparente). Se agregó 1 mL de medio de crecimiento McCoy en los controles de dos placas y 1 ml de la alícuota de anaranjado de acridina a las placas con tratamiento y al control restante. Se llevó Incubar durante 5 min. a 37°C. El medio de crecimiento y la alícuota de anaranjado y bromuro de etidio se retiró y se agregó tripsina (500 µL) a las tres placas y se incubo por 5 min, se visualizaron que se hayan desprendido correctamente y se Inactivo las tres placas con 500 µL de medio de crecimiento McCoy en cada pozo, finalmente se recuperaron las células en tubos de cartometría y se llevó a centrifugar por 10 min a 1500 rpm, se decantó y el pellet se resuspendieron con 1 ml de PBS y se llevó a la lectura con el equipo.

Microfotografías – Chamber slides

Después de haber transcurrido aproximadamente catorce horas de haber aplicado el tratamiento, se retiró el medio y se agregó 500 µl de medio de crecimiento McCoy en el control de la chamber slides y 500 µl de la alícuota de anaranjado de acridina a los pozos con tratamiento y a los del control restante. El efecto se visualizó en el microscopio invertido de fluorescencia.

NOTA. Esto se visualiza de una manera más descriptiva en el diagrama 6 en la parte de anexos.

7.- OTRAS ACTIVIDADES

Durante mi servicio social también realice otras actividades como:

1. Curvas estándar de BSA.
2. Extracción de ADN.

3. Extracción de ARN.
4. Seminario sobre la técnica de western blot realizada en el laboratorio.
5. Escritura de un artículo de divulgación titulado: BENEFICIO DE LA ASTAXATINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO
6. Obtención de muestras biológicas (heces y sangre periférica).

Las actividades mencionadas previamente se describen de forma más detallada en las bitácoras de avance (3 meses y 6 meses). En la parte de anexos se visualizan diagramas que ejemplifican de forma ilustrada cada uno de los experimentos realizados.

METAS ALCANZADAS.

Durante mi estancia en el servicio social logramos evaluar el efecto biológico de los tocotrienoles de palma, sin embargo, debido a que mi estancia fue corta, no fue posible cumplir con objetivo principal de todo el proyecto de investigación, por otra parte, todos los experimentos que se realizaron para ir cumpliendo con los objetivos específicos me ayudaron, aplicando todos mis conocimientos obtenidos a lo largo mi carrera, así mismo, adquirí nuevos conocimientos y habilidades tanto de forma teórica y práctica.

La experiencia obtenida durante mi estancia en el laboratorio de enfermedades neuromusculares es de gran ayuda para mi formación profesional ya que, en conjunto con los conocimientos adquiridos durante la carrera, me servirán para tener una un mejor desempeño profesionalmente.

RESULTADOS.

Algunos de los resultados que se obtuvieron en los experimentos realizados de muestra a continuación.

1.- WESTERN BLOT

Para el western blot, se realizaron diferentes pasos para lograr el objetivo, en algunos de estos pasos se obtuvieron algunos resultados, los cuales se muestran a continuación.

A) Curva estándar de BSA

En la primera curva se obtuvo una r^2 menor que 0.98 (figura 8), debido a esto, se repitió el procedimiento. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9.

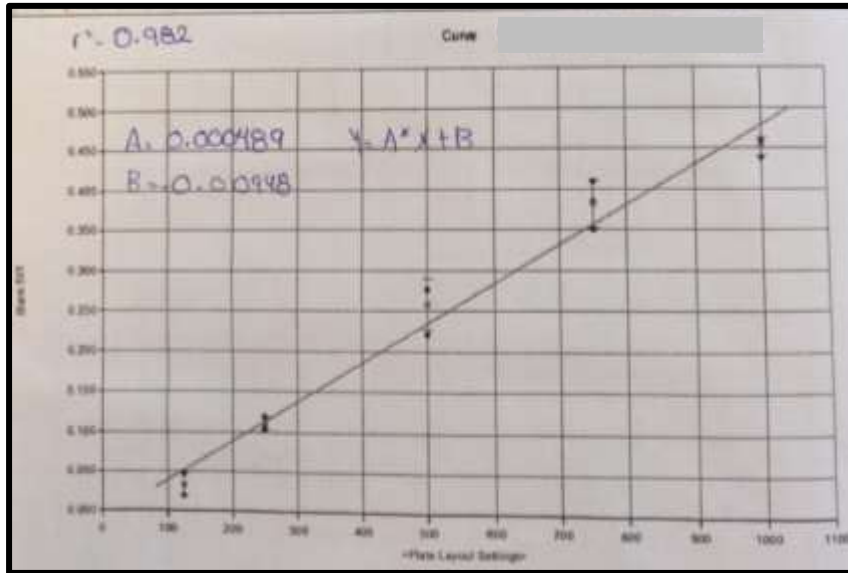


Figura 8. Primera curva estándar de BSA.

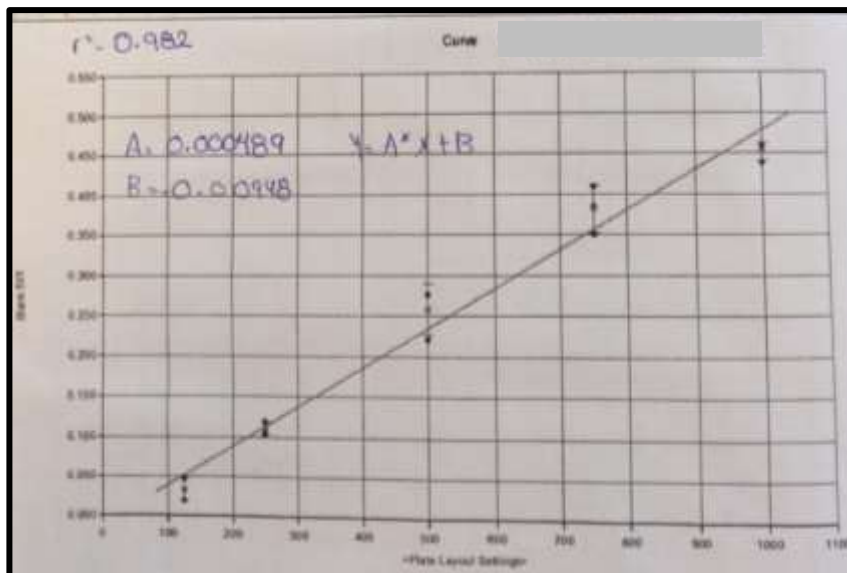


Figura 9. Curva estándar de BSA.

B) Concentraciones de las muestras.

En la siguiente tabla se visualizan las concentraciones que se obtuvieron de las 16 muestras.

Tabla 6. Resultados se los volúmenes que se emplearon para preparar las soluciones

MUESTRA	NOMBRE	POCILLO	DILUCIÓN	ABS	Promedio ABS	CONC (µg/mL)	FD CONC (µg/mL)
SPL1	Control - R1	A4	1;20	0.623			
	Control - R1	A5	1;20	0.65	0.6365	1321.0225	26420.4499
SPL2	Control - R2	B4	1;20	0.668			
	Control - R2	B5	1;20	0.709	0.6885	1427.3620	28547.2393
SPL3	2.1 - R3	C4	1;20	0.585			
	2.1 - R3	C5	1;20	0.633	0.609	1264.7853	25295.70552
SPL4	Control 4	D4	1;20	0.612			
	Control 4	D5	1;20	0.674	0.643	1334.3149	26686.29857
SPL5	2.1 - R5	E4	1;20	0.627			
	2.1 - R5	E5	1;20	0.675	0.651	1350.6748	27013.49693
SPL6	2.1 - R6	F4	1;20	0.598			
	2.1 - R6	F5	1;20	0.636	0.617	1281.1452	25622.90389
SPL7	2.1 - R7	G4	1;20	0.471			
	2.1 - R7	G5	1;20	0.464	0.4675	975.4192	19508.38446
SPL8	2.1 - R8	H4	1;20	0.539			
	2.1 - R8	H5	1;20	0.578	0.5585	1161.5133	23230.26585
SPL9	4.0 - R9	A6	1;20	0.473			
	4.0 - R9	A7	1;20	0.573	0.523	1088.9162	21778.32311
SPL10	4.0 - R10	B7	1;20	0.539			
	4.0 - R10	A8	1;20	0.581	0.56	1164.5808	23291.61554
SPL11	4.0 - R11	C6	1;20	0.513			
	4.0 - R11	C7	1;20	0.515	0.514	1070.5112	21410.22495
SPL12	4.0 - R12	D6	1;20	0.625			
	4.0 - R12	D7	1;20	0.664	0.6445	1337.3824	26747.64826
SPL13	10.0 - 13	E6	1;20	0.533			
	10.0 - 13	E7	1;20	0.546	0.5395	1122.6585	22453.16973
SPL14	10.0 - 14	F6	1;20	0.61			
	10.0 - 14	F7	1;20	0.64	0.625	1297.5051	25950.10225
SPL15	10.0 - 15	G6	1;20	0.589			
	10.0 - 15	G7	1;20	0.66	0.6245	1296.4826	25929.65235
SPL16	10.0 - 16	H6	1;20	0.572			
	10.0 - 16	H7	1;20	0.589	0.5805	1206.5031	24130.06135

C) Volúmenes finales y cantidad de buffer de carga.

En la siguiente tabla se visualizan las concentraciones que se obtuvieron de las 16 muestras.

Tabla 7. Resultados de los volúmenes que se emplearon para preparar las soluciones

MUESTRA	NOMBRE	FD CONC ($\mu\text{g/mL}$)	Relación 60 $\mu\text{g mL}$	μL	buffer de carga
1	Control - R1	26420.4499	0.002271	2.2710	0.7570
2	Control - R2	28547.2393	0.0021	2.1018	0.7006
3	2.1 - R3	25295.70552	0.0024	2.3719	0.7906
4	Control 4	26686.29857	0.0022	2.2483	0.7494
5	2.1 - R5	27013.49693	0.0022	2.2211	0.7404
6	2.1 - R6	25622.90389	0.0023	2.3417	0.7806
7	2.1 - R7	19508.38446	0.0031	3.0756	1.0252
8	2.1 - R8	23230.26585	0.0026	2.5828	0.8609
9	4.0 - R9	21778.32311	0.0028	2.7550	0.9183
10	4.0 - R10	23291.61554	0.0026	2.5760	0.8587
11	4.0 - R11	21410.22495	0.0028	2.8024	0.9341
12	4.0 - R12	26747.64826	0.0022	2.2432	0.7477
13	10.0 - 13	22453.16973	0.0027	2.6722	0.8907
14	10.0 - 14	25950.10225	0.0023	2.3121	0.7707
15	10.0 - 15	25929.65235	0.0023	2.3140	0.7713
16	10.0 - 16	24130.06135	0.0025	2.4865	0.8288

D) Integridad de proteínas.

Los resultados se muestran a la figura 10; se realizó dos veces este procedimiento colocando en el segundo gel algunas de las proteínas restantes y algunas que ya se habían evaluado en el primer gel.

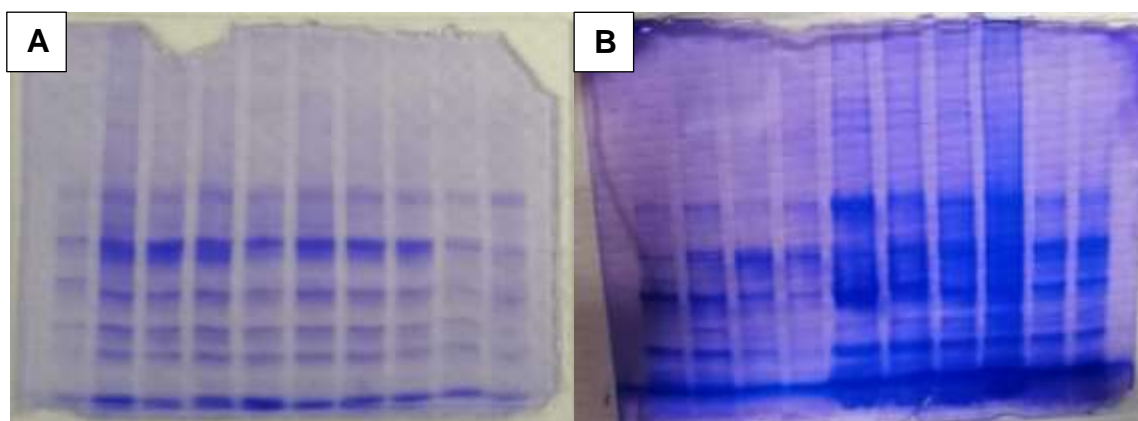




Figura 10. A. integridad de las proteínas de las muestras control1, control 2, M3-2.1, Control 4, M5-2.1, M6-2.1, M9-4.0, M10-4.0, M13-10.0 y M14-10.0 B. Integridad de las proteínas de las muestras: M16-10.0, M15-10.0, M11-4.0, M7-2.1, M14-10.0, M13-10.0, M5-2.1, control 1, M9-4.0 y control 4.

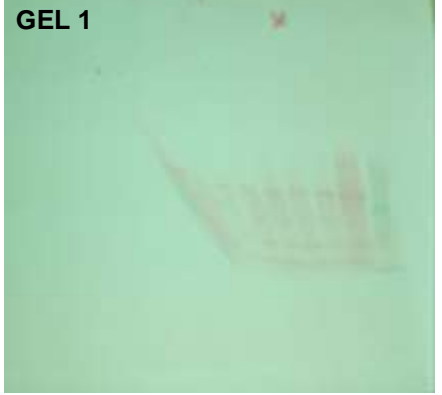
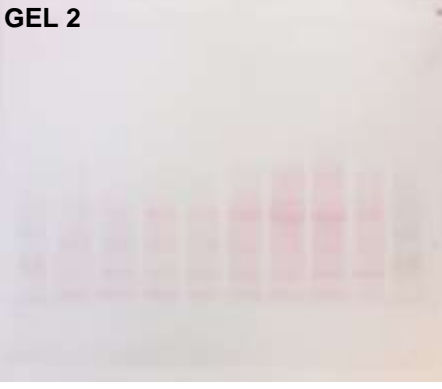
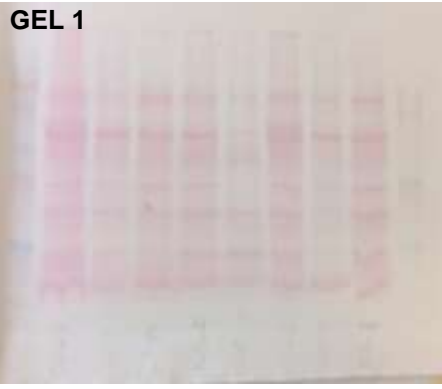
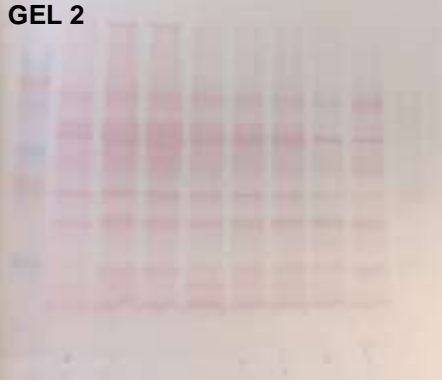
E) Membranas

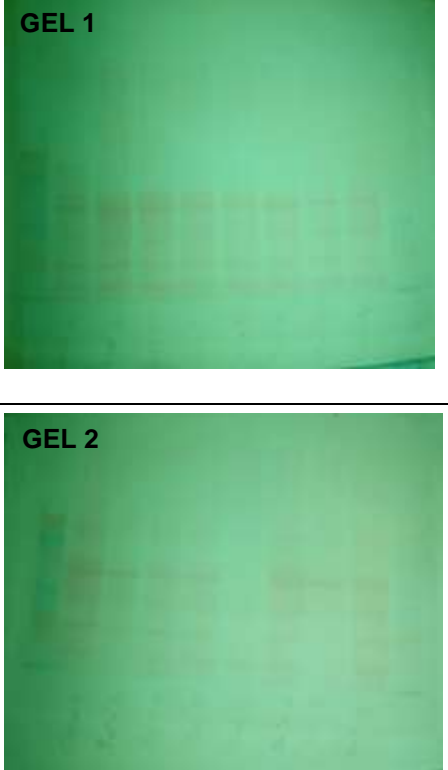
Para la identificación de la cadena pesada de miosina con un peso molecular de 230 kDa se realizaron un total de cuatro experimentos en los cuales, conforme se iban desarrollando se realizaban algunas modificaciones de las condiciones para obtener mejores resultados. En la tabla 8 se detallan las condiciones de las transferencias y electroforesis de cada uno de los experimentos.

Se logró obtener las condiciones adecuadas de la electroforesis y la transferencia en el experimento 4, sin embargo, aún falta identificar las condiciones para mejorar el procedimiento con la identificación con anticuerpos para la identificación de la cadena pesada de miosina.

Tabla 8. Condiciones y resultados de las electroforesis y transferencias realizadas.

No. Experimento	Condiciones de la muestra	Condiciones de la electroforesis	Condiciones de la transferencia	Imagen de la membrana
1	Se agregó 60 µg de proteína	2 horas 90 v Gel al 9%(resolving) 4%(stacking)	250 A 2 horas y media	GEL 1 
				GEL 2 

2	Se agregó 80 μg de proteína	2 horas 90 v Gel al 9%(resolving) 4%(stacking)	350 A 3 horas	 <p>GEL 1</p>	 <p>GEL 2</p>
3	Se agregó 160 μg de proteína	2 horas 90 v Gel al 12%(resolving) 4%(stacking)	350 A 3 horas	 <p>GEL 1</p>	 <p>GEL 2</p>

4	Se agregó 160 µg de proteína	2 horas 90 v Gel al 9%(resolving) 4%(stacking)	350 A 3 horas	
---	------------------------------	--	------------------	---

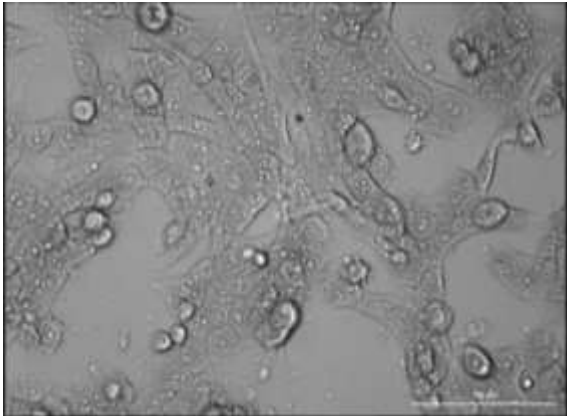
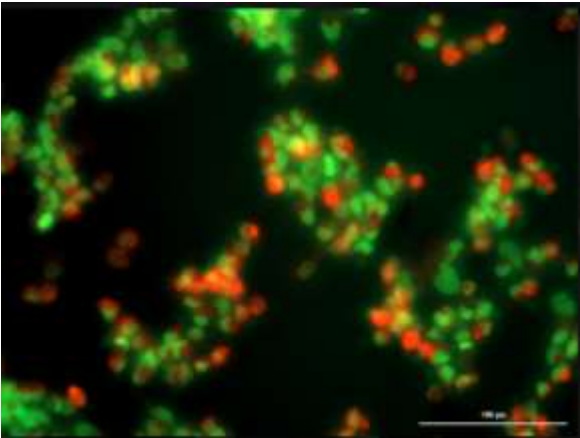
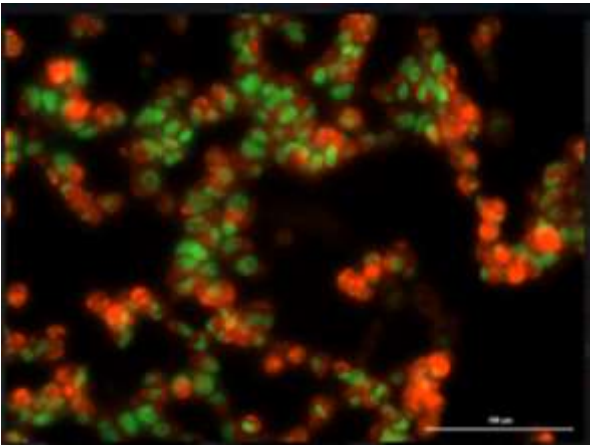
2.- ANARANJADO DE ACRIDINA

Los resultados obtenidos de las microfotografías del ensayo de citotoxicidad de los tocotrienoles de palma en células de cáncer de hueso TIB-223-ATCC con anaranjado de acridina y bromuro de etidio se muestran a continuación en la tabla 9. Cabe destacar que el bromuro de etidio tiñó de rojo/ anaranjado a las células con núcleo fragmentado mientras que el anaranjado tiñó a las células con membrana intacta de color verde.

Las coloraciones con los dos reactivos empleados para el ensayo se pueden interpretar de la siguiente manera en los resultados.

1. Coloración verde: células con la membrana intacta.
2. Coloración verde exhibiendo puntos brillantes en los núcleos: células apoptóticas tempranas, lo puntos brillantes en los núcleos se deben a la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear.
3. Coloración naranja y roja: células apoptóticas tardías, estas muestran núcleos fragmentados y condensados.
4. Coloración rojo y anaranjado: células necróticas, estas se asemejan a células viables pero la cromatina no está condesada.

Tabla 9. Resultados de las microfotografías del ensayo de citotoxicidad.

CONDICIÓN	RESULTADO
1. Control sin naranjado de acridina y bromuro de etidio	
2. Control con naranjado de acridina y bromuro de etidio	
3. Células con tratamiento (tocotrienoles de palma) y con naranjado de acridina y bromuro de etidio	

Con los resultados obtenidos podemos discutir que en el experimento uno, donde las células control se encuentran sin naranjado de acridina y bromuro de etidio, podemos visualizar células que presentan intacta su membrana y la imagen no

presenta coloración debido a la falta de los reactivos. En el experimento 2 se visualiza un control, es decir células TIB-223-ATCC sin tratamiento, en donde se observan células vivas teñidas de verde con la membrana intacta ya que el anaranjado de acridina tiñe a células vivas de un color verde, mientras que el bromuro de etidio las tiñe de color rojo a las células muertas, sin embargo, las pocas células rojas que se visualizaron en la imagen, son células muertas, estas se vieron afectadas durante el procedimiento del ensayo de anaranjado de acridina. Finalmente, en la última condición se observan células con tratamiento (tocotrienoles de palma [4.3 µg/ml]) donde se observan que hay más presencia de una coloración roja que verde, de igual manera se puede observar que las células muestran núcleos fragmentados y condensados, lo que indica que las células se encuentran en un estado apoptótico tardío.

CONCLUSIÓN.

Una vez finalizada mi estancia de seis meses en el Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” en el laboratorio de enfermedades neuromusculares con la doctora Laura Sánchez Chapul, puedo mencionar que no concluí totalmente el proyecto debido a que mi estancia solo fue de seis meses, sin embargo, los resultados recopilados nos permitieron reportar que los tocotrienoles de palma presenta un efecto citotóxico a células de cáncer, de igual manera nos permitió empezar una nueva investigación para buscar MHC (cadena pesada de miosina) en los músculos de los ratones a los que se les administraron los suplementos. Mi estancia en el Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” fue grata y enriquecedora tanto en conocimientos como profesionalmente, me permitió aplicar mis conocimientos adquiridos durante mi carrera y adquirir nuevos conocimientos que aplicare profesionalmente.

REFERENCIAS.

1. Abdullah, A., Atia, A., Salem Alrawaiq, N., Kamil Md Yusof, M. y Fadzli Rusli, M. (2022). Tocotrienoles del aceite de palma en la quimiopreención y el tratamiento del cáncer. IntechAbierto.
2. Ahmed SA, Mendonca P, Elhag R, Soliman KFA (2022). Anticancer Effects of Fucoxanthin through Cell Cycle Arrest, Apoptosis Induction, Angiogenesis Inhibition, and Autophagy Modulation. Int J Mol Sci.17;23(24): pág.1691.

3. Atashrazm F, Lowenthal RM, Woods GM, Holloway AF, Dickinson JL. (2015). Fucoïdan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Mar Drugs*.13(4):2327-46.
4. Ferguson JL, Turner SP. (2018). Bone Cancer: Diagnosis and Treatment Principles. *Am Fam Physician*. 98(4). Pág. 205-213.
5. Gómez A. (2019). Errores en los hemogramas automatizados: los interferentes y sus correcciones. Capítulo 7. Pág. 317 a la 319.
6. Maldonado. M, & Jorrín J. (2016). Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. Pág. 1-6.
7. Lin, Y., Qi, X., Liu, H. *et al.* (2020). The anti-cancer effects of fucoïdan: a review of both in vivo and in vitro investigations. *Cancer Cell Int* .20(154). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01233-8>.

ANEXOS

DIAGRAMA 1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CRECIMIENTO.

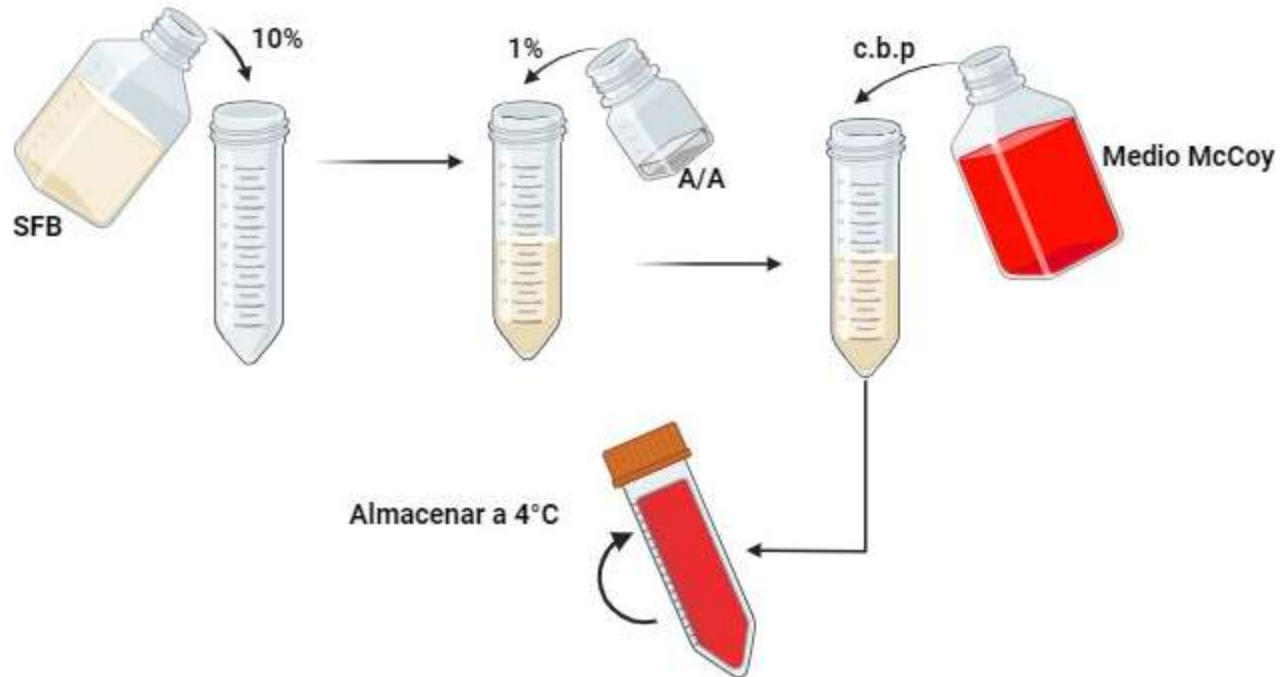


DIAGRAMA 2. CONGELACIÓN DE CÉLULAS TIB-223-ATCC.

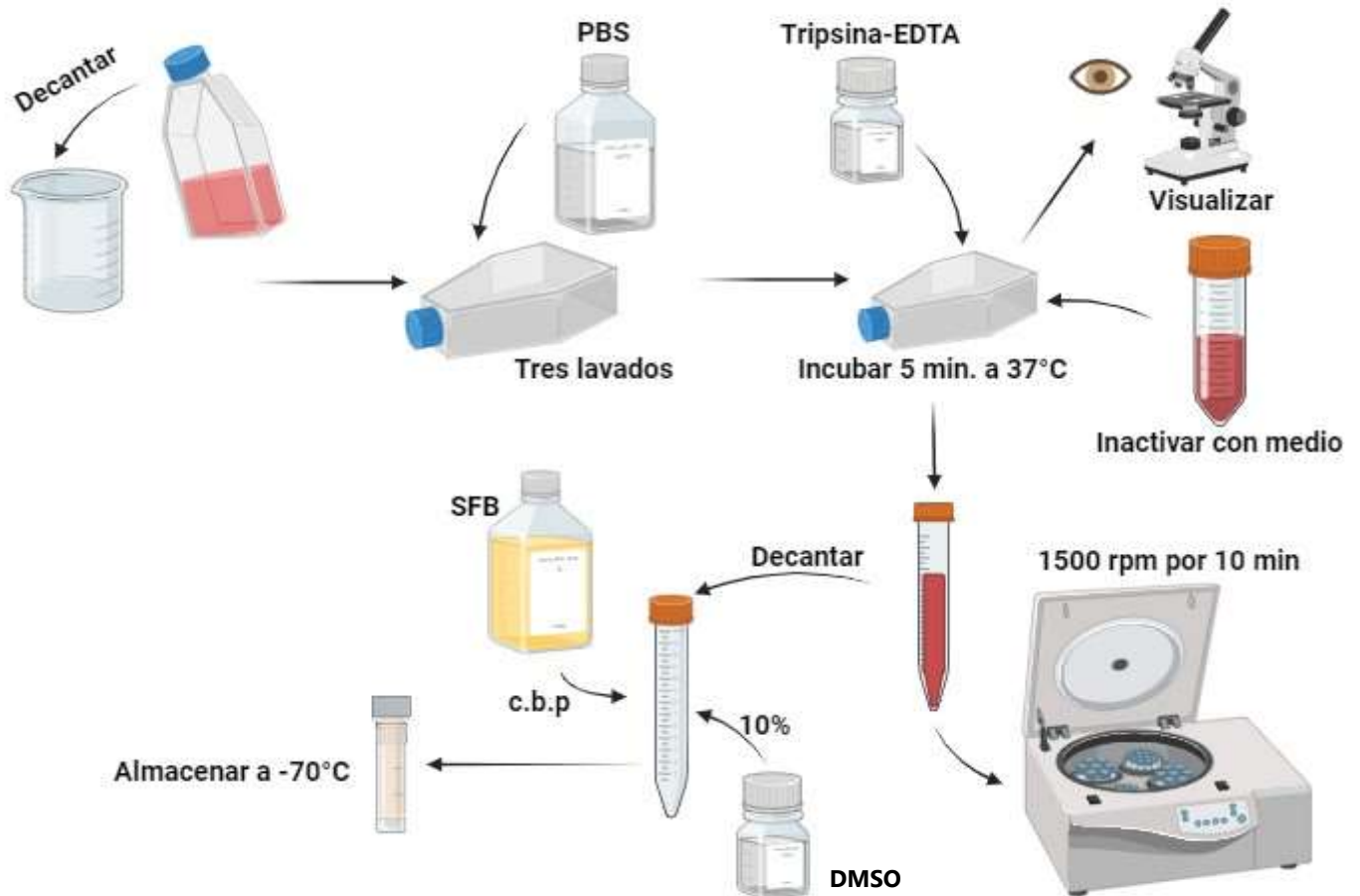


DIAGRAMA 3. DESCONGELACIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS TIB-223-ATCC.

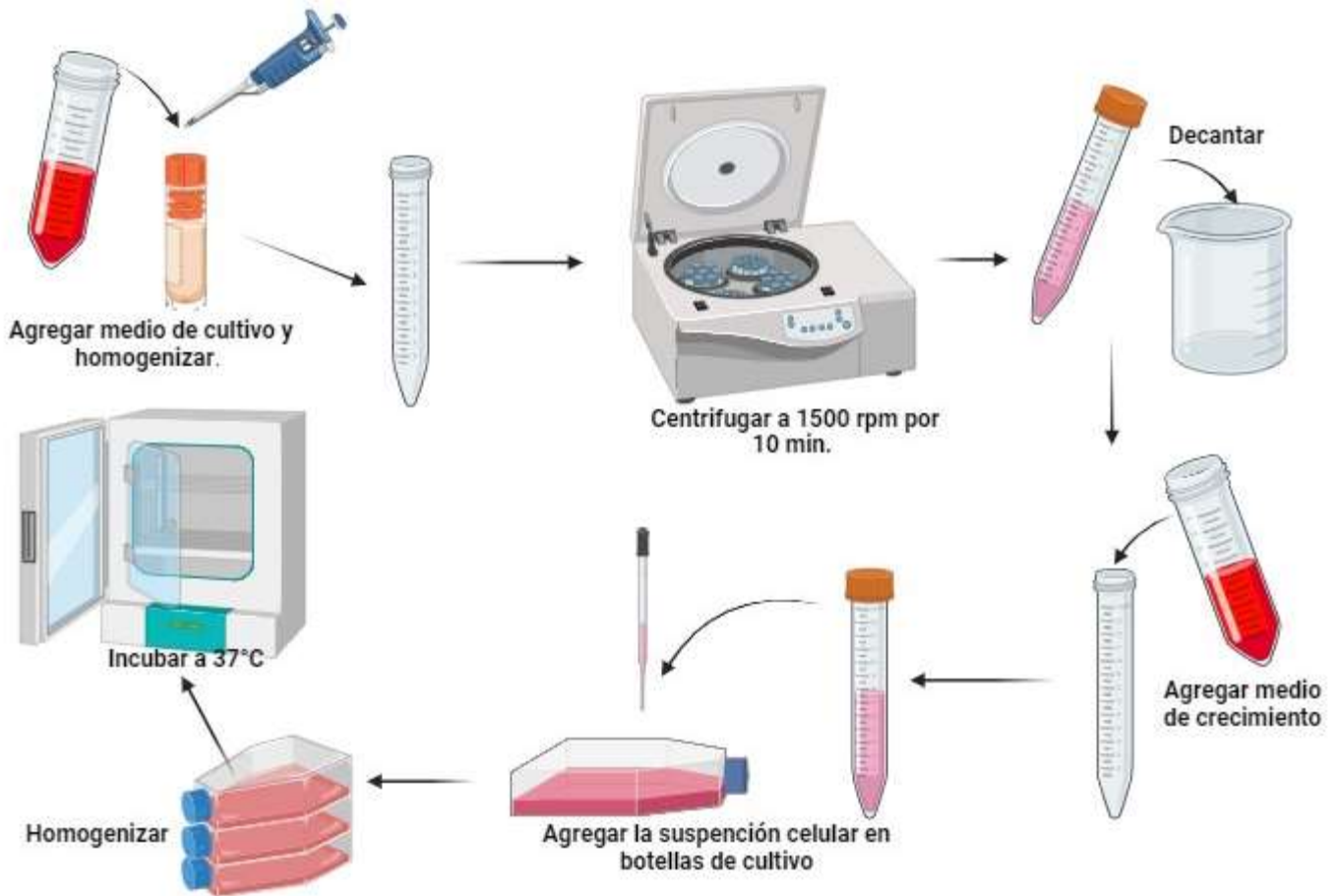


DIAGRAMA 4. SIEMBRA DE CÉLULAS TIB-223-ATCC.

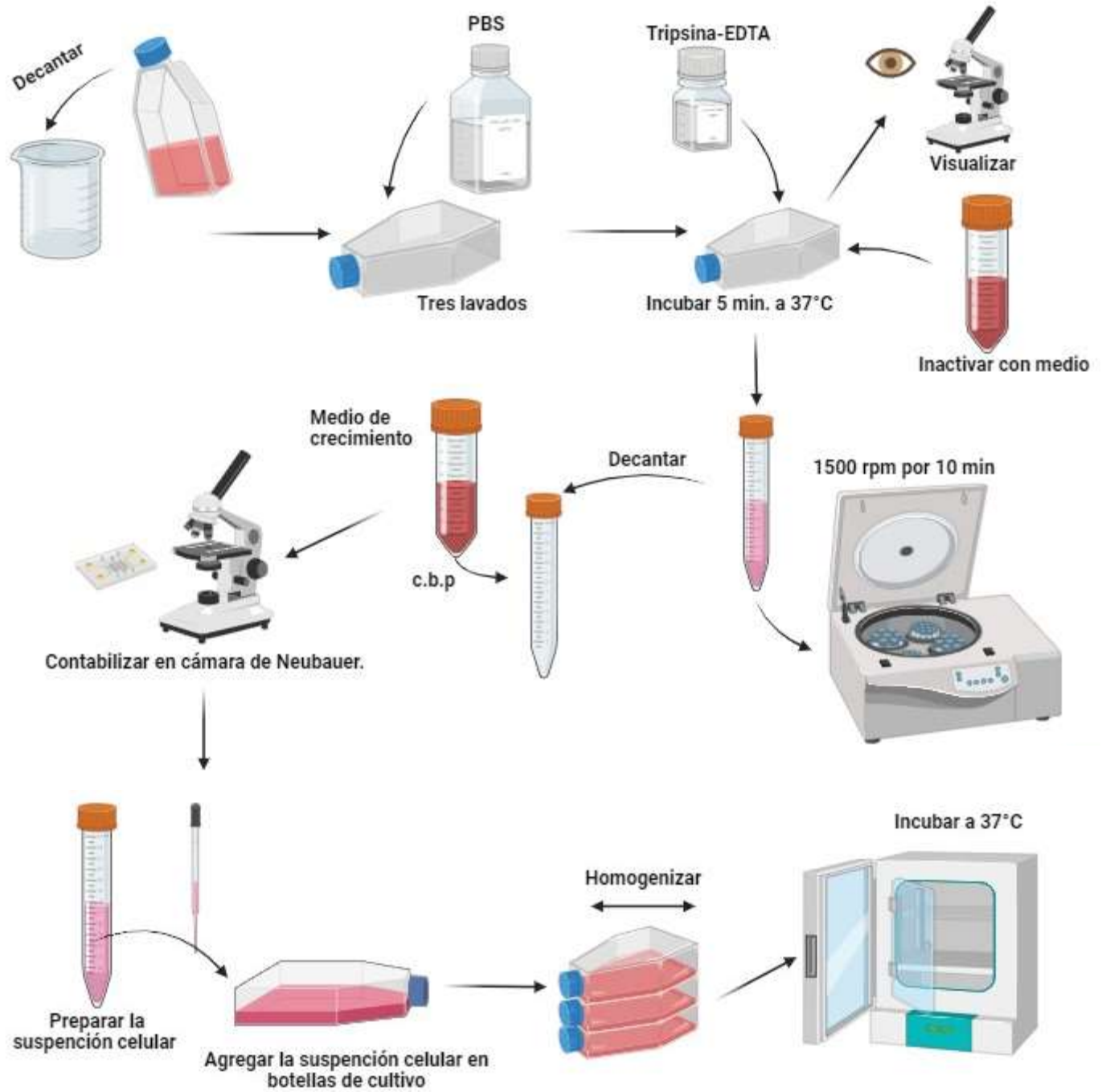
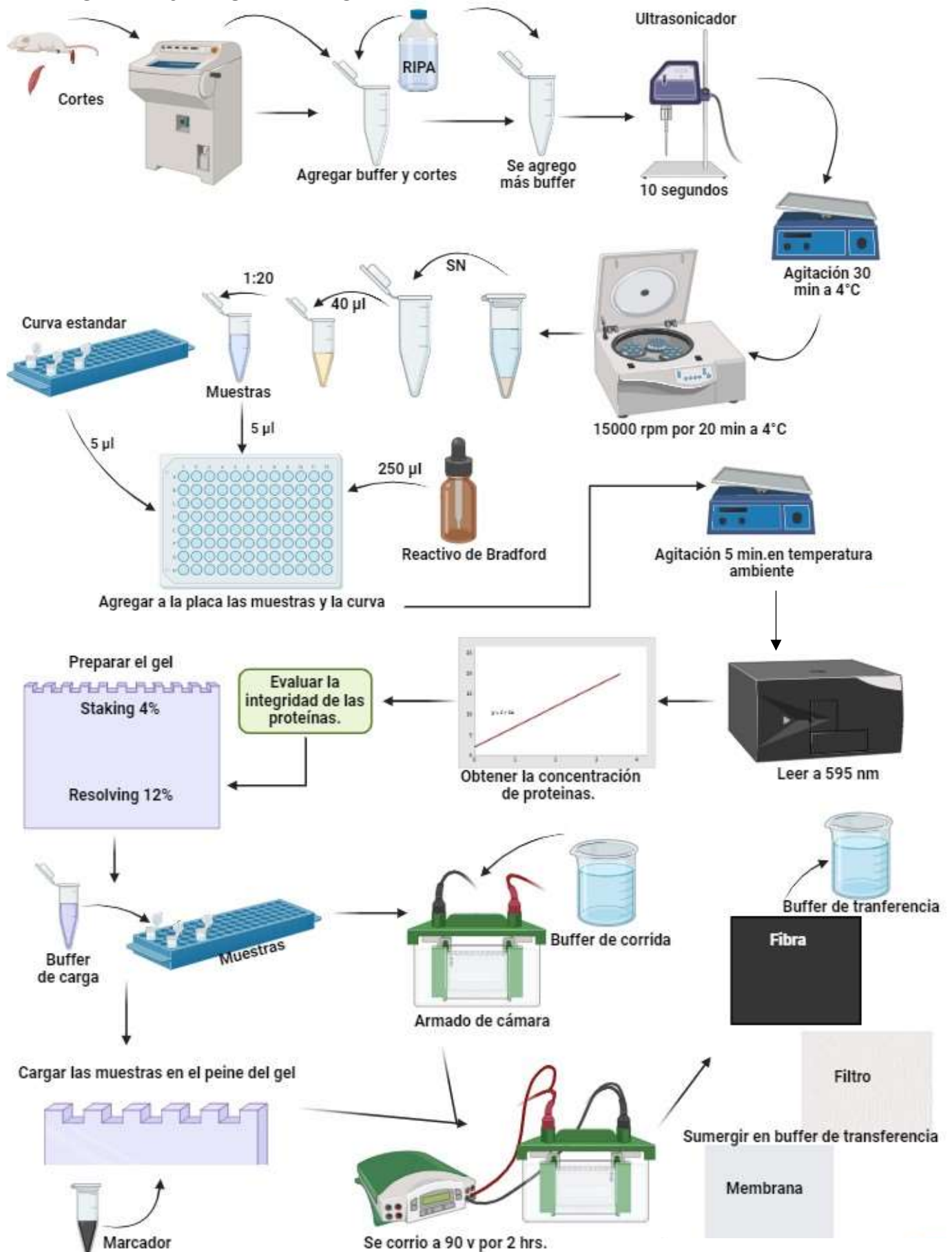


DIAGRAMA 5. WESTERN BLOT.



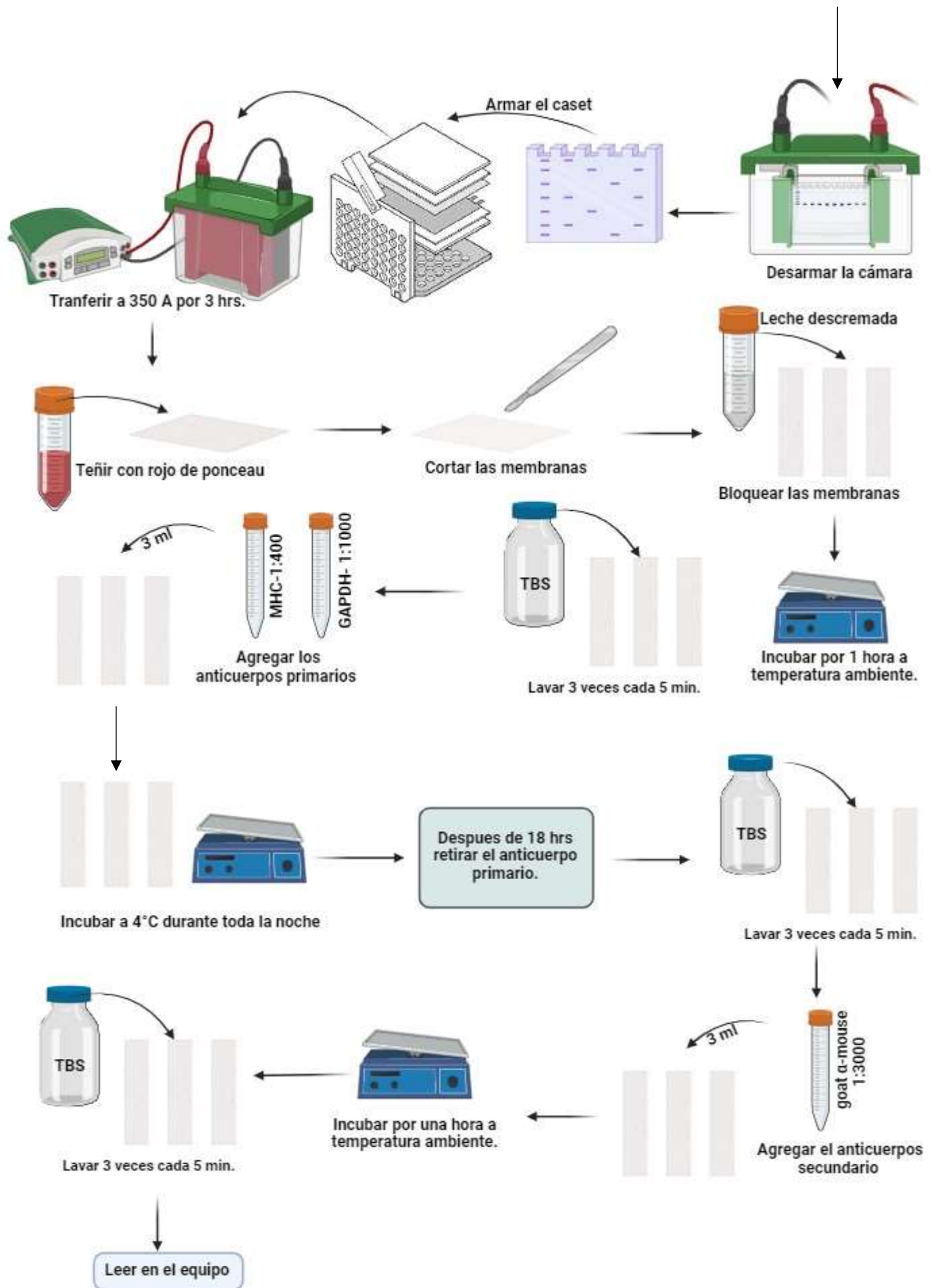
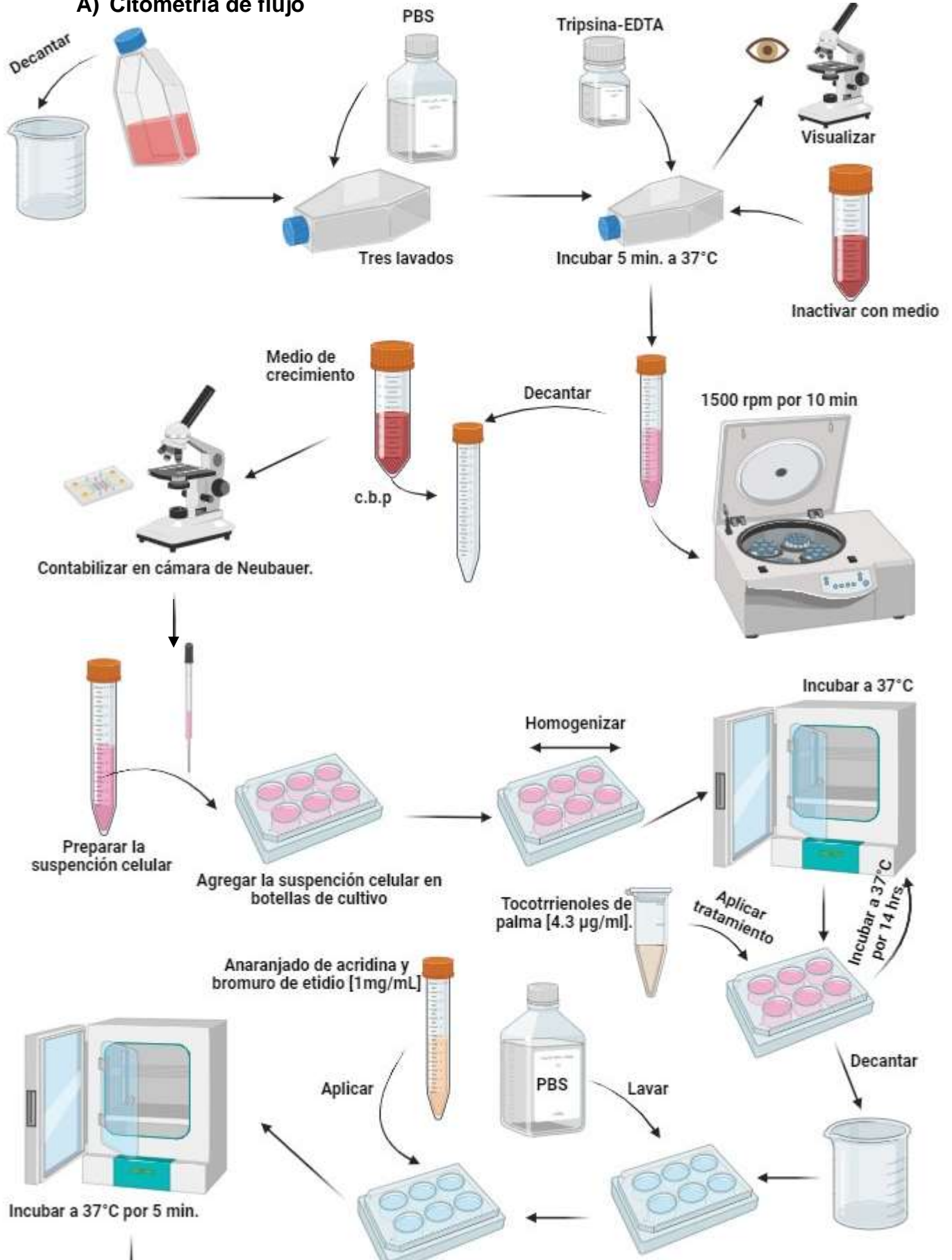
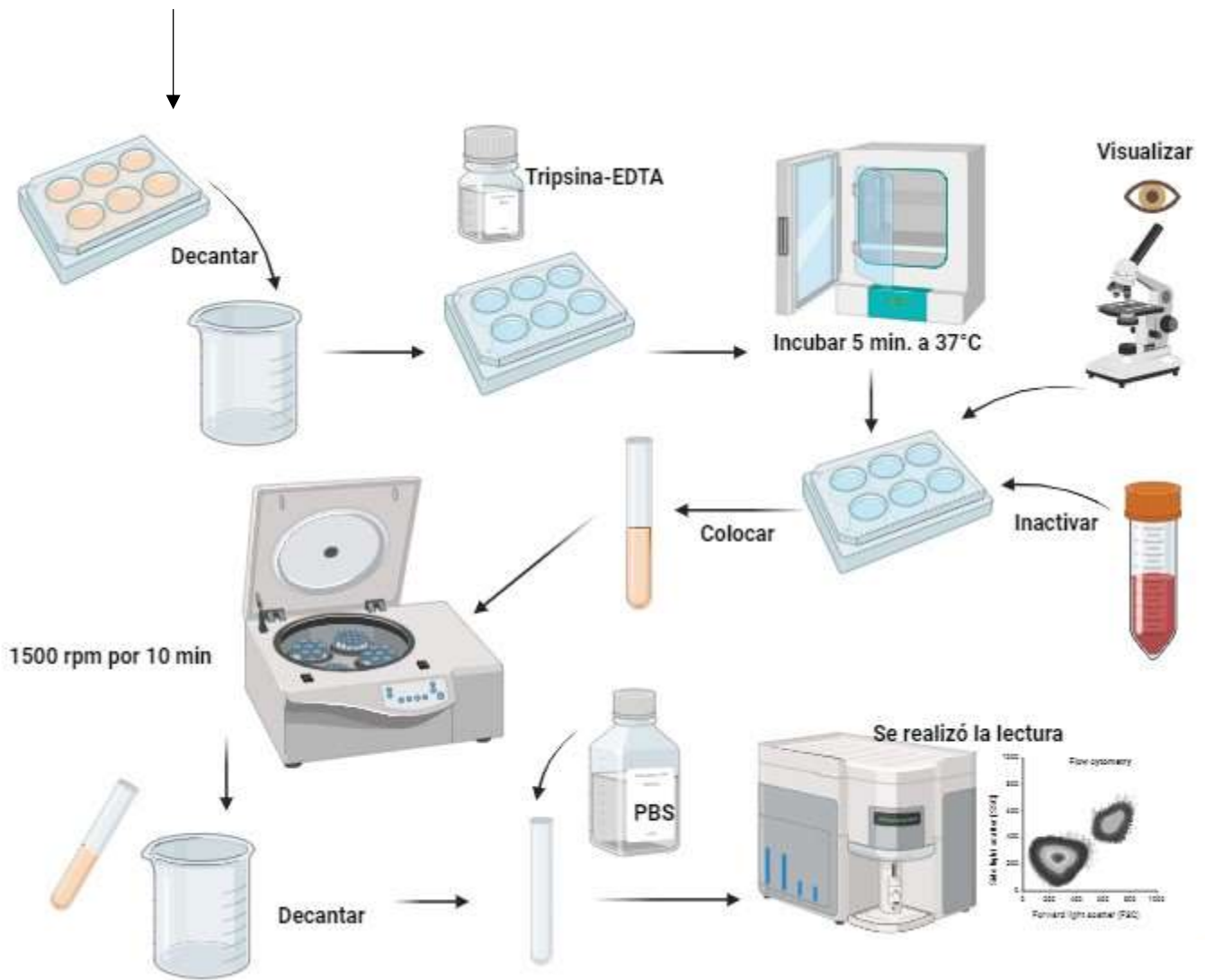


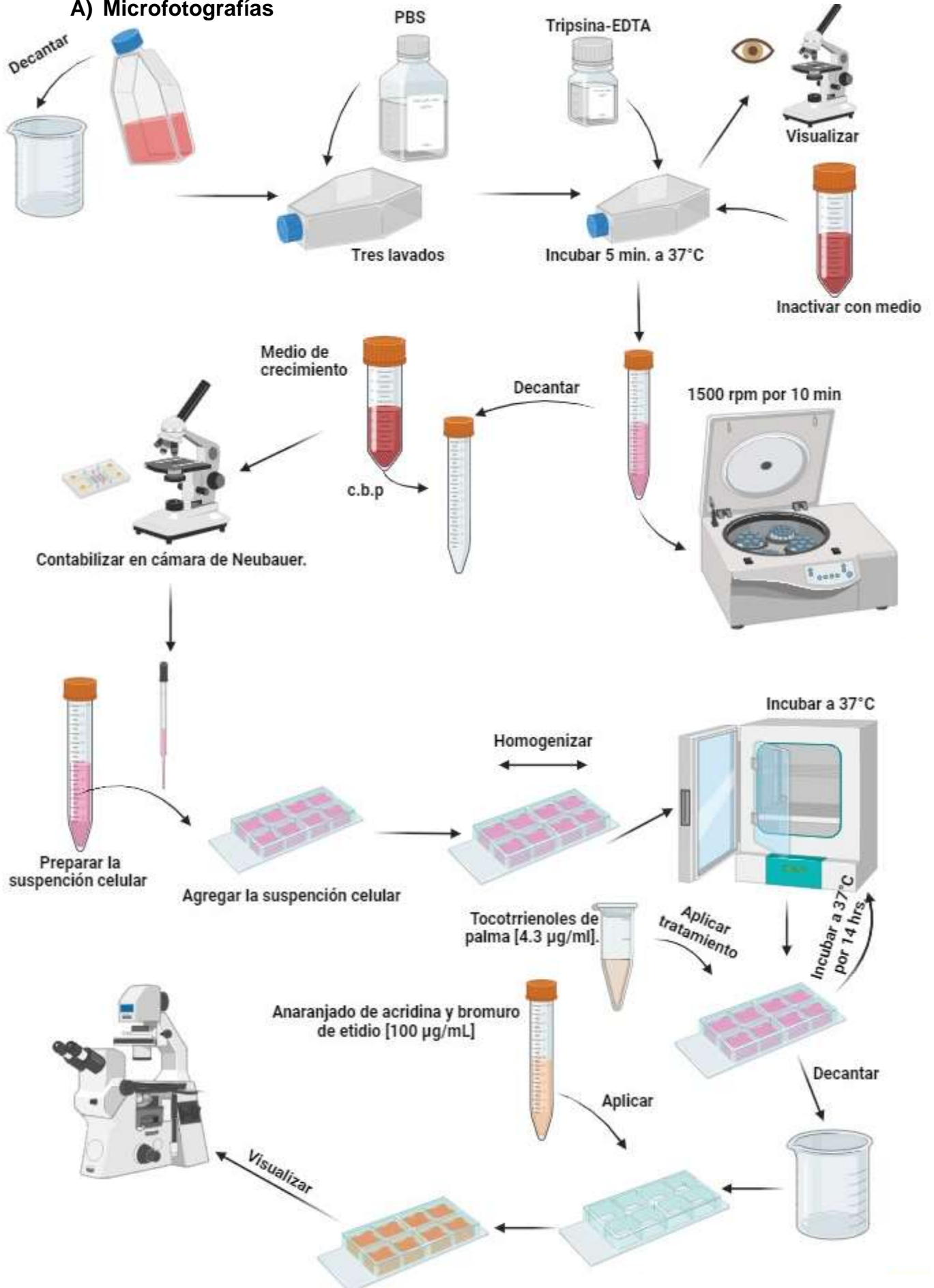
DIAGRAMA 6. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

A) Citometría de flujo





A) Microfotografías





Asesor externo.

Dra. Laura Sánchez Chapul



Asesor interno.

Mtra. Patricia Martínez Cruz



Alumna.

Ariadna Ximena Palacios Bautista