

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Desarrollo tecnológico y generación de riqueza sustentable

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

Ingeniería en Biotecnología



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

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

Expresión, aislamiento y caracterización de la glucosa oxidasa (GOD) recombinante de

Aspergillus niger* en *Pichia pastoris

Segundo periodo; clonación de *god* en el plásmido pPIC9K

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

[Ingeniería en Biotecnología. Alejandro Saldaña Jauregui]

Profesor PAP: David José Mendoza Aguayo

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre de 2019

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	2
1. Introducción.....	3
1.1. Objetivo	3
1.2. Justificación	3
1.3 Antecedentes.....	4
1.4. Contexto	6
2. Desarrollo	7
2.1. Sustento teórico y metodológico	7
2.2. Planeación y seguimiento del proyecto	9
3. Resultados del trabajo profesional.....	4
4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto	2
5. Conclusiones.....	3
6. Referencias	3
6. Anexos (en caso de ser necesarios).....	5

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.

A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El automonitoreo del nivel de glucosa en pacientes diabéticos es vital para mantener un adecuado control de la enfermedad. En la actualidad las herramientas y dispositivos disponibles son inconvenientes e inaccesibles para la mayor parte de los pacientes diabéticos en México; atender este problema es de suma importancia, ya que se destina alrededor del 2.25% del PIB anual a la atención de complicaciones relacionadas con la enfermedad por un control inadecuado, más que lo que se destina a investigación y desarrollo en ciencia.

Atender este problema es de suma importancia para el bienestar y salud de los pacientes diabéticos y de la economía mexicana. En el presente estudio se llevó a cabo la estandarización de la amplificación del gen de la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, y clonación en un vector tipo *shuttle* para la producción de un biosensor no invasivo de glucosa; dentro las ventajas y beneficios de esta enzima se encuentra que se puede utilizar para medir niveles de glucosa mediante la reacción de la oxidación de la glucosa a gluconato en diferentes fluidos extracorporales, ya que ésta puede trabajar dentro de los rangos de

los parámetros fisicoquímicos de la saliva, sudor, fluidos intersticiales y orina; además las enzimas de *A. niger* son reconocidas como GRAS por lo cual, la glucosa oxidasa de *A. niger* es una opción adecuada para lograr el propósito de este proyecto.

1. Introducción

1.1. Objetivo

Producir una enzima recombinante para fabricar un biosensor para el monitoreo no invasivo de los niveles de glucosa en pacientes diabéticos.

1.2. Justificación

La diabetes es una enfermedad crónica no transmisible (ECNT), en la cual, el cuerpo deja de producir insulina o no produce la insulina necesaria para que la glucosa sea aprovechada por las células, caracterizada por altas concentraciones de glucosa en la sangre. Existen dos tipos de diabetes, la Diabetes tipo I (D1) y la Diabetes tipo II (D2); en la D1 el cuerpo no produce insulina suficiente para llevar a cabo los procesos celulares normales y, en la D2 el cuerpo no produce insulina en lo absoluto o es incapaz de aprovechar la insulina producida por sus propias células pancreáticas (International Diabetes Federation, 2017; Programa Sectorial de Salud, 2014).

La D1 y la D2 son enfermedades complejas determinadas por múltiples factores genéticos y ambientales, acompañadas del riesgo de desarrollar complicaciones crónicas macrovasculares y microvasculares que ponen en riesgo la salud de los pacientes con este padecimiento por un inadecuado seguimiento de la enfermedad. El automonitoreo de los niveles de concentración de glucosa en la sangre de los pacientes con diabetes es indispensable para el control y tratamiento oportuno y adecuado de la enfermedad, en especial para los diabéticos insulino dependientes.

En la actualidad los métodos y dispositivos disponibles en el mercado requieren de procedimientos incómodos y molestos para los pacientes; para un monitoreo adecuado se requieren de cuatro mediciones diarias de acuerdo con recomendaciones de la Asociación Americana de Diabetes (Federación Mexicana de Diabetes, 2015), para lo cual se requiere consumibles cuyo precio no es accesible para muchos pacientes diabéticos, ya que es necesaria una inversión anual de 5 meses de salarios mínimos para cumplir con las

mediciones diarias necesarias para un control riguroso de la enfermedad (Federación Mexicana de Diabetes, 2019), lo cual es un impedimento para muchos pacientes, ya que en México; a medida que un individuo transita a condiciones de vida con más privaciones sociales, más alta es la probabilidad de que ese individuo sea diabético y viva en las zonas rurales del país (Ramírez & de la Sota Riva, 2018).

El principal costo de la diabetes deriva del tratamiento de sus complicaciones, principalmente aquellas provocadas por la nefropatía diabética, más del 50% de dicho costo es cubierto por los pacientes, seguido de las instituciones de seguridad social y, finalmente, las instituciones para pacientes no afiliados al sistema de salud pública; del total de las personas diagnosticadas con diabetes el 14.2% dijo no haber acudido al médico para su control en el último año y de estos, 27.5 % no cuentan con protección en salud, 13% pertenecen al Seguro Popular, 11 % a al sistema de seguridad social y 4 % cuentan con seguro privado (Fundación MÍDETE, 2016). Por cada \$100 MXN que se erogan en el tratamiento y atención de la diabetes en México, aproximadamente \$51 MXN provienen de los ingresos personales y familiares (Fundación MÍDETE, 2016), en promedio, el costo del tratamiento completo para un paciente sin control, con complicaciones es de \$1'163,028–2'000,000 MXN al año y para un paciente en control es de \$88,024 - \$93,000 MXN al año, cuando el ingreso promedio anual del paciente es de aproximadamente \$180,000 MXN al año (**Anexo 1**), lo que imposibilita un tratamiento adecuado en ambos casos cuando existen restricciones económicas (Federación Mexicana de Diabetes, 2019; Fundación MÍDETE, 2016).

1.3 Antecedentes

En el mercado existen tres tipos de dispositivos para el monitoreo de los niveles de glucosa basados en la reducción de la glucosa; los de automonitoreo para el control de la glucosa, que emplean una muestra de una gota de sangre (SMBGs, por sus siglas en inglés), disponible en una amplia gama de marcas y modelos, los medidores continuos del nivel de glucosa (CGMs, por sus siglas en inglés), que usualmente son subcutáneos y requieren de ser implantados por un profesional médico y los no invasivos, que miden en otro tipo de tejidos y fluidos sin la necesidad de dañar físicamente al paciente (**Tabla 1**) (Preece, 2017).

Tabla 1. Comparación entre los diferentes tipos de glucómetros disponibles en el mercado (Preece, 2017).

Tipo de glucómetro	Características principales	Ventajas	Desventajas
SMBG	Muestra de sangre en tira reactiva, medible en dispositivo	Costo de inversión inicial relativamente bajo Portable Sencillo y fácil de usar Resultados instantáneos Alta disponibilidad	Dolor en las yemas de los dedos provocado por mediciones constantes Costo de tiras reactivas Disponibilidad de tipos especiales de tiras reactivas Efecto de factores externos afectando la precisión
CGM	Subcutáneos	Mediciones continuas durante todo el día Permiten conocer el perfil de la concentración de glucosa en cada paciente No requieren de tiras reactivas	Requieren de ser implantados bajo la piel Requieren de algunas mediciones de calibración Baja disponibilidad
No invasivos	No requieren de ser implantados	No requieren de toma de muestra por el paciente No requiere de tiras reactivas	Continúan en fase de investigación y desarrollo No disponibles

Dado a que las complicaciones de la diabetes tienen origen en un monitoreo nulo o pobre, es importante desarrollar una herramienta que permita determinar la concentración de glucosa en el paciente de forma sencilla, fácil de usar, sin molestias (no invasiva), puntual y accesible, cumpliendo o superando los estándares y límites de detección de los medidores de glucosa convencionales; referente a lo anterior, existe un estándar internacional para el diseño de sensores de glucosa que es la norma ISO 15197:2013 (Preece, 2017) y la glucosa puede ser determinada en otros fluidos además de la sangre con rangos conocidos para personas diabéticas (**Tabla 2**), además, ya existen algunas aproximaciones en donde se emplean este tipo de fluidos para monitorear glucosa u otros analitos (**Anexo 2-9**).

Tabla 2. Resumen de las concentraciones de glucosa promedio en diferentes tipos de fluidos corporales para diabéticos y no diabéticos (El tiempo de retardo se refiere al tiempo requerido para la difusión de la sangre de los capilares a los tejidos) (Jang & Xu, 2018)

Fluido	Concentración de glucosa en no diabéticos (mmol/L)	Concentración de glucosa en diabéticos (mmol/L)	pH	Tiempo de retardo (min)
Sangre	3.89-7.22	2.00-40.00	7.35-7.45	0
Fluido intersticial	3.61-6.56	1.99-22.22	7.20-7.40	~10
Orina	0.60-1.51	2.78-5.56	4.50-8.00	~20
Sudor	0.06-0.11	0.01-1.00	4.60-6.80	~20
Saliva	0.23-0.57	0.55-1.77	6.20-7.40	~15
Fluidos oculares	0.10-0.50	0.50-5.01	6.50-7.50	~10

De acuerdo con un estudio de los retos técnicos para la determinación de glucosa, el criterio de aceptación en la desviación del desempeño de un glucómetro convencional referente a una prueba de laboratorio comparativa para el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) para muestras con una concentración inferior a 3.3 mmol de glucosa/L es de $\pm 25\%$ y para muestras con una concentración superior a 3.3 mmol de glucosa/L es de $\pm 25\%$, cuando la norma ISO 15197:2013 establece que el 95% de los resultados debe de tener desviación del desempeño de ± 0.83 mmol de glucosa/L para muestras con una concentración inferior a 4.2 mmol de glucosa/L y de $\pm 20\%$ para muestras con una concentración superior (Tonyushkina & Nichols, 2009).

1.4. Contexto

En México existen más de 12 millones de adultos de entre 20 a 79 años, 26 mil niños de 0 a 19 años y alrededor de 4.5 millones de adultos no diagnosticados con algún tipo de diabetes, ocupando el quinto lugar mundial con prevalencia a dicha condición (International Diabetes Federation, 2017). Se ha estimado que la carga económica de la diabetes para la economía Mexicana fue de 362,859.82 millones de pesos para el año 2013, es decir 2.25% del PIB de ese mismo año (1.11% en costos directos y 1.14% en costos indirectos), creciendo a un ritmo más acelerado que la economía del país, la cual creció en contraste 2.1% al cierre del 2014 (Barraza-Lloréns, y otros, 2015); el 87% de los costos directos de la diabetes son

para el tratamiento de las complicaciones de la enfermedad, mientras que los costos indirectos son provocados por pérdida de ingresos y productividad a nivel nacional (Fundación MÍDETE, 2016).

En el 2016 el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) de la Secretaría de Salud (SS) de México emitió por primera vez una Declaratoria de Emergencia Epidemiológica por el incremento en las cifras del diagnóstico de D1 y D2, con base en datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENASUT) del 2012.

2. Desarrollo

2.1. Sustento teórico y metodológico

Los biosensores son dispositivos sensibles a cambios químicos en el entorno, a los cuales se encuentra acoplado un elemento biológico de reconocimiento a un transductor de señal para permitir el análisis cuantitativo de un parámetro biológico; los biosensores deben de cumplir con las siguientes características: el sensor debe de ser preciso, exacto y tener una alta sensibilidad de forma reproducible y proveer de análisis en tiempo real, así mismo, el comportamiento de la medición de diferentes concentraciones de analito debe de ser lineal, debe de ser pequeño, portable, biocompatible, accesible y debe de poder ser utilizado por cualquier usuario medianamente calificado, por otro lado, el analito a medir debe ser específico y estable bajo condiciones normales de almacenamiento, además, de un pretratamiento mínimo o nulo; los biosensores se encuentran compuestos por dos elementos principales: el biodetector y el transductor (**Anexo 10**) (Malhotra & Chaubey, 2003).

La glucosa oxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de D-Glucosa a D-gluconolactona, liberando peróxido de hidrógeno y electrones al medio que pueden ser empleados para determinar la concentración de glucosa en un fluido (**Anexo 11**), mediante una relación estequiométrica equimolar (Wong, Wong, & Chen, 2008). Una enzima apropiada para el diseño de un biosensor que cumpla con las características para la determinación de glucosa bajo las condiciones previamente mencionadas (**Tabla 1**) es la glucosa oxidasa (GOD) del hongo filamentoso *Aspergillus niger*, ya que tiene una actividad específica a la glucosa en

un rango de temperaturas de 25 a 37°C, pH de 2.0 a 7.0 y constantes de afinidad al sustrato de 25 mmol de glucosa /L (Wong, Wong, & Chen, 2008), además las propiedades y parámetros cinéticos de la enzima se encuentran ampliamente estudiados y las enzimas *A. niger* son generalmente reconocidas como seguras (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (Schuster, Dunn-Coleman, Frisvad, & Van Dijck, 2002), siendo una enzima adecuada para la propuesta del proyecto. Sin embargo, a pesar de que la enzima GOD puede ser la apropiada para el diseño del biosensor, producir la enzima a escala industrial mediante *A. niger* reduciría la viabilidad económica del proyecto, ya que a escala industrial los rendimientos son bajos, hay presencia de enzimas co-contaminantes y el proceso de separación es complicado y costoso (Zhanjun, y otros, 2016), esto es un aspecto importante, ya que del 70 al 80% del costo de un bioproducto se encuentra directamente relacionado con el proceso de separación, mientras más se acumulan etapas de separación, menor es el rendimiento y mayor es el costo de producción (Tejeda, Montesinos, & Guzmán, 2011).

Ya que la aplicación de la enzima es de grado farmacéutico, se requiere de un grado de pureza superior al 99%, lo que implica múltiples etapas de separación y refinamiento, por lo que se requiere optar por otra estrategia para la producción de la enzima; como alternativa de mejora, se puede producir la proteína vía recombinante con una cepa de algún microorganismo con altas densidades celulares y altos rendimientos productivos. Para lograr garantizar un bajo costo de producción se sugiere emplear *Pichia pastoris* SMD1168, ya que es una cepa auxotrófica ($\Delta his4$), carente de proteasas celulares (*pep4*) con altas densidades en cultivo y rendimientos de cultivo de proteína recombinante del orden de g/L (Invitrogen, 2006), además, existen sistemas de expresión diseñados para esa cepa en específico que permiten la integración de múltiples copias del gen de interés en el genoma de la levadura, bajo la regulación del promotor AOX1, inducible con metanol, mediante un vector de expresión integrativo multicopias pPIC9K (**Anexo 12**), lo que permite controlar el momento de la síntesis del producto de interés (Invitrogen, 2006).

Para lograr el objetivo planteado, se requiere primero de aislar el gen que codifica para el gen de GOD mediante PCR, en el diseño de la estrategia experimental, se diseñó los *primers*

para la amplificación del gen, con regiones homólogas al vector de expresión (**Anexo 13**), para insertar el gen en el sitio múltiple de clonación por *overlap extension* PCR, facilitando así el proceso, sin la necesidad de utilizar enzimas de restricción o de ligación (Bryskin & Matsumura, 2010). Primero se amplifica el inserto con *primers* quiméricos, para que el producto final de PCR posea regiones complementarias al vector. En seguida, el vector y el inserto son mezclados, desnaturalizados e hibridados; el inserto hibridado es posteriormente amplificado por la DNA polimerasa Phusion usando el vector como hebra molde, hasta que la polimerasa alcanza el extremo 5' del inserto. Después de varios ciclos de PCR, el nuevo plásmido posee dos cortes (uno en cada hebra) y se acumula como producto. El nuevo plásmido puede ser transformado en *E. coli*, después de que la hebra molde es degradada por digestión con DpnI (Bryskin & Matsumura, 2010) (**Anexo 13**).

2.2. Planeación y seguimiento del proyecto

El propósito de este proyecto es producir un microorganismo capaz de sintetizar la enzima glucosa oxidasa (GOD) de *Aspergillus niger*, para lo cual se requirió de diseñar, validar, ejecutar y estandarizar la metodología experimental que contempla diferentes etapas de laboratorio divididas en los siguientes bloques:

- Amplificación del gen de GOD.
- Purificación del gen de GOD.
- Clonación del gen de GOD en vector pPIC9K por *overlapping* PCR.
- Transformar *Escherichia coli* con vector pPIC9K-GOD.
- Identificar y aislar transformantes de *E. coli* pPIC9K-GOD.
- Análisis de resultados y discusión.

Dado a que la dependencia de la ejecución de tareas es lineal y a la disponibilidad de recursos, espacios y tiempos, se limitó el alcance del objetivo hasta la clonación del gen de GOD en el vector pPIC9K para finales del periodo de primavera 2019. Para lograr el objetivo del proyecto se dedicó 16 h a la semana durante 16 semanas en la siguiente disponibilidad de horarios:

- Lunes de 09:00 a 13:00 horas.
- Martes de 16:00 a 20:00 horas.
- Miércoles de 09:00 a 13:00 horas.
- Jueves de 13:00 a 18:00 horas.

Se dio seguimiento puntual del proyecto cuando se requirió la validación de las estrategias experimentales, así como para el análisis de resultados para realizar modificaciones y cambios de ser necesario y para proceder con la siguiente etapa experimental. Las metodologías y registro de las actividades y de las observaciones se encuentran en los **Anexos B, O, C**.

Para la amplificación del gen de GOD se llevó a cabo la amplificación del gen *god* de *A. niger* Z-25 por TD PCR en un termociclador Aeris (ESCO, Singapur), las mezclas de reacción se prepararon de acuerdo con las especificaciones del manual de la DNA polimerasa *Phusion* (ThermoFisher Scientific, EUA) y *TaKaRa* (TaKaRa Bio, EUA) (**Tabla 3-4, Figura 1**) y se elaboró el termograma de acuerdo las condiciones de optimización de la PCR del gen de GOD (O6) (**Anexo B, Reporte PAP I**).

Tabla 3. Master Mix para amplificación del gen de GOD por PCR.

Componente	50 µL rxn <i>Phusion</i>	50 µL rxn <i>TaKaRa</i>	Concentración Final
dH ₂ O		Hasta alcanzar volumen de 50 µL	
Búfer <i>Phusion</i> HF 5X 10X PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	10 µL Buffer HF	5 µL 10X PCR Buffer	1X
dNTPs 10 mM	1 µL	1 µL	200 µM cada uno
Primer Forward	1 µL	1 µL	5×10 ⁻⁹ µM
Primer Reversa	1 µL	1 µL	5×10 ⁻⁹ µM
Hebra molde	2 µL	2 µL	50 ng
DNA Polimerasa <i>Phusion/TaKaRa</i>	0.5 µL <i>Phusion</i>	0.25 µL <i>TaKaRa</i>	0.02 U <i>Phusion</i> /µL 1.25 U <i>TaKaRa</i> /µL

Tabla 4. Condiciones para PCR del gen de GOD.

Paso del ciclo	Temperatura (°C)	ΔT (°C/Ciclo)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98		1 min	1
PCR	Desnaturalización	98	30 s	21
	Hibridación	76	45 s	
	Extensión	72	1 min	
	Desnaturalización	98	30 s	30
	Hibridación	61	1 min	
	Extensión	72	1 min	
Extensión final	72		10 min	1
	4		∞	

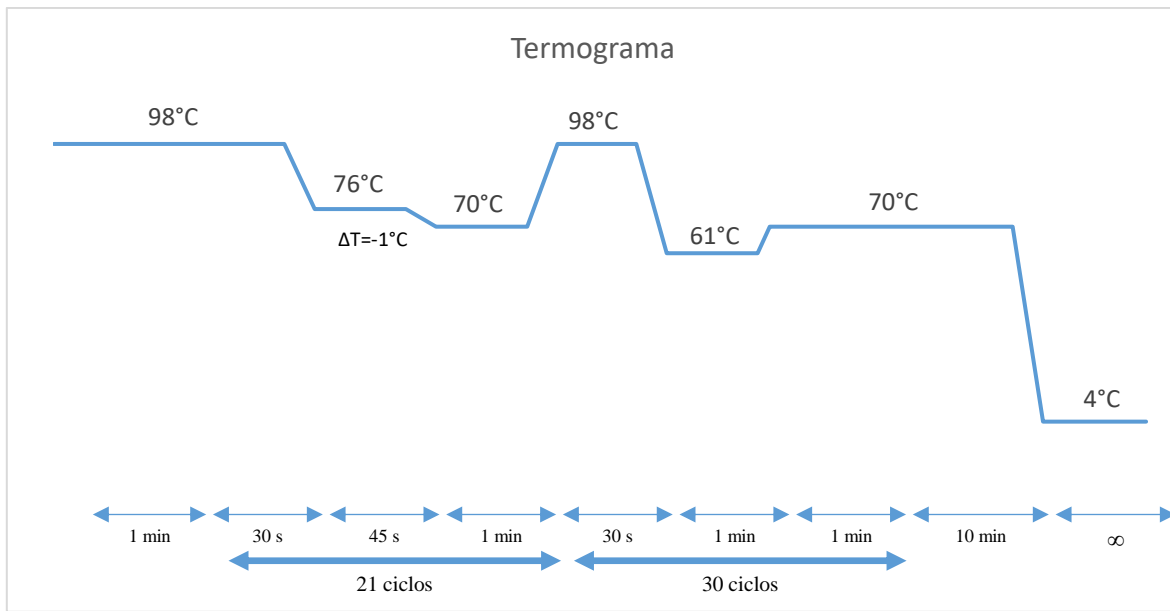


Figura 1. Termograma de la reacción de amplificación de *god* por PCR.

Para llevar a cabo la determinación cualitativa de ácidos nucleicos llevó a cabo la separación de ácidos nucleicos por electroforesis en gel de agarosa grado biología molecular (Bio-Rad, EUA) al 0.7% (p/v) con buffer TAE 1X (Tris 40 mM, Ácido Acético Glacial 20 mM, 2 mM EDTA), posteriormente se llevó a cabo la corrida a 120 V durante 35 minutos con la carga de un marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Plus (Thermo Scientific, 2016) en uno de los pocillos y las respectivas muestras, en una cámara de electroforesis con TAE 1X como fase móvil y una vez terminada la corrida se reveló el gel en un fototocumendador Gel Doc XR+ (Bio-Rad, EUA) con un filtro XcitaBlue™ Conversion Screen (Bio-Rad, EUA) y se evaluó con el software Image Lab 6.0 con la aplicación de ácidos nucleicos SYBR safe.

Para la purificación del producto de la amplificación para separar el gen de los *primers* y de los componentes residuales de la mezcla de la reacción de PCR se empleó un kit de purificación comercial NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Alemania). Se pesó y rotuló un microtubo de 2 microlitros por cada muestra y se registró, posteriormente se separó el fragmento de DNA de interés por electroforesis en gel de agarosa <2 % (p/v) y en condiciones de seguridad se escindió la banda de interés del gel, minimizando el tiempo de exposición a luz UV, y se colocó en un microtubo. Se pesó el fragmento y se verificó que su peso sea inferior a 200 mg, se ajustó en caso de ser necesario. Se adicionó 200 µL de buffer

NTI por cada 100 mg de muestra y se incubó en un termobloque Dry Block Heater 1 (IKA, China) a 50°C durante 10 minutos, homogenizando la muestra en vórtex cada 2 minutos. Se colocó una columna NucleoSpin® nueva en un microtubo de 2 mL y se adicionó la muestra (máx 700 µL), se centrifugará a 11,000 g durante 30 s, se retiró la columna del microtubo cuidadosamente y se descartó el eluyente, se colocó de nuevo la columna en el microtubo y se adicionó 1 volumen equivalente de buffer NT3, se centrifugó la muestra a 11,000 g durante 30 s, se retiró la columna cuidadosamente del tubo y se descartó el eluyente, posteriormente, se centrifugó de nuevo la muestra a 11,000 g durante 30 s y se colocó la columna en un microtubo nuevo de 1.5 mL, en seguida, se incubó en un termobloque Dry Block Heater 1 (IKA, China) a 70°C de 2-5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó 30 µL de buffer NE a 70°C y se incubó de nuevo la muestra a 70°C durante 5 minutos, luego, se centrifugó de 30 a 50 g durante 1 minuto y, para posteriormente centrifugarla de nuevo a 11,000 g durante 1 minuto. Finalmente se retiró la columna y se almacenó la muestra a -15°C hasta su posterior uso.

Para la determinación de la concentración de DNA en las muestras por espectrofotometría se empleó la microplaca µDrop Plate (ThermoFisher Scientific, EUA). Primero se encendió el equipo Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, EUA) y se conectó a una computadora portátil para cargar el programa SkanIt® Software para actualizar las propiedades de la trayectoria de los pocillos de la microplaca de acuerdo con la documentación del equipo. Posteriormente se corroboró el adecuado funcionamiento del equipo y se limpió la superficie de la microplaca µDrop™ Plate (ThermoFisher Scientific, EUA) cubriéndola con agua destilada, limpiándola con un paño suave, después se cubrió la superficie con etanol al 70% (v/v) y se limpió de nuevo, permitiendo que se evaporen los residuos. Para el análisis de las muestras se colocó de 2 a 10 µL de muestra en un pocillo de la placa y se llenaron el resto de los pocillos vacíos con 2 µL de agua destilada, se cerró cuidadosamente la cubierta de la microplaca y se realizó las determinaciones. Por último, se limpió la microplaca realizando el mismo procedimiento mencionado anteriormente

Se requirió de la generación una cepa de *E. coli* transformante con una copia del vector pPIC9K (Invitrogen, EUA) como reserva de éste. Para ello, primero se preparó y transformó células competentes de *E. coli* HB101 siguiendo la metodología del Manual de Prácticas de Biología Molecular de Otoño del 2017 del ITESO. Las colonias transformantes positivas se cosecharon e inocularon en medio LB líquido con una concentración de antibiótico ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se incubó a 37°C y 180 rpm durante una noche, posteriormente se llevó a cabo la extracción del material plasmídico por la técnica de Miniprep siguiendo la metodología del Manual de Prácticas de Biología Molecular de Otoño del 2017 del ITESO y se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para el análisis cualitativo de la extracción así como la cuantificación del DNA. En caso de ser necesario, se llevó a cabo la purificación del DNA con el kit de purificación DNA Wizard® Clean-Up System (Promega, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega, 2016).

Para la clonación del gen de GOD en el vector pPIC9K se utilizó la estrategia de amplificación de TD PCR empleando el producto de amplificación del gen como *primer* y el vector pPIC9K como hebra molde. Se tomó como base el termograma de la amplificación del gen de GOD (O6) y se modificó la temperatura inicial de hibridación, los ciclos de disminución de la temperatura de hibridación y la temperatura de hibridación final conforme se obtuvo respuesta de amplificación.

Así mismo, se digirió el vector pPIC9K usando la enzima EcoRI del kit FastDigest Value Pack (ThermoFisher Scientific, US) siguiendo las instrucciones del fabricante (ThermoFisher Scientific, 2018) y se ligó el producto de la amplificación del gen de GOD usando el kit In-Fusion® HD Cloning Kit (TaKaRa Bio, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante (Takara Bio USA Inc, 2018).

Los productos de clonación se transformaron en *E. coli* HB101 (Bio-Rad, EUA), *E. coli* Stellar (TaKaRa Bio, EUA), *E. coli* Rosetta (Novagen, Alemania), y *E. coli* NEB-5alpha (New England BioLabs, EUA). Las colonias transformantes positivas se cosecharon e inocularon en medio LB líquido con una concentración de antibiótico ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se incubó a 37°C y 180 rpm durante una noche, posteriormente se llevó a cabo la extracción del material

plasmídico por la técnica de Miniprep siguiendo la metodología del Manual de Prácticas de Biología Molecular de Otoño del 2017 del ITESO y se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para el análisis cualitativo de la extracción así como la cuantificación del DNA. En caso de ser necesario, se llevó a cabo la purificación del DNA.

3. Resultados del trabajo profesional

Se llevó a cabo la replica de la amplificación del gen de GOD utilizando la metodología O6 (Anexo B, Reporte PAP I) sin éxito, se sugirió la degradación de la hebra molde y los reactivos de la mezcla de PCR en diferentes ensayos. Para descartar el origen del fallo se purificó de nuevo una muestra del gen amplificado de GOD y se nombró a la muestra como GOD-3P, sin embargo, no se obtuvo producto de amplificación positivo, posteriormente se empleó un stock fresco de reactivos de PCR y se obtuvo resultados positivos empleando las muestras GOD-3P y M5-D2 (DNA genómico de *A. niger*) (**Figura 2**), confirmando la reproductibilidad de la metodología.

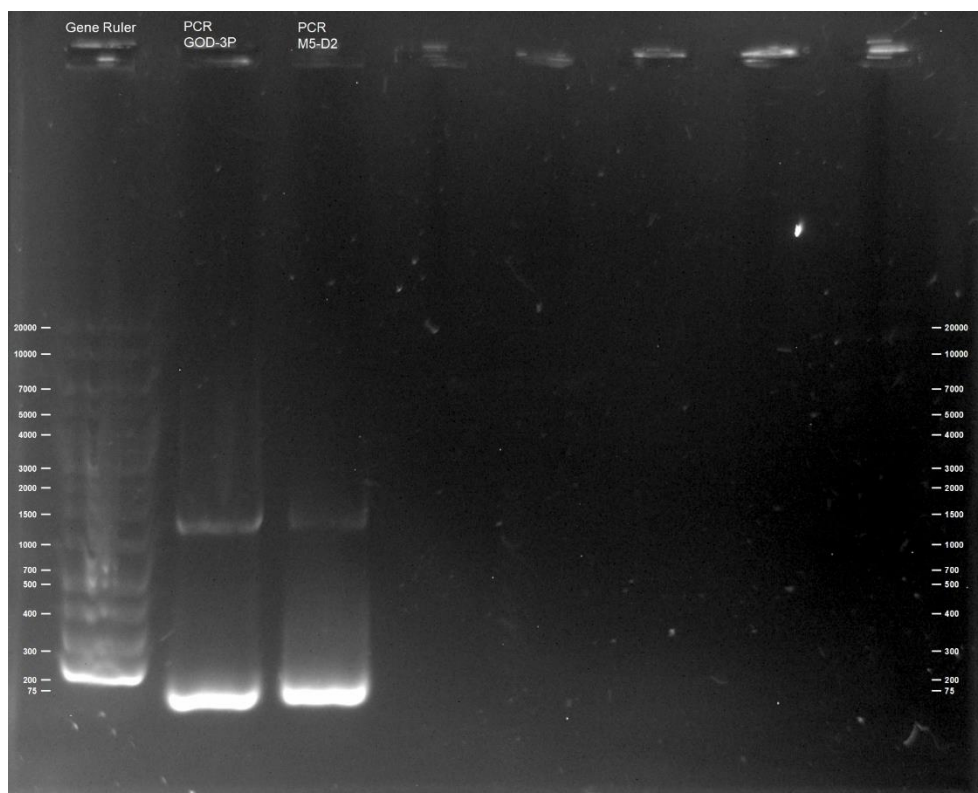


Figura 2. Resultados de la amplificación del gen de GOD empleando la metodología O6. Gene Ruler: Gene Ruler 1 kb DNA Plus Ladder (Thermo Scientific, 2016); PCR GOD-3P: Producto de PCR de la muestra GOD-3P; PCR M5-D2: Producto de PCR de la muestra M5-D2.

Para continuar con el desarrollo experimental, se llevó a cabo la transformación de *E. coli* HB101 con el vector pPIC9K con 50 ng de DNA, se cultivaron las colonias transformantes positivas y se llevó a cabo la extracción del vector pPIC9K por la técnica de Miniprep (**Figura 3**), posteriormente se llevó a cabo la purificación del plásmido, posteriormente se llevó a cabo la purificación del DNA usando el kit DNA Wizard® Clean-Up System y cuantificó la concentración del DNA ($9.8 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y se almacenó la muestra como pPIC9K-1. Se llevó a cabo varios ensayos de clonación del producto de PCR del gen de GOD en el vector pPIC9K por TD PCR usando las muestras GOD-3P y pPIC9K-1P sin éxito (**Tabla 5**), así mismo se llevó a cabo la clonación empleando el kit In-Fusion® HD Cloning Kit tras la previa digestión del vector pPIC9K con la enzima EcoRI; se transformó células de *E. coli* HB101 competentes sin éxito.



Figura 3. Resultados de la amplificación del gen de GOD empleando la metodología O6. Gene Ruler: Gene Ruler 1 kb DNA Plus Ladder (Thermo Scientific, 2016); pPIC9K-1: extracción de pPIC9K por Miniprep; pPIC9K-2: extracción de pPIC9K por Miniprep.

Se sugirió la degradación de las muestras y se llevó a cabo una segunda purificación de una muestra de la extracción del vector pPIC9K usando el kit NucleoSpin® y se llevó a cabo la cuantificación de la muestra de DNA ($10.05 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y se almacenó la muestra como pPIC9K-FO-DGA-CPAP-0017

2P. Posteriormente se llevó a cabo la clonación del gen de GOD en el vector pPIC9K por TD PCR usando las muestras GOD-3P y pPIC9K-2P. Se llevaron a cabo diferentes ensayos, encontrando en la clonación 4 (**Figura 4**) y 8 (muestra pPIC9K-GOD1), un producto positivo de amplificación, sin embargo, el su peso molecular superior a 20 kb no correspondía al tamaño esperado (11,098 pares de bases), para descartar la formación de una isoforma se llevó a cabo la digestión del plásmido con EcoRI, sin embargo, no se logró observar el cambio de la isoforma de la muestra (**Figura 5**), ni la hebra molde, sugiriendo la degradación de la hebra molde del vector.

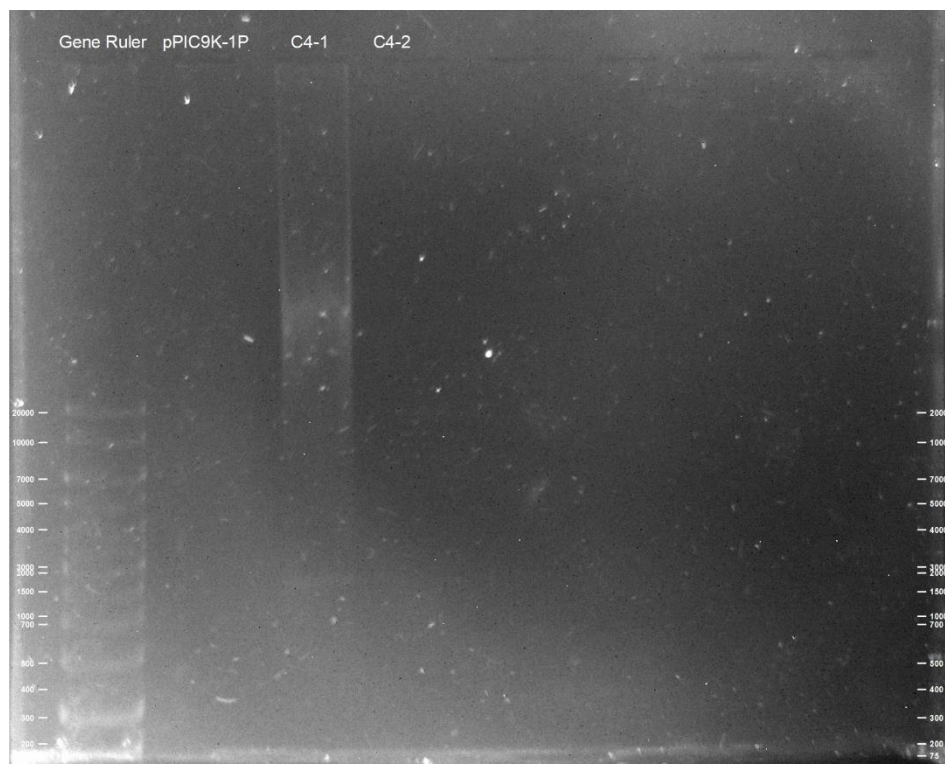


Figura 4. Resultados de la clonación 4 de GOD en pPIC9K. Gene Ruler: Gene Ruler 1 kb DNA Plus Ladder (Thermo Scientific, 2016); pPIC9K-1P: muestra pPIC9K-1P; C4-1: producto de la clonación de la muestra GOD-3P en pPIC9K-1P; C4-2: producto de la clonación de la muestra GOD-3P en pPIC9K-S.

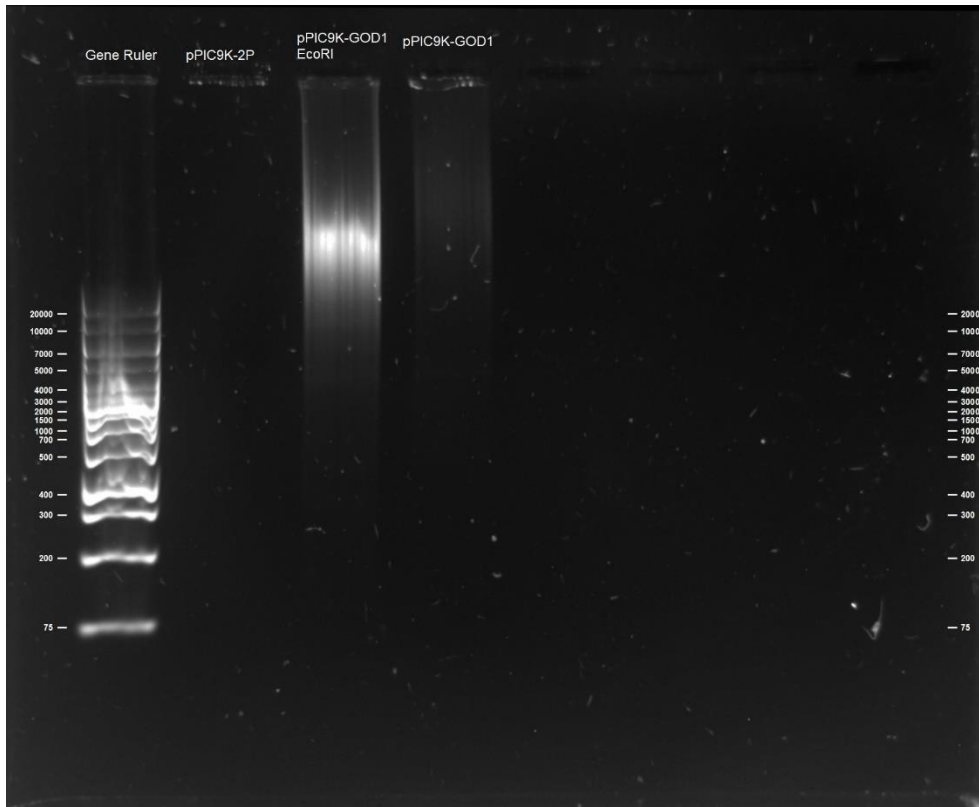


Figura 5. Resultados de la digestión del producto de clonación 8 de GOD en pPIC9K. Gene Ruler: Gene Ruler 1 kb DNA Plus Ladder (Thermo Scientific, 2016); pPIC9K-2P: muestra pPIC9K-2P; pPIC9K-GOD1 EcoRI: producto de la C8-2 digerido con EcoRI; pPIC9K-GOD1: producto de la C8-2.

Posteriormente se llevó a cabo un diagnóstico de problemas para confirmar la degradación de la hebra molde y se corrió un gel de electroforesis para determinar la viabilidad de las muestras GOD-3P y pPIC9K-2P, así mismo, se purificó el stock restante del producto de amplificación del gen de GOD utilizando el kit DNA Wizard® Clean-Up System; se cargaron 3 pocillos con stock del vector sintético (pPIC9K-s) en 3 concentraciones (50, 100, 150 ng) para identificar el límite inferior de detección en la concentración de DNA de la electroforesis (**Figura 6**). Se confirmó la degradación o baja concentración de la muestra GOD-3P al igual que para la muestra pPIC9K-2P, así mismo, se observó que el límite inferior de detección de muestras de ácidos nucleicos en el gel de electroforesis es de 50 ng. Se observó que el DNA Wizard® Clean-UP System no logró la separación de los *primers* del producto de amplificación de GOD, por lo que se optó por purificar de nuevo el fragmento con el kit NucleoSpin®, ya que este tiene la columna de este kit posee la capacidad de retener fragmentos superiores a un tamaño de 50 pares de bases, permitiendo que los *primers* eluyan y se separen de la muestra por su tamaño (MACHEREY-NAGEL, 2017). Por FO-DGA-CPAP-0017

otro lado, se observó que las muestras de DNA sintético del vector pPIC9K tuvieron un peso molecular superior a 20 kb con dos bandas, sugiriendo la presencia de isoformas del plásmido en la muestra pPIC9K-s.

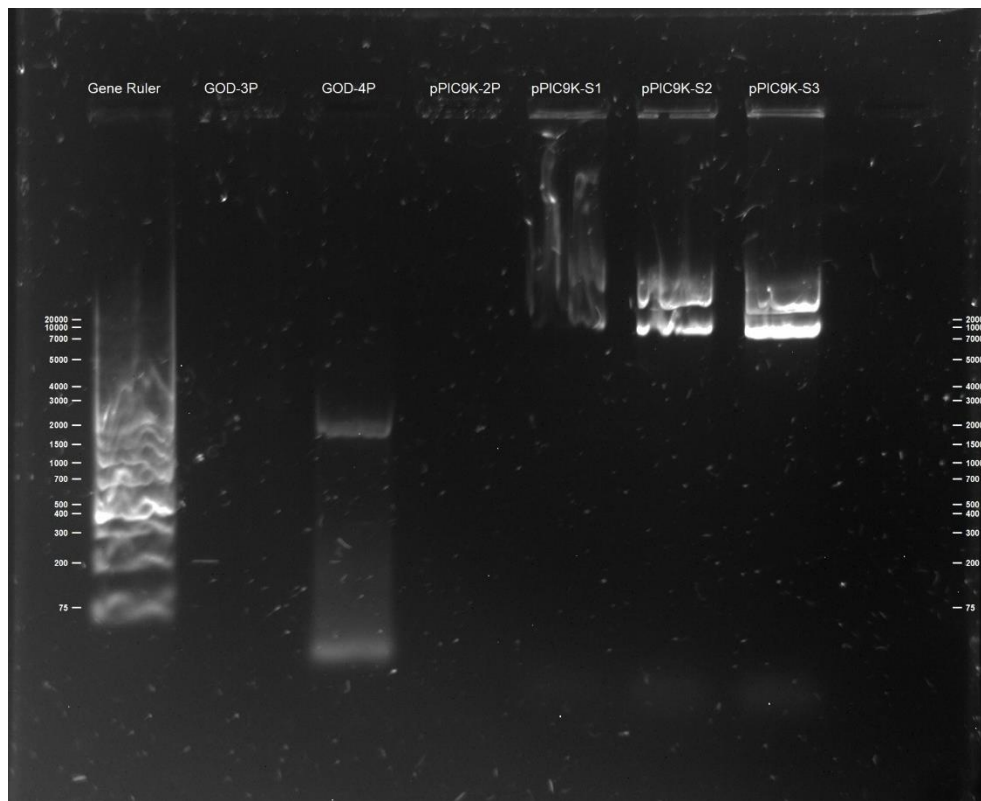


Figura 6. Resultados de la digestión del diagnóstico de problemas. Gene Ruler: Gene Ruler 1 kb DNA Plus Ladder (Thermo Scientific, 2016); GOD-3P: muestra GOD-3P; GOD-4P; producto de amplificación de GOD purificado con el DNA Wizard® Clean-UP System; pPIC9K-2P; muestra pPIC9K-2P; pPIC9K-S1: pPIC9K-s (50 ng); pPIC9K-S2: pPIC9K-s (100 ng); pPIC9K-S3: pPIC9K-s (150 ng).

Tras el diagnóstico de problemas se llevó a cabo nuevos ensayos de clonación del gen de GOD en pPIC9K-2P por TD PCR, cambiando las condiciones del termograma con base en la respuesta de amplificación. Se obtuvo como producto de la metodología de clonación 12 (C12) bandas que indicaban amplificación positiva, sin embargo, el peso molecular de estas no coincidió con el tamaño esperado (11,098 pares de bases), de nuevo, las bandas tenían un peso molecular superior a las 20 kb, sugiriendo la presencia de isoformas (**Figura 7, Tabla 5**).

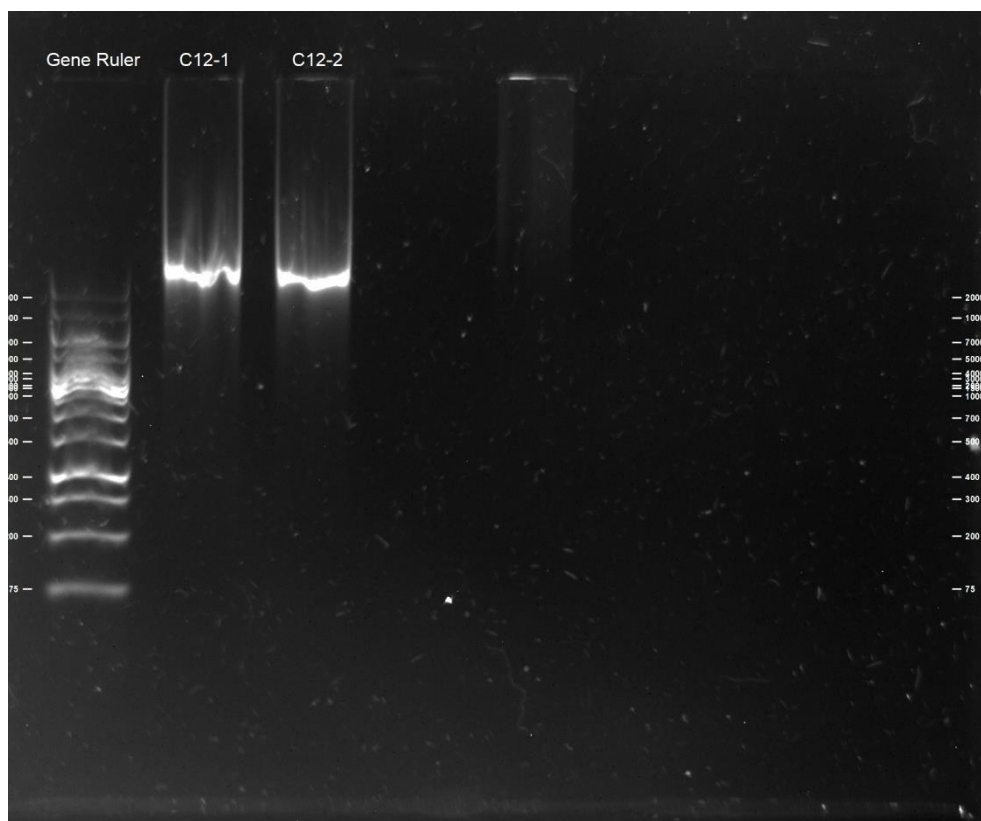


Figura 7. Resultados de la clonación 12. Gene Ruler: Gene Ruler 1 kb DNA Plus Ladder (Thermo Scientific, 2016); C12-1: clonación de GOD-4P en pPIC9K-S (GOD:pPIC9K, 6:1 v/v); C12-1: clonación de GOD-4P en pPIC9K-S (GOD:pPIC9K, 9:1 v/v)

Tabla 5. Resultados y observaciones de los distintos ensayos de clonación.

Ensayo	T _m inicial (°C)	Tiempo	Número de ciclos	T _m final (°C)	Tiempo	Número de ciclos	Muestras	Observaciones	Resultados
C1	76	45 s	21	61	1 min	30	GOD-3P pPIC9K-1P	Relaciones másicas vector:inserto (1:5, 1:50, 1:250) Polimerasa <i>Phusion</i> Relación molar vector:inserto (1:6)	Hibridaciones inespecíficas
C2	54	45 s	11	44	1 min	25	GOD-3P pPIC9K-1P	Polimerasa <i>Phusion</i> Relación molar vector:inserto (1:6)	Amplificación negativa
C3	64	45 s	11	54	1 min	25	GOD-3P pPIC9K-1P	Polimerasa <i>Phusion</i> <i>TaKaRa</i> Relación molar vector:inserto (1:6)	Autoamplificación del inserto
C4	78	45 s	11	68	1 min	25	GOD-3P pPIC9K-1P pPIC9K-s	Relación molar vector:inserto (1:6) Polimerasa <i>Phusion</i> Relación molar vector:inserto (1:6)	Producto de amplificación de tamaño superior a 20 kb Se sospecha la degradación de la hebra molde pPIC9K-1P (Figura 4)
C5	78	45 s	11	68	1 min	25	GOD-3P pPIC9K-1P	<i>Stock</i> de reactivos para PCR nuevo Polimerasa <i>Phusion</i> Relación molar vector:inserto (1:6)	Amplificación negativa Se confirma la degradación de la hebra molde pPIC9K-1P
C6	73	45 s	8	61	1 min	10	GOD-3P pPIC9K-2P	Polimerasa <i>Phusion</i> Relación molar vector:inserto (1:6)	Amplificación negativa
C7	76	45 s	16	61	1 min	25	GOD-3P pPIC9K-2P	Polimerasa <i>Phusion</i> Relación molar vector:inserto (1:6) Duplicado	Amplificación negativa

C8	78	45 s	11	68	1 min	25	GOD-3P pPIC9K-2P	Polimerasa <i>Phusion</i> Relación molar vector:inserto (1:6) Duplicado	Producto de amplificación de tamaño superior a 20 kb, posible producto de clonación (Figura 5)
C9	78	45 s	16	61	1 min	25	GOD-4P pPIC9K-2P pPIC9K-S	Polimerasa <i>Phusion</i> Relación molar vector:inserto (1:6) Duplicado	Amplificación negativa, se sugiere inhibición de la polimerasa por alta concentración de DNA
C10	62	45 s	16	47	1 min	25	GOD-4P pPIC9K-2P pPIC9K-S	Polimerasa <i>Phusion</i> Relación másica vector:inserto (1:6) Duplicado	Amplificación negativa
C11	62	45 s	16	47	1 min	25	GOD-4P pPIC9K-S	Polimerasa <i>Phusion</i> Relación volumétrica vector:inserto (1:6) Duplicado	Amplificación negativa
C12	62	45 s	16	47	1 min	25	GOD-4P pPIC9K-S	Polimerasa <i>Phusion</i> Relación volumétrica vector:inserto (1:6, 1:9) Duplicado	Producto de amplificación de tamaño superior a 20 kb, posible producto de clonación (Figura 7)

De nuevo, se llevó a cabo la clonación del producto de amplificación del gen de GOD en el vector pPIC9K utilizando el kit de clonación In-Fusion® HD Cloning Kit con las muestras GOD-4P y pPIC9K-s tras la previa digestión del vector pPIC9K con la enzima EcoRI; se transformó células de *E. coli* HB101 competentes con las muestras: C8-2, C12-1, C12-2 e In-F2. No se observaron colonias transformantes positivas y se sugirió que las células no eran competentes o no aceptaron el plásmido debido a su alto peso molecular. Dado lo anterior, se llevó a cabo un ensayo de transformación de diferentes cepas de células competentes de *E. coli*: HB101, NEB-5alpha, Stellar, Rosetta. Se detectó cuatro colonias transformantes positivas y se llevó a cabo el cultivo y extracción de plásmidos por la técnica de Miniprep. Posteriormente se llevó a cabo la determinación cualitativa de la extracción de los plásmidos por electroforesis en gel de agarosa (**Figura 8**). No se observó la presencia del producto de clonación en las muestras y se sugirió contaminación en las placas de Petri de las colonias transformantes, por lo cual se extendió el tiempo de incubación de las muestras para observar con mayor detalle la morfología de las colonias, confirmando la contaminación de las muestras (**Figura 9**).

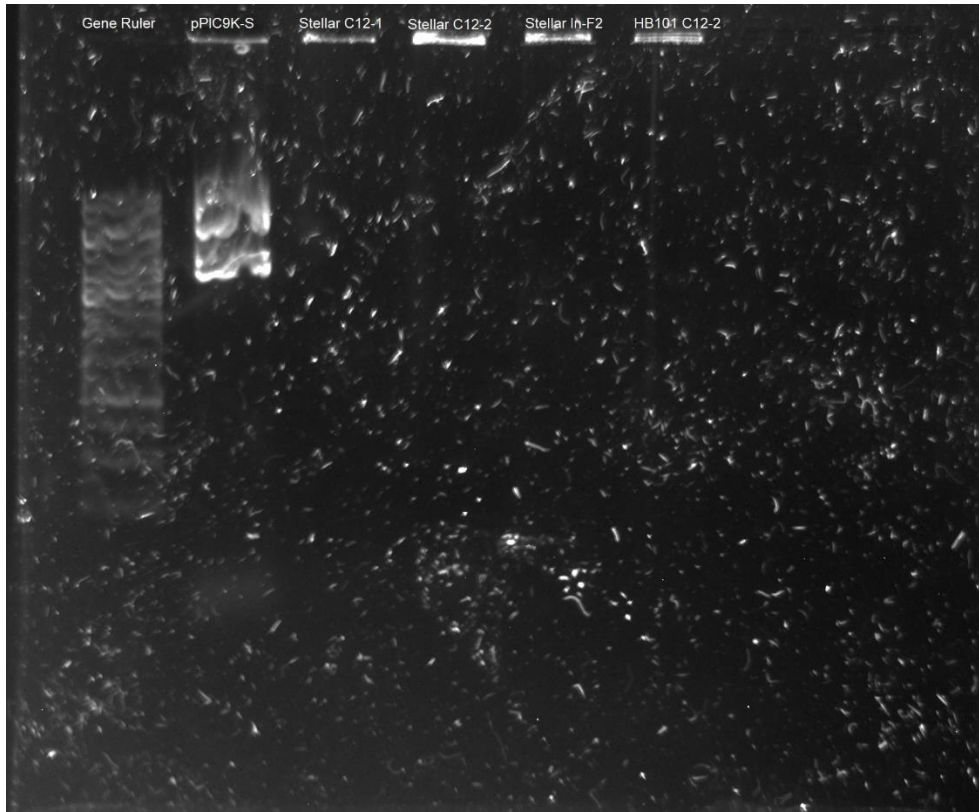


Figura 8. Resultados de la extracción de plásmidos de las células transformantes por la técnica de Miniprep. Gene Ruler . Gene Ruler 1 kb DNA Plus Ladder (Thermo Scientific, 2016); Stellar C12-1: extracción de la colonia *E. coli* Stellar con plásmido C12-1; Stellar C12-2: extracción de la colonia *E. coli* Stellar con plásmido C12-2; Stellar In-F2: extracción de la colonia *E. coli* Stellar con plásmido In-F2; HB101 C12-1: extracción de la colonia *E. coli* HB101 con plásmido C12-2.

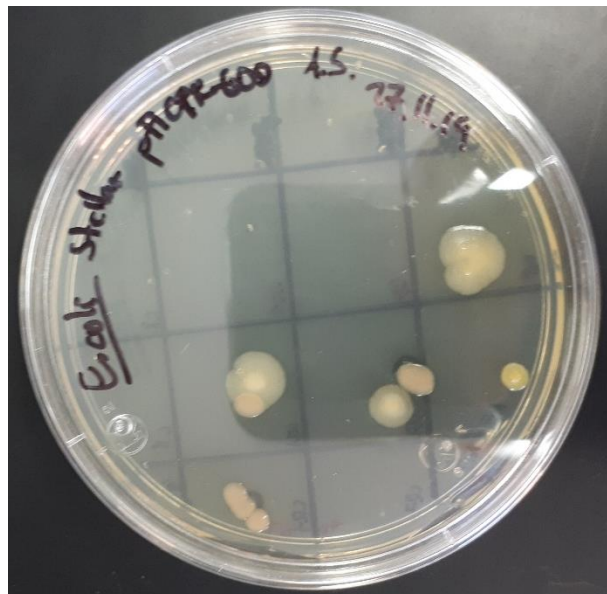


Figura 9. Contaminación de las células transformantes.

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

En el presente proyecto de investigación se logró aplicar y mejorar las habilidades y conocimientos técnicos referentes a las competencias adquiridas en las disciplinas de Biología Molecular e Ingeniería genética, se pusieron en práctica y mejoraron las habilidades relacionadas con la investigación para la solución de la clonación por la técnica *Overlap Extension PCR*.

Dentro de los aprendizajes obtenidos de la experiencia de trabajar en el laboratorio en un proyecto de investigación, se puede recuperar que la resiliencia, la paciencia y la perseverancia son virtudes necesarias para superar obstáculos y dificultades que se pueden llegar a presentar cuando no se encuentran los resultados esperados, que desde la experiencia personal ocurre en un 95% de los casos; aprender a ver los factores externos alrededor de un problema desde la perspectiva de un tercero es una herramienta útil para identificar dónde es que nos equivocamos cuando sólo vemos los problemas desde nuestra propia perspectiva; el ser retroalimentado por un tercero nos ayuda a ver lo que no es perceptible por nuestros sentidos e intuiciones debido al sesgo de nuestra formación académica y cosmovisión, aunque para poder recibir adecuadamente esa retroalimentación es necesaria la apertura y la tolerancia, ya que pueden mencionarse observaciones y realizar comentarios que pongan a prueba nuestra moral y lo que nosotros construimos como nuestra aproximación a la verdad de la realidad de nuestro entorno.

En resumen, la experiencia fue rica en retos y aprendizajes que abonaron a los conocimientos y saberes tanto profesionales y personales, que a su vez, contribuyen a la formación profesional y personal para dar un mejor enfoque a el proyecto de vida y de lo que uno piensa hacer una vez que egrese de la academia para incorporarse a la vida laboral, queda más que claro que se puede contribuir a la solución de problemas mucho antes de ser un profesionista y que no se requiere de ser servidor público para tener un impacto en la vida y la política del país, ya que de desarrollarse e implementarse de forma adecuada el proyecto con las partes involucradas en el problema, se puede mejorar la calidad de vida de las personas que padecen diabetes, a la par que se levanta un gran peso de las finanzas

y los organismos de gobierno de México; los aprendizajes obtenidos, las aproximaciones y las metodologías desarrolladas serán de utilidad en un futuro para poder resolver otros problemas, inclusive muy distantes y ajenos al que fue abordado en el proyecto.

5. Conclusiones

En el desarrollo del proyecto se llevó a cabo la estandarización de la técnica de amplificación del gen de GOD por TD PCR, se generó una cepa transformante como reserva del vector pPIC9K y se exploró extensamente diferentes metodologías para la clonación del gen de GOD en el vector pPIC9K por *Overlap Extension PCR* por TD PCR y con el kit de clonación In-Fusion® HD Cloning Kit. El proyecto requiere de continuación para confirmar la clonación del fragmento en las muestras C4-1, C8-2, C12-1, C12-2 e In-F2. Debido a limitaciones de espacio, tiempo y recursos, no se han cumplido con el resto de los objetivos del proyecto; se requerirá de incrementar los esfuerzos y priorizar las tareas más importantes para acabar el proyecto en tiempo.

6. Referencias

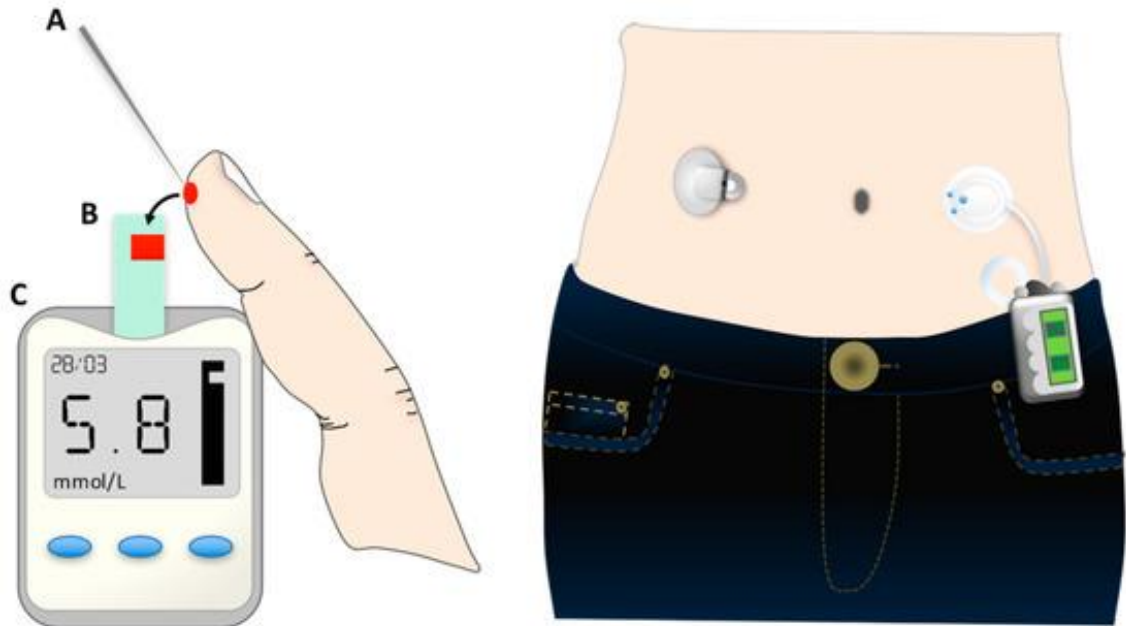
- Barraza-Lloréns, M., Guajardo-Barrón, V., Picó, J., García, R., Hernández, C., Mora, F., . . . Urtiz, A. (2015). *Carga económica de la diabetes mellitus en México, 2013*. Ciudad de México: Funsalud.
- Bruen, D., Delaney, C., Florea, L., & Diamond, D. (2017). Glucose Sensing for Diabetes Monitoring Recent Developments. *Sensors*, 17(1866).
- Bryskin, A. V., & Matsumura, I. (2010). Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*, 48(6), 463-465.
- CENAPRECE. (2016). *EE-4-2016*. Ciudad de México: Secretaria de Salud.
- Federación Mexicana de Diabetes. (18 de Junio de 2015). *Niveles de Glucosa en Sangre y Automonitoreo*. Recuperado el 14 de Mayo de 2019, de Infografías: <http://fmdiabetes.org/automonitoreo-niveles-glucosa/>
- Federación Mexicana de Diabetes. (9 de Enero de 2019). *Los costos de la Diabetes*. Recuperado el 14 de Mayo de 2019, de Diabetes en Números: <http://fmdiabetes.org/los-costos-la-diabetes/>
- Fesel, P. H., & Zuccaro, A. (2016). β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology*, 90(1), 53-60.
- Fundación MÍDETE. (2016). *Asumiendo el Control de la Diabetes*. México: Fundación Mídete A.C.
- International Diabetes Federation. (2017). *IDF Diabetes Atlas* (8 ed.). Bruselas: IDF.
- Invitrogen. (2006). *Put the proven strength of Pichia*. Recuperado el 15 de Mayo de 2019, de Pichia pastoris Expression System: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C18400>

- Jang, S., & Xu, C. (2018). Review of emerging approaches in non- or minimally invasive glucose monitoring and their application to physiological human body fluids. *International Journal of Biosensor & Bioelectronics*, 1(5), 5-9.
- MACHEREY-NAGEL. (Febrero de 2017). *User manual*. Obtenido de NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up: https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gelex_NSgelPCR.pdf
- Malhotra, B. D., & Chaudhary, A. (2003). Fundamentals of Biosensors. En *Biosensors for clinical diagnostics industry* (págs. 1-26). Delhi: Smithers Rapra.
- Preece, J. (27 de Diciembre de 2017). *What Type of Glucometer is Best for You?* Recuperado el 15 de Mayo de 2019, de Review: <https://www.dignified.com/best-glucometer-type-for-you-review-45.html>
- Programa Sectorial de Salud. (2014). *Prevención y Control de la Diabetes Mellitus* (1 ed.). Ciudad de México: Secretaría de Salud.
- Ramírez, J. C., & de la Sota Riva, M. (2018). El Rostro Pobre de la Diabetes. *Investigación Económica*, 77(305), 3-39.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., & Van Dijck, P. W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*-a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4-5), 426-435.
- Takara Bio USA Inc. (28 de Agosto de 2018). *In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual*. Obtenido de User Manual: https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/In-Fusion%20HD%20Cloning%20Kit%20User%20Manual_121416.pdf
- Tejeda, A., Montesinos, R. M., & Guzmán, R. (2011). Una Perspectiva de las Bioseparaciones. En *Bioseparaciones* (págs. 1-30). México: Pearson.
- Thermo Scientific. (25 de Noviembre de 2016). *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*. Obtenido de Product Information: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013047_GeneRuler_1kb_Plus_DNALadder_250ug_UG.pdf
- ThermoFisher Scientific. (29 de Junio de 2018). *Product Information: FastDigest Value Pack*. Obtenido de FastDigest Value Pack: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012723_FastDigest_Value_Pack_UG.pdf
- Tonyushkina, K., & Nichols, J. H. (2009). Glucose Meters: A Review of Technical Challenges to Obtaining Accurate Results. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 3(4), 971-980.
- Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(6), 927-938.
- Zhanjun, Q., Yuanfang, G., Xiaoming, B., Jianrong, H., Gaoying, S., Bingyin, P., & Wenxiang, B. (2016). Expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* SMD1168. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(5), 998-1005.

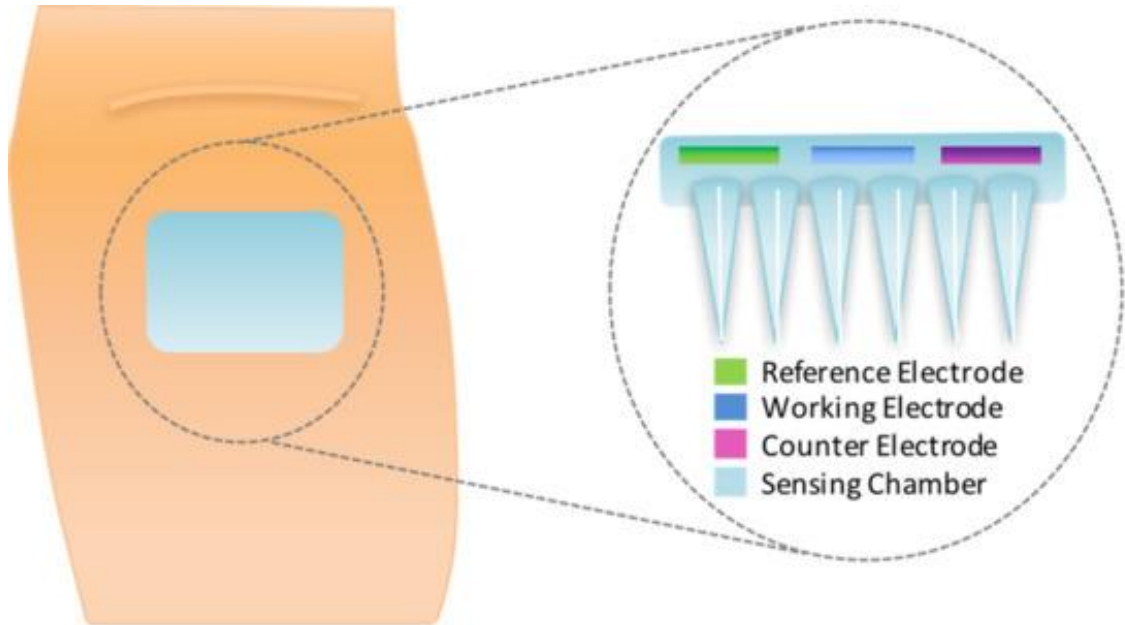
6. Anexos



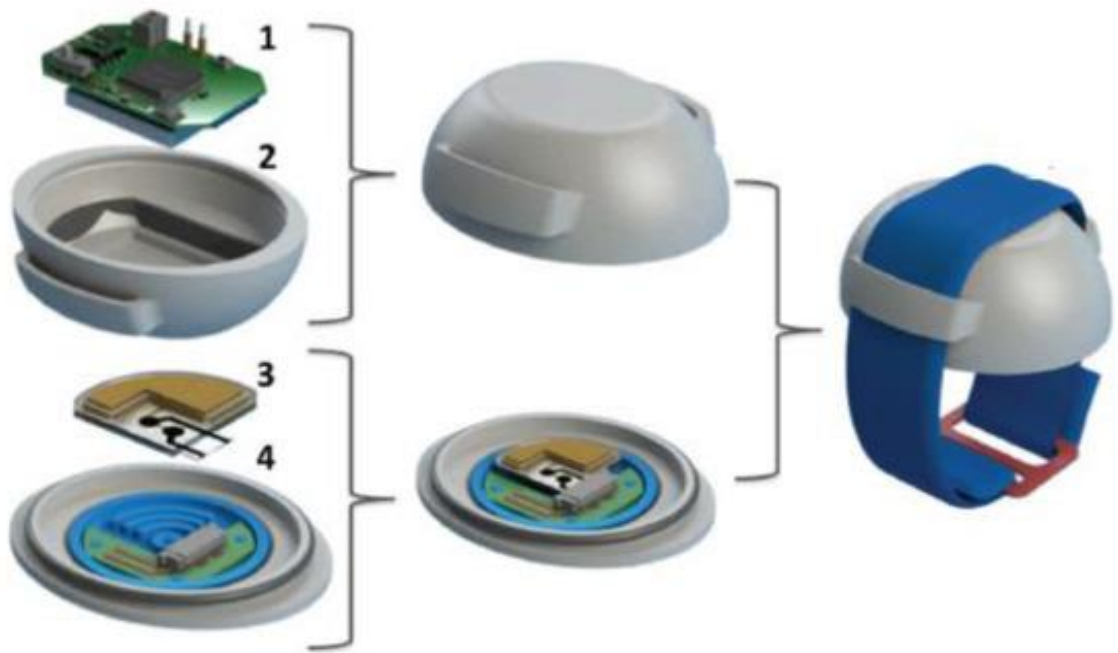
Anexo 1. Costos asociados del tratamiento de la diabetes (Federación Mexicana de Diabetes, Niveles de Glucosa en Sangre y Automonitoreo, 2015).



Anexo 2. Dispositivo medidor de glucosa convencional (izquierda). A. Lanceta. B. Muestra de sangre en tira reactiva. C. Medidor de glucosa. Medidor continuo de glucosa (derecha) (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).

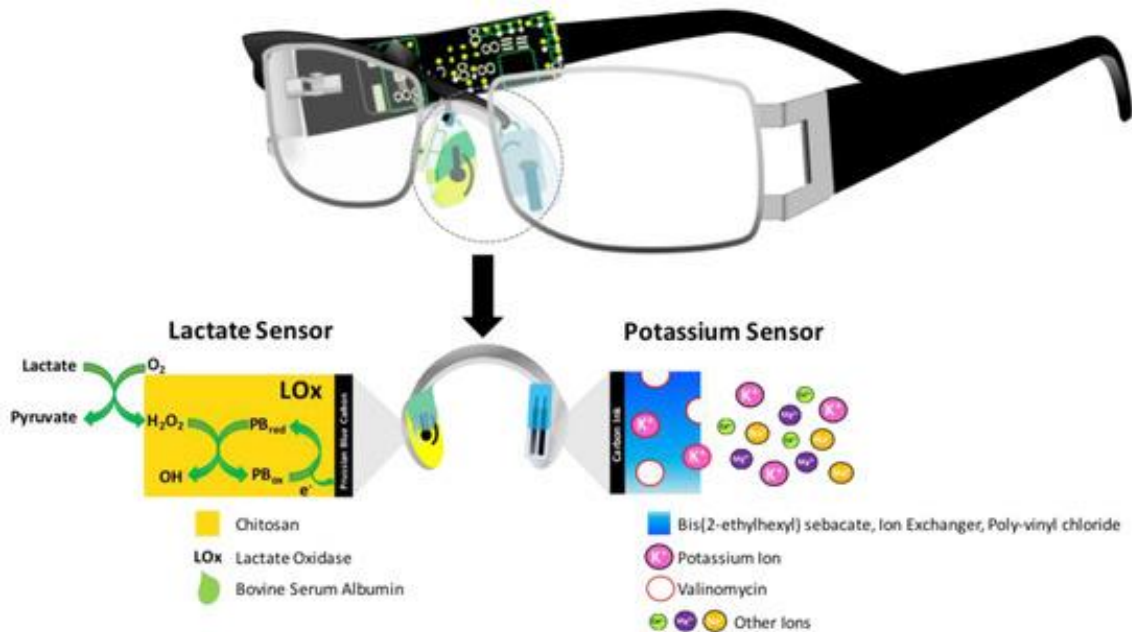


Anexo 3. Esquema de un parche para el antebrazo sensor de glucosa de microagujas (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).

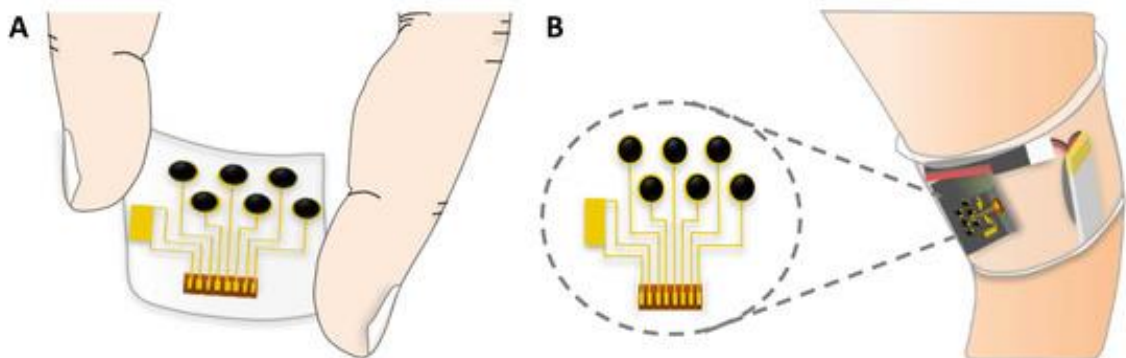


Anexo 4. SwEatch: plataforma de reloj-sensor para la determinación de sodio en el sudor. 1. Electrónica. 2. Molde impreso en 3D. 3. Chip de microfluídica y electrodo ion-específico/ion-

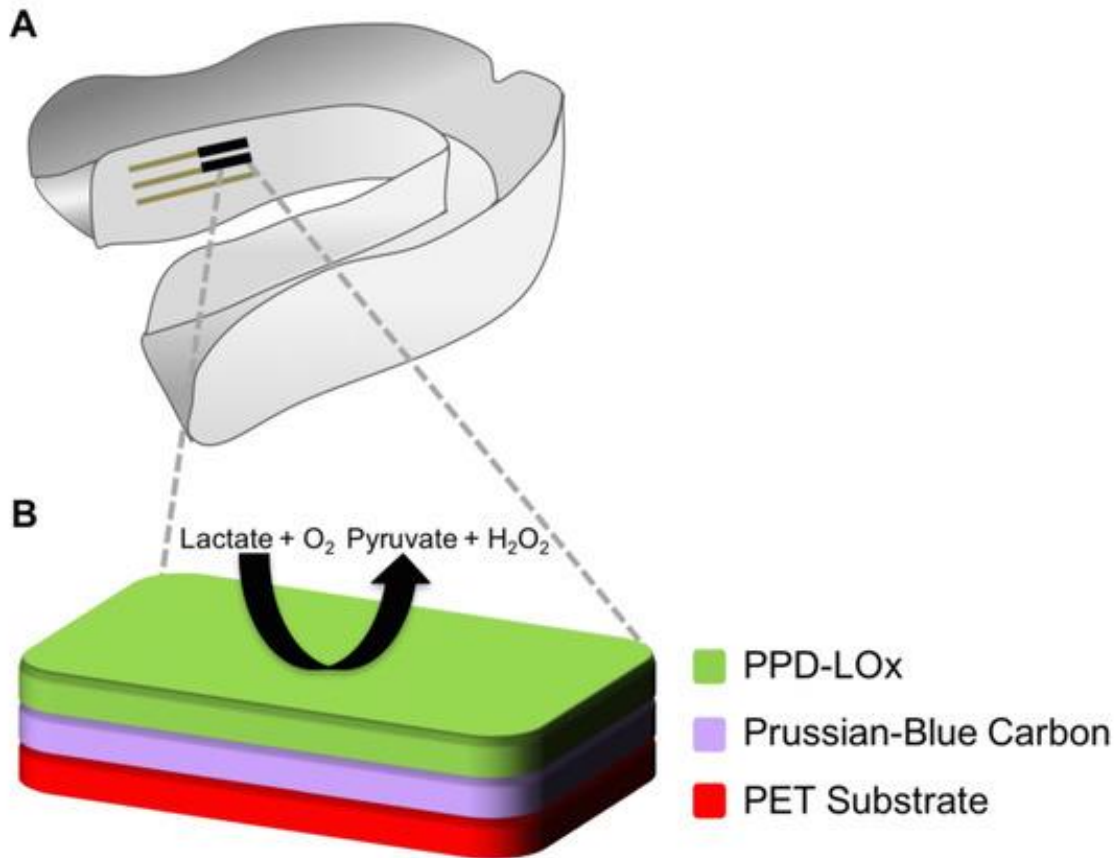
selectivo 4. Cosechador de sudor impreso en 3D y sus conexiones (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).



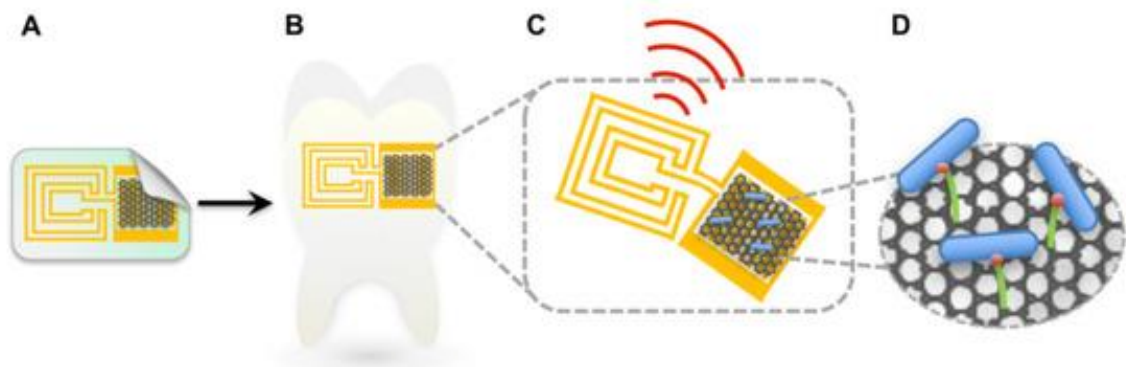
Anexo 5. Esquema de la representación de sistema de biosensor en anteojos, en el cual se integra una tarjeta de circuito inalámbrica a lo largo de las patas de los anteojos y dos sensores electroquímicos de lactato y potasio en los soportes para la nariz. Esquema de el sensor de lactato (izquierda) y potasio (derecha), así mismo de demuestra su mecanismo de reconocimiento y transducción (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).



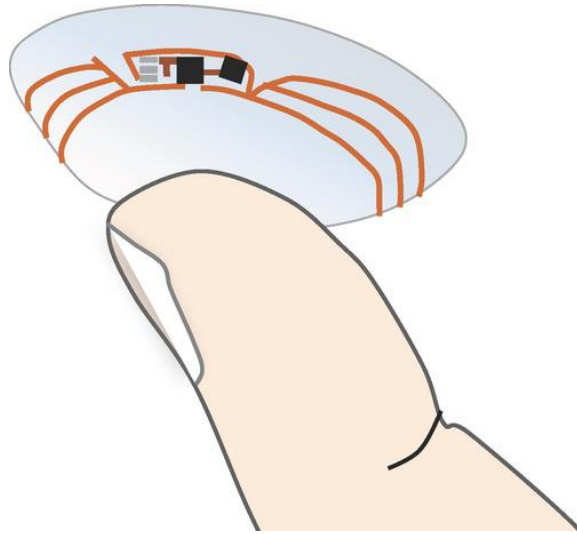
Anexo 6. A. Sensor flexible de glucosa. B. Sensor de glucosa integrado a una banda portable para el monitoreo no invasivo de glucosa en sudor (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).



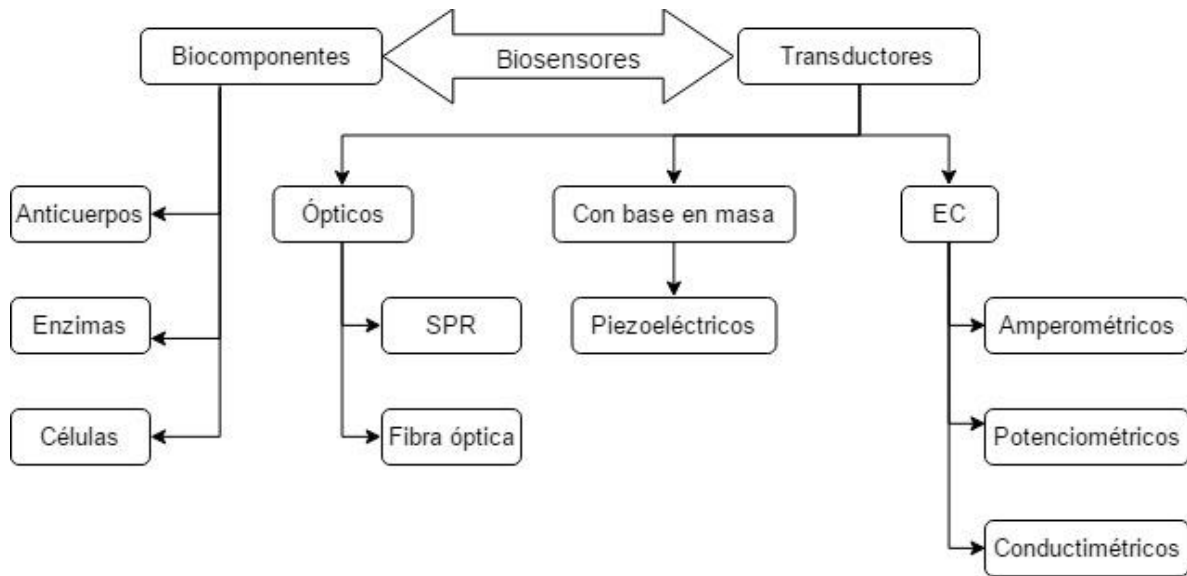
Anexo 7. Guarda sensora de lactato para el monitoreo no invasivo de lactato en saliva. **(A)** Plataforma de guarda sensora mostrando el sistema de electrodo integrado impreso en 3D, con una enzima lactasa inmovilizada en el electrodo de trabajo. **(B)** Representación detallada del electrodo de trabajo y sus componentes (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).



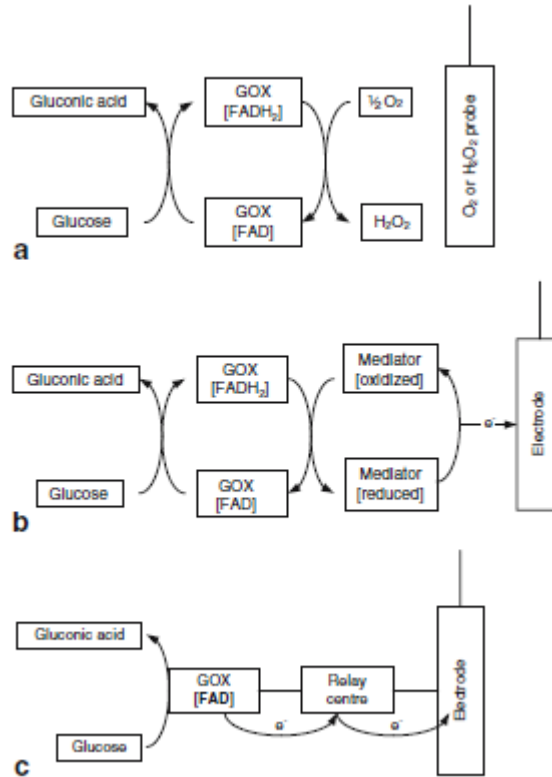
Anexo 8. Sensor de glucosa tatuado en un diente como plataforma de un dispositivo no invasivo para el monitoreo de glucosa. **(A)** Grafeno impreso en seda bio-adsorbente que contiene un cable inalámbrico; **(B)** Sensor bio-transferible al esmalte del diente; **(C)** Ampliación de la unidad de detección con un sistema de lectura inalámbrico; **(D)** Autoensamblaje de bacterias patogénicas atrapadas por péptidos en una superficie nanotransductora (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).



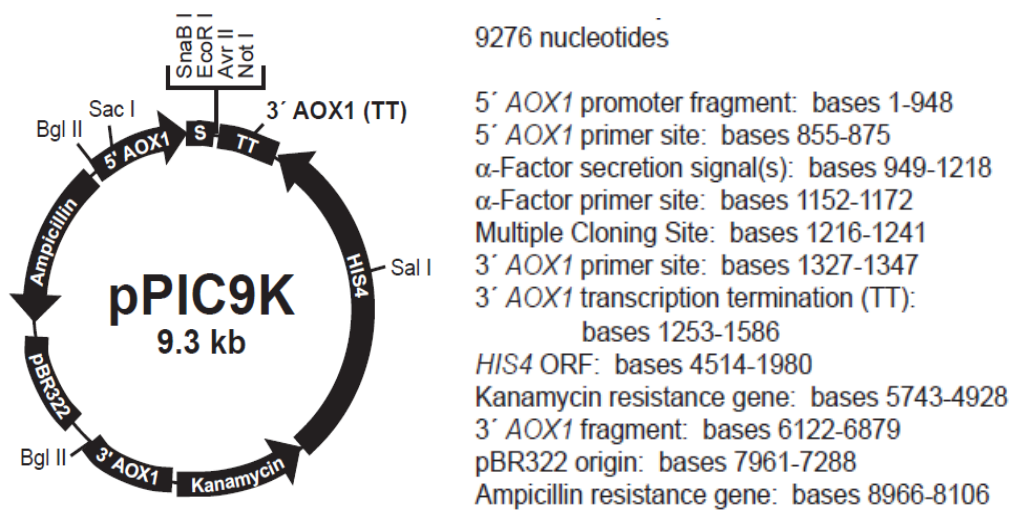
Anexo 9. Lente de contacto de Google y Novartis (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).



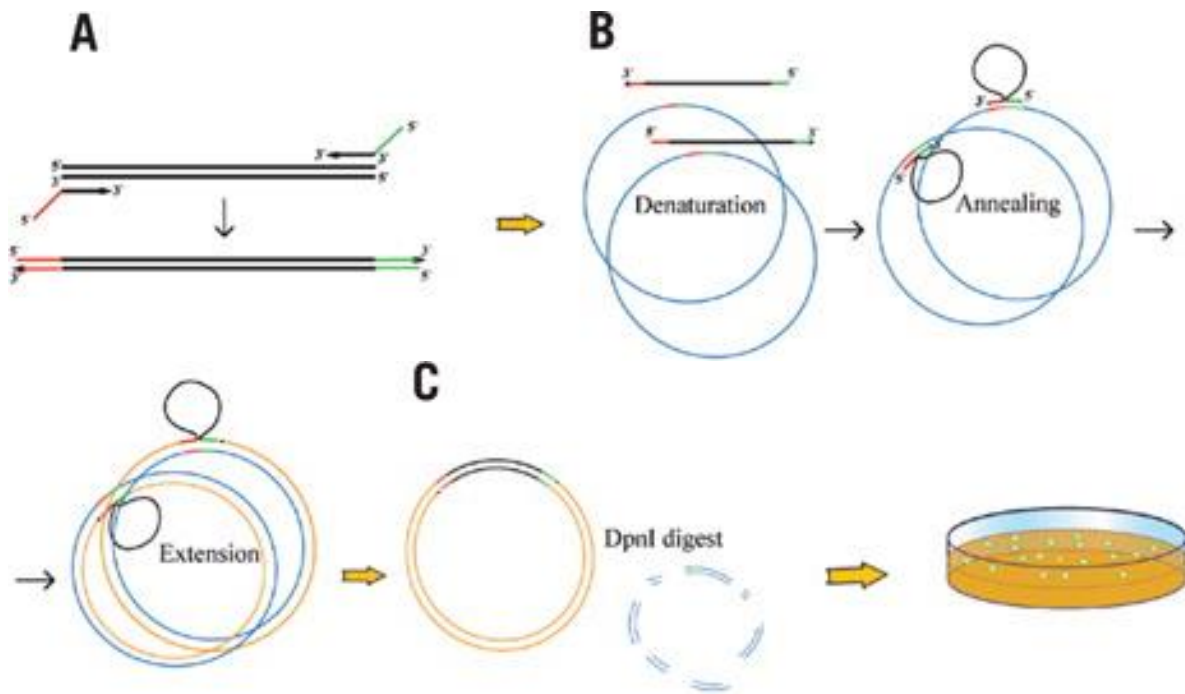
Anexo 10. Esquema que muestra la clasificación de los biosensores, adaptado de Malhotra & Chaubey (2003). (DNA: ácido desoxirribonucleico; SPR: resonancia de superficie de plasmones; EC: electroquímico).



Anexo 11. Principio de operación de un sensor de glucosa de (a) primera, (b) segunda y (c) tercera generación (Wong, Wong, & Chen, 2008).



Anexo 12. Características principales del vector de expresión pPIC9K (Invitrogen, 2006).



Anexo 13. Esquema de la técnica de *overlap extension* PCR. (A) Primero se amplifica el inserto con *primers* quiméricos, para que el producto final de PCR posea regiones complementarias al vector. (B) En seguida, el vector y el inserto son mezclados, desnaturalizados e hibridados; el inserto hibridado es posteriormente amplificado por la DNA polimerasa *Phusion* usando el vector como hebra molde, hasta que la polimerasa alcanza el extremo 5' del inserto. Después de varios ciclos de PCR, el nuevo plásmido posee dos cortes (uno en cada hebra) y se acumula como producto. (C) El nuevo plásmido puede ser transformado en *E. coli*, después de que la hebra molde es deshecha por digestión con *DpnI* (Bryskin & Matsumura, 2010).