

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

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ingeniería en Biotecnología. Alejandro Saldaña Jauregui

Profesor PAP: Dr. David José Mendoza Aguayo

Tlaquepaque, Jalisco, mayo de 2019

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	3
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	3
Resumen	3
1. Introducción.....	4
1.1. Objetivos.....	4
1.2. Justificación	4
1.3 Antecedentes.....	6
1.4. Contexto	6
2. Desarrollo	9
2.1. Sustento teórico y metodológico	9
2.2. Planeación y seguimiento del proyecto	11
3. Resultados del trabajo profesional.....	5
4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto	11
5. Conclusiones	13
6. Bibliografía	¡Error! Marcador no definido.
Anexos (en caso de ser necesarios).....	16

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 en 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 el aislamiento y amplificación exitoso del gen de la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, para la producción de un biosensor no invasivo de glucosa; dentro de 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, además puede trabajar dentro de los rangos de los parámetros fisicoquímicos de la saliva, sudor, fluidos intersticiales y orina, de igual forma, las enzimas

de *A. niger* son reconocidas como GRAS por lo cual, la glucosa oxidasa de este microorganismo es una opción adecuada para lograr el propósito de este proyecto.

1. Introducción

1.1. Objetivo

Diseñar y producir un biosensor para el monitoreo de los niveles de glucosa, mediante inmovilización de enzimas en matrices nanoestructuradas biocompatibles no invasivas.

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 aquellas personas con este padecimiento por medio de un inadecuado seguimiento; algunas de las complicaciones de la diabetes son la disfunción eréctil, neuropatía, retinopatía, cetoacidosis, nefropatía, hipertensión arterial, embolias cerebrales, y síndrome hiperosmolar hiperglucémico no cetónico, entre otras; en promedio el 50 % de los pacientes con diabetes mueren de alguna enfermedad cardiovascular (Vázquez Álvarez, 2018; Wiebea, Wägnera, & Novoa Mogollóna, 2011; Fundación MÍDETE, 2016); el 47 % de las personas diagnosticadas con diabetes ya han recibido un diagnóstico de hipertensión, asimismo, la mayoría presenta algún grado o tipo de complicación derivada del mal control de la enfermedad; el 47.3 % padece de visión disminuida, 38 % neuropatía, 13.9 % daños en la retina, 2 % amputaciones, 1.4 % diálisis y 2.8 % infartos (Fundación MÍDETE, 2016).

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 anterior, 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, tomando en cuenta el porcentaje anterior, 27.5 % no cuentan con protección en salud, 13 % pertenecen al Seguro Popular, 11 % 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 (Federación Mexicana de Diabetes, 2019; Fundación MÍDETE, 2016).

1.3 Antecedentes

A lo largo de la historia humana, se han desarrollado metodologías para la determinación de azúcares en fluidos corporales, los primeros registros sobre la descripción de diabetes datan de 1500 A.C. en Egipto, y las primeras técnicas para estudiar la enfermedad se desarrollaron en el siglo XIX tras el aislamiento de azúcar en el suero de sangre en un paciente diabético por George Rees, posteriormente la metodología a desarrollarse para determinar la concentración de azúcar cuantitativa en pacientes fue en 1908 por Stanley Benedict, midiéndola en la orina con un reactivo con cobre, estableciéndose como la metodología estándar para el monitoreo de la diabetes por más de 50 años. El siguiente gran desarrollo se dio en 1965 cuando un grupo de investigadores en Ames bajo la dirección de Ernie Adams desarrollo la *primer* prueba en seco para la determinación de diabetes con tiras reactivas, Dextrostix, empleando la reacción de la oxidación de la glucosa en una tira papel, permitiendo mediante una reacción colorimétrica realizar una valoración semicuantitativa de la concentración de glucosa en los pacientes, aunque, a pesar de que este método era más sencillo y de uso prácticamente inmediato, contaba con limitaciones y problemas de precisión y confiabilidad (Clarke & Foster, 2012).

Los problemas y limitaciones de los métodos para la determinación de la glucosa en pacientes diabéticos fue el motor para el desarrollo de una prueba automática y electrónica que mejorara la precisión y que proporcionara resultados cuantitativos más confiables, dando lugar a nuevos desarrollos en la década de los 70s, permitiendo así que los pacientes tuvieran la capacidad de poder monitorear por si mismos sus niveles de glucosa, sin embargo, seguían surgiendo complicaciones con la mejora de los dispositivos; no fue hasta el año 1987 que se comercializó el *primer* biosensor de glucosa con base en una reacción enzimática, el cual contenía la enzima glucosa oxidasa y un sustituto de oxígeno, ferroceno; esto permitió que los glucómetros fueran más compactos y portátiles, en formatos como una pluma o con la forma una tarjeta de crédito, con una alta precisión y confiabilidad (con una desviación permisible de hasta el 15 % respecto a las pruebas estándar de laboratorio). Eventualmente, mejoras tecnológicas fueron dando lugar a los glucómetros que conocemos en el presente, con la misma plataforma tecnológica del biosensor de glucosa en sangre de

1987, simplemente, con menores pasos y más automatización, aunque, con los mismos problemas: no contar con un volumen suficiente de muestra, imprecisión en la sincronización en la aplicación y remoción de la muestra de la tira reactiva, imprecisión en la técnica de limpieza, errores en la calibración, falta de mantenimiento y problemas en el control de calidad (Clarke & Foster, 2012).

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**).

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, poca o nulamente 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). La glucosa puede ser determinada en otros fluidos además de la sangre en rangos ya estandarizados para personas diabéticas (**Tabla 2**), además, existen algunas aproximaciones en donde se emplean fluidos similares 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 al mismo margen, 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

Se ha estimado que la carga económica de la diabetes para la economía Mexicana fue de 362,859.82 millones de pesos en el 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 Secretaria 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. Sin embargo, desde la última década del siglo pasado la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió proyecciones del incremento de la población mundial con diabetes para el 2025 (King, Aubert, & Herman, 1998). En los estudios realizados por King & Rewers en 1993, México se colocó en el 9° lugar, esperando que para el 2025 ocupe el 7° lugar mundial con 11.7 millones de habitantes con algún tipo de diabetes, además en el reporte emitido por la Federación Internacional de la Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), en el 2017, ya se había superado la cifra proyectada para el 2025 por parte de la OMS con 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, ocupando el quinto lugar mundial con prevalencia a dicha condición (International Diabetes Federation, 2017).

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 de las propiedades y parámetros cinéticos antes mencionados, la enzima se encuentra ampliamente estudiada, por lo que las enzimas de *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). 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 la proteína GOD mediante amplificación por PCR. Para lograr obtener el gen, se diseñó un par de *primers* con regiones homólogas al vector de expresión (**Anexo 13**) y así insertar *god* en el sitio múltiple de clonación mediante la técnica de *overlap extension* PCR, facilitando así el proceso, sin la necesidad de utilizar enzimas de restricción o de ligación (Bryskin & Matsumura, 2010).

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:

- Cultivo de *A. niger*.
- Extracción de gDNA de *A. niger*.
- Amplificación de *god*.
- Purificación del gen.
- Clonación de *god* en vector pPIC9K por *overlapping* PCR.
- Transformar *Escherichia coli* con vector pPIC9K-GOD.
- Identificar y aislar transformantes de *E. coli* pPIC9K-GOD.
- Transformar *Pichia pastoris* SMD1168 con vector pPIC9K-GOD.
- Identificar y aislar transformantes de *P. pastoris* pPIC9K-GOD.
- Caracterizar transformantes de *P. pastoris* pPIC9K-GOD.

- Caracterizar producción de GOD por *P. pastoris* transformada.
- Producir y purificar GOD.
- Caracterizar propiedades fisicoquímicas y cinéticas de 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 purificación del gen de GOD 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 12:00 a 15:00 horas.
- Martes de 11:00 a 15:00 horas.
- Miércoles de 14:0 a 15:00 horas.
- Jueves de 9:00 a 15:00 horas.
- Viernes de 9:00 a 19:00 horas.

Se dio seguimiento puntual del proyecto cuando se requirió la validación de las estrategias experimentales, así como para el análisis de resultados para de ser necesario, realizar modificaciones o de lo contrario proceder con las siguientes etapas experimentales. Las metodologías, registro de las actividades y observaciones se encuentran en los **Anexos B, M1, M2, P1, P2 y O.**

Se desarrollaron 9 metodologías adaptadas a la disponibilidad de materiales y equipo disponibles en el laboratorio (**Anexos M1, M2**) para la estandarización de la extracción de gDNA de *A. niger* con base en la extracción y reactivos empleados por González-Mendoza, y otros (2010) para los procedimientos 1, 6, 8 y 9, el Manual de Prácticas de Biología Molecular de Otoño del 2017 del ITESO para los procedimientos 2, 3, 4, la metodología descrita por Harju, Fedosyuk, & Peterson (2004), para el procedimiento 5, el método empleado por Lee, Araki, Sowersby, & Lewis (2012). Las muestras con resultados positivos fueron empleadas para llevar cabo la amplificación del gen de GOD por PCR.

Para llevar a cabo la determinación cualitativa de ácidos nucleicos se 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 fotocumendador 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.

En lo que respecta a la amplificación del gen de GOD por PCR (PCR 1), se llevó a cabo la amplificación de *god* de *A. niger* Z-25 por PCR en un termociclador Aeris (ESCO, SGP), las mezclas de reacción se prepararon de acuerdo con las especificaciones del manual de la DNA polimerasa *Phusion* y *TaKaRa* (Takara Bio Inc, 2018) (**Tabla 3**) y se elaboró el termograma de acuerdo con el protocolo de 3 pasos del manual de la DNA polimerasa *Phusion*.

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	50-250 ng
DNA Polimerasa <i>Phusion</i> / <i>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

Referente al diseño del termograma se tomó en consideración para la temperatura de hibridación el promedio de la T_m de ambos *primers* (**Tabla 4**) -5°C, con un tiempo de hibridación de 30 s por la complejidad de la hebra molde, con un tiempo de elongación de 60 s por 1 kb dada la longitud (1.8 kb) y complejidad de la hebra molde a 72°C, con un ciclo de elongación final de 10 minutos a 72°C y una de almacenamiento de muestra de 4°C (**Tabla 5, Figura 1**).

Tabla 4. Propiedades de los primers calculadas con Serial Cloner.

Primer	Secuencia	Longitud (bp)	GC%	T _m (región complementaria al gen de GOD)	Observaciones
Forward	ATGCAGACTCTCCTTGAGC	36	52.38	61.3	5'AOX1
Reverse	TCACTGCATGGAAGCATAATCCG	38	47.83	62.9	3'AOX1

Tabla 5. Condiciones para PCR del gen de GOD.

Paso del ciclo		Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial		98	30 s	1
Desnaturalización		98	10 s	
PCR 30 ciclos	Hibridación	57.8	30 s	30
	Extensión	72	1 min	
Extensión final		72	10 min	1
		4	∞	

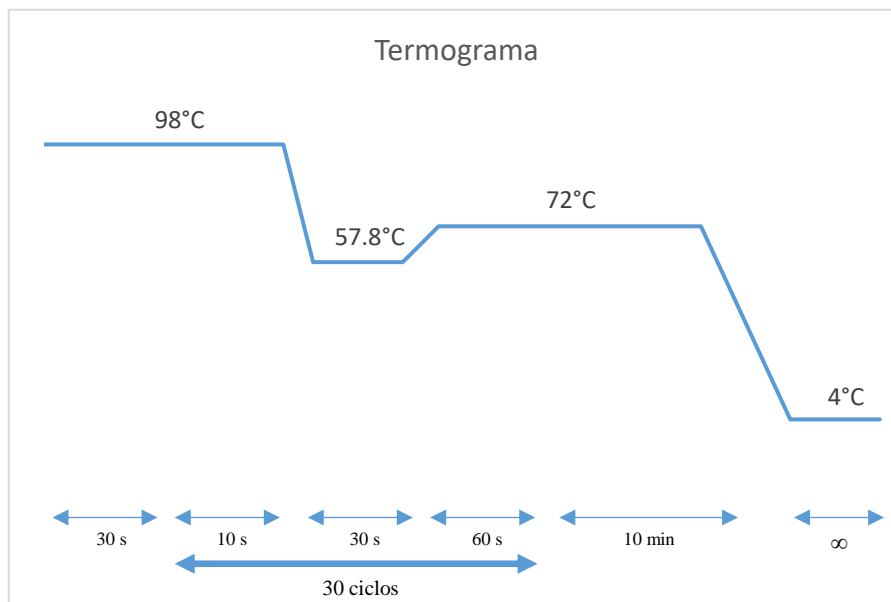


Figura 1. Termograma de la reacción de amplificación de *god* por PCR.

Una de las sugerencias del manual de la DNA polimerasa *Phusion*, menciona que una estrategia que puede ser útil para lograr amplificar el gen es optimizar la temperatura de hibridación, sin embargo, este proceso requiere de experimentación y una cantidad considerable de recursos, se puede optar por una estrategia diferente a la PCR convencional, por ejemplo, *Stepdown* (SD) PCR, la cual es una versión simplificada de *Touchdown* (TD) PCR, donde, la temperatura de hibridación inicial se programa con un valor considerablemente superior a la temperatura de hibridación estimada de ambos *primers*, para así asegurar una hibridación altamente específica, aunque el rendimiento sea bajo, tras realizar esto, se programa un gradiente de disminución de la temperatura de hibridación en diferentes pasos de la PCR con múltiplos definidos, si el gradiente es pequeño se considera como una TD PCR y si el paso es mayor se considera como SD PCR

(Hecker & Roux, 1996). La aproximación más sencilla de abordar es la SD PCR, que para en este caso se llevó a cabo una PCR de 30 ciclos con un gradiente de disminución de la temperatura de hibridación de 6°C cada 10 ciclos, las temperaturas y tiempos de los procesos de desnaturalización, hibridación, y extensión del termograma, fueron tomadas según las recomendaciones del manual de la DNA polimerasa *Phusion* (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones para SD PCR del gen de GOD.

	Paso del ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
	Desnaturalización inicial	98	30 s	1
	Desnaturalización	98	1 min	
	Hibridación	57.8	2 min	10
	Extensión	72	3 min	
PCR 30 ciclos	Desnaturalización	98	1 min	
	Hibridación	51.8	2 min	10
	Extensión	72	3 min	
	Desnaturalización	98	1 min	
	Hibridación	45.8	2 min	10
	Extensión	72	3 min	
	Extensión final	72	10 min	1

Se llevó a cabo la optimización de la amplificación de *god* por TD PCR modificando la concentración de primer en una primera etapa (0.20, 0.6 y 1.0 mM), y la temperatura de hibridación inicial en una segunda etapa (76, 72 y 68°C), para la polimerasa *Phusion* y *TaKaRa*, por triplicado, modificando el termograma para una PCR de 41 ciclos, con una etapa de disminución de la temperatura de 16 ciclos y una etapa de extensión a la temperatura de hibridación calculada de los *primers* a 57.8°C (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones para la optimización de PCR del gen de GOD.

Paso del ciclo	Temperatura (°C)	ΔT (°C/ciclo)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98		30 s	1
Desnaturalización	98		10 s	
Hibridación inicial	76/72/68	-1.0	30 s	16
Extensión	72		1 min	
PCR 41 ciclos	Desnaturalización	98	30 s	
	Hibridación	57.8	10 s	25
	Extensión	72	30 s	
Extensión final	72		10 min	1 min

Una vez que se logro la amplificación del gen, se llevó a cabo la purificación del producto de la amplificación para eliminar la presencia de primer y de los componentes residuales de la mezcla de la reacción de PCR, para ello 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) posteriormente se escindió la banda de interés del gel y se colocó en un microtubo. Se pesó el fragmento y se verificó que su peso sea inferior a 200 mg. Se adicionaron 200 μ L de buffer NTI por cada 100 mg de muestra y se incubó a 50°C durante 10 minutos, homogenizando la muestra cada 2 minutos. Se colocó una columna NucleoSpin® nueva en un microtubo de 2 mL y se adicionó la muestra (máx 700 μ L), 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 a 70°C de 2-5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó 30 μ L 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 uso.

3. Resultados del trabajo profesional

Se llevó a cabo la estandarización de la metodología para la extracción de gDNA de *A. niger* mediante los distintos procedimientos propuestos y se enlistaron los resultados con las principales características de cada ensayo (**Tabla 8**).

Tabla 8. Resultados de diferentes metodologías de extracción de gDNA.

Procedimiento	Características principales	gDNA positivo	Observaciones
1	Método químico	No	RNA
2	Método físico y químico, extrusión en mortero	Sí	Degradación
3	Método químico e incubación a -20°C de muestra	Sí	Degradación
4	Método químico, sobrenadante e incubación a -20°C de muestra	No	Ausencia de resultados
5	Método físico y químico "rápido", incubación de muestra a 95°C	Sí	Degradación
6	Método físico y químico, incubación de muestra a 65°C, pausas en hielo	Sí	Banda definida
7	Método enzimático y químico	No	Ausencia de resultados
8	Método físico y químico, incubación de muestra a 95°C	No	Ausencia de resultados
9	Método enzimático y químico /Método físico y químico, incubación de muestra a 65°C, pausas en hielo	Sí	Banda definida

En la mayoría de los casos no se logró la extracción de gDNA por múltiples razones, sin embargo, dentro de las principales se encuentra la resistencia de la estructura celular del hongo especialmente debido a la quitina de la matriz extracelular, ya que es uno de los compuestos más insolubles encontrados en la naturaleza (Fesel & Zuccaro, 2016) (**Anexo 14**), otra causa probable es la actividad endonucleasa del mismo hongo y de los componentes del medio de cultivo, Wilson (2003) menciona que a pesar de que los procesos de separación y purificación de gDNA pueden involucrar lisis enzimáticas, uso de proteasas y separación y precipitación por solventes, pueden o no ser efectivos en la remoción de exopolisacáridos, los cuales interfieren con la actividad de diferentes enzimas. por otro lado, uno de los parámetros críticos para el aislamiento de gDNA de alto peso molecular es el estrés cortante y la actividad de las nucleasas, los extractos deben de ser tratados con especial cuidado para minimizar el estrés cortante y cuando la muestra posee una alta actividad nucleasa la muestra debe de ser congelada rápidamente y atemperado sólo en la presencia de un buffer de extracción que contenga detergente y altas

concentraciones de EDTA (Eric, Reichardt, & Rogers, 2003), lo anterior puede explicar por qué sólo se lograron resultados positivos en la metodología que implicaba un método abrasivo para la disrupción celular, con pausas entre cada etapa del proceso (**Figura 1**); la muestra M6-L se empleó para amplificación por PCR (Experimentos de PCR: 1, 2-SD1, 3-SD2, 4-TD1).

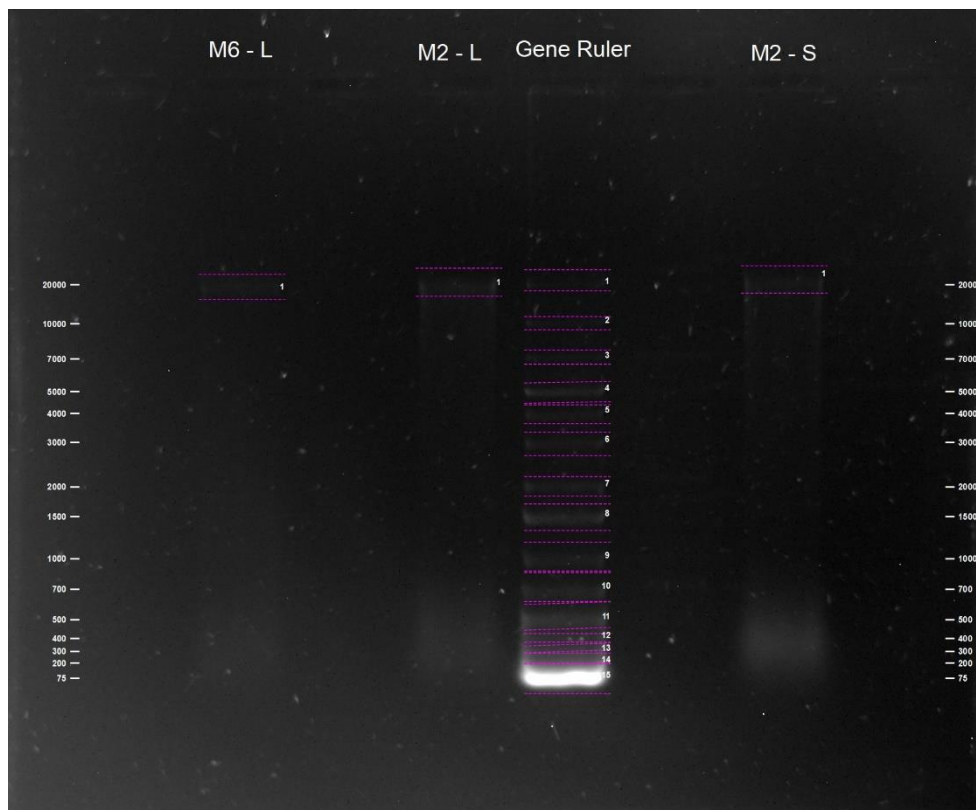


Figura 2. Resultados de la extracción de gDNA procedimiento 6. Gene Ruler: Gene Ruler 1 kb DNA Plus Ladder (Thermo Scientific, 2016); M6-L: Metodología 6, cultivo líquido; M2-L: Metodología 2, cultivo líquido; M2-S: Metodología 2, cultivo sólido.

Otra razón por la que no se obtuvieron resultados positivos es debido a la edad del cultivo del hongo ya que este tenía mucho tiempo en estado vegetativo y la actividad celular se encontraba en un estado basal orientado al mantenimiento celular, por lo anterior, se probó la extracción de gDNA con la metodología adaptada de González-Mendoza, y otros (2010), el método de Lee, Araki, Sowersby, & Lewis (2012), extrayendo el gDNA de muestras de un cultivo fresco en diferentes días de cultivo, día 1, día 2 y día 3 (**Figura 2**). la muestra M5-D2 se empleó para amplificación por PCR (Experimentos de PCR: 5-TD2, 6-TD3, 7-TD4, 8-TD5).

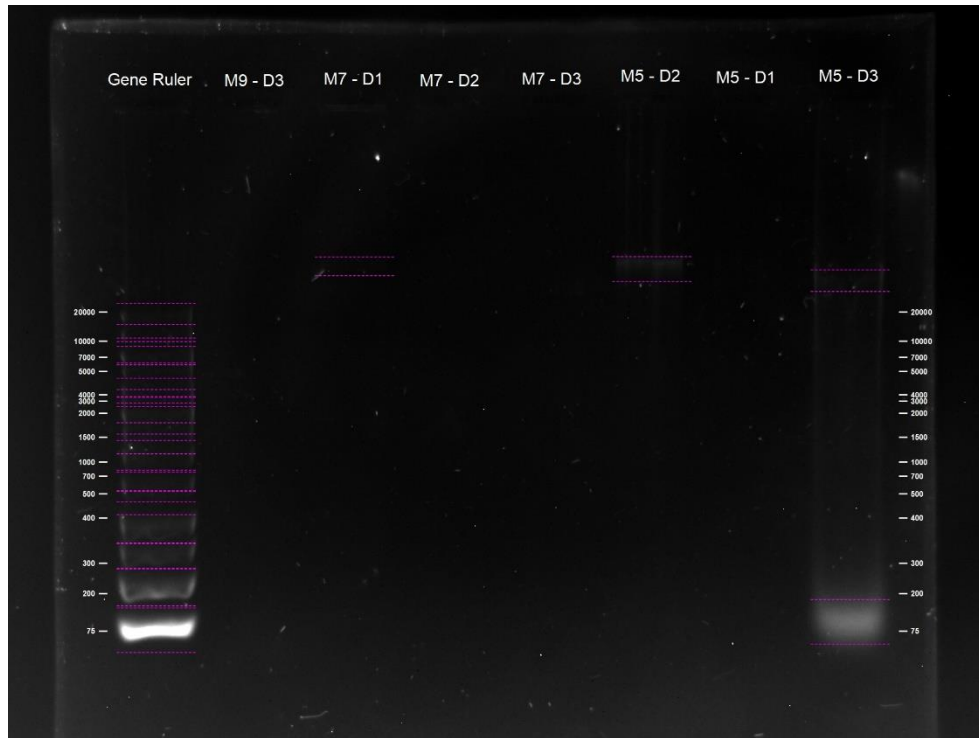


Figura 3. Resultados de la extracción de gDNA procedimiento 6. Gene Ruler: Gene Ruler 1 kb DNA Plus Ladder (Thermo Scientific, 2016); M9-D3: M9-D3, Metodología 9, día 3; M7-D1: Metodología 7, día 1; M7-D2: Metodología 7, día 2; M7-D3: Metodología 7, día 3; M5-D2: Metodología 5, día 2; M5-D1: Metodología 5, día 1; M5-D3: Metodología 5, día 3.

Una vez concluida la reacción de PCR se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para detectar la presencia del producto de PCR (**Figura 4**); no se detectó la presencia del producto de la amplificación en ninguna muestra para ninguna de las reacciones de PCR.

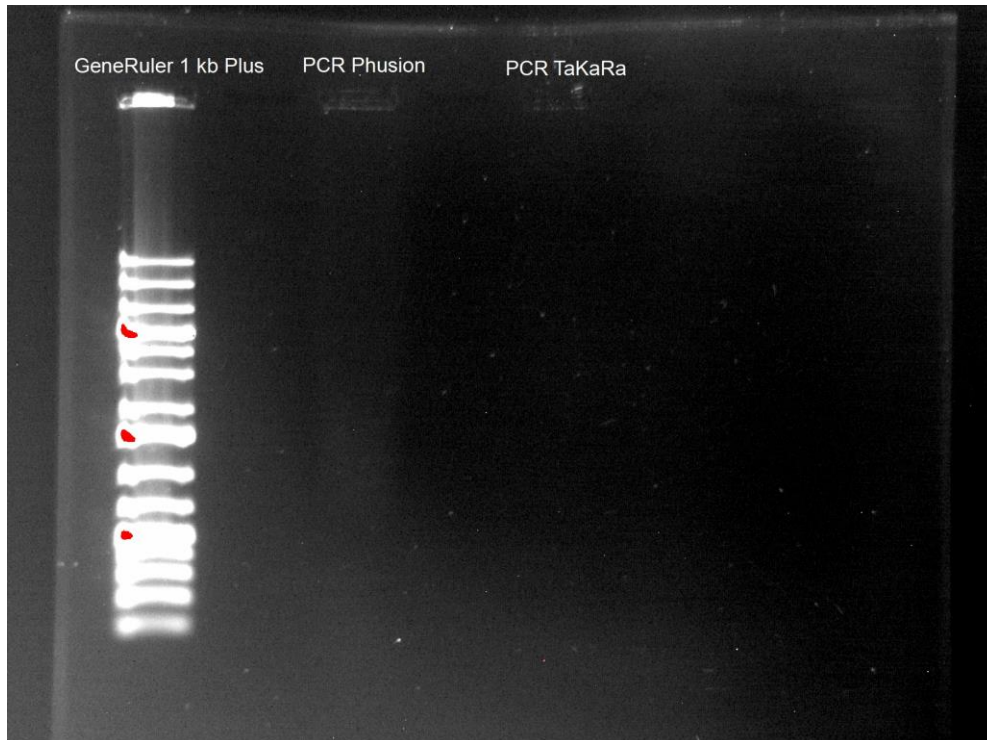


Figura 4. Resultados de la amplificación del gen de GOD por PCR (PCR 1). En el pocillo 1 se encuentra el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 2016), en el pocillo 3 se encuentra el producto de amplificación llevado a cabo con la mezcla de reacción para la DNA polimerasa *Phusion*, en el pocillo 5 se encuentra el producto de reacción de la amplificación llevado a cabo con la mezcla de la reacción para la DNA polimerasa *KaTaRa*.

De acuerdo con el manual de usuario de la DNA polimerasa *Phusion* las potenciales razones por las cuales no se obtuvo producto de la amplificación del gen, pueden ser una baja concentración de hebra molde, daño en la hebra molde, una temperatura de desnaturalización de la hebra molde baja, así como un tiempo de desnaturalización inadecuado, una temperatura de hibridación adecuada, o una baja concentración o pureza de los primers, lo que es probable ya que la concentración era 1×10^{-8} órdenes de magnitud menor que la recomendada, sin embargo, esta aproximación fue sugerida debido a que los primers poseen regiones que pueden provocar que hibriden entre ellos o consigo mismos (Jullien, 2008) (**Figura 4**).

```

Forward  AGCTTACGTAGAATTATGCAGACTCTCCTTGTGAGC
          |||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
Reverse  CGAGTGTTCCTCTCAGACGTATTAAGATGCATTCTGA

```

Figura 5. Hibridación entre el primer Forward y Reverse diseñados para la amplificación del gen GOD.

La estrategia de SD PCR no fue útil para lograr una amplificación positiva, por lo cual se optó por llevar a cabo una optimización de las concentraciones y las temperaturas de hibridación de los *primers* por TD PCR para tener un mayor grado de sensibilidad de las mejores condiciones. Tras la adición de 1.4 mM de MgCl₂ a la mezcla de reacción de PCR, la preparación de stocks frescos de reactivos para PCR y el uso de una concentración de *primers* de 2 y 0.4 μM, sumados a una temperatura inicial de hibridación de 74°C en una TD PCR, se consiguió la amplificación del gen deseado, coincidiendo con la banda de peso molecular del Gene Ruler de 2 kb (**Figura 4**).

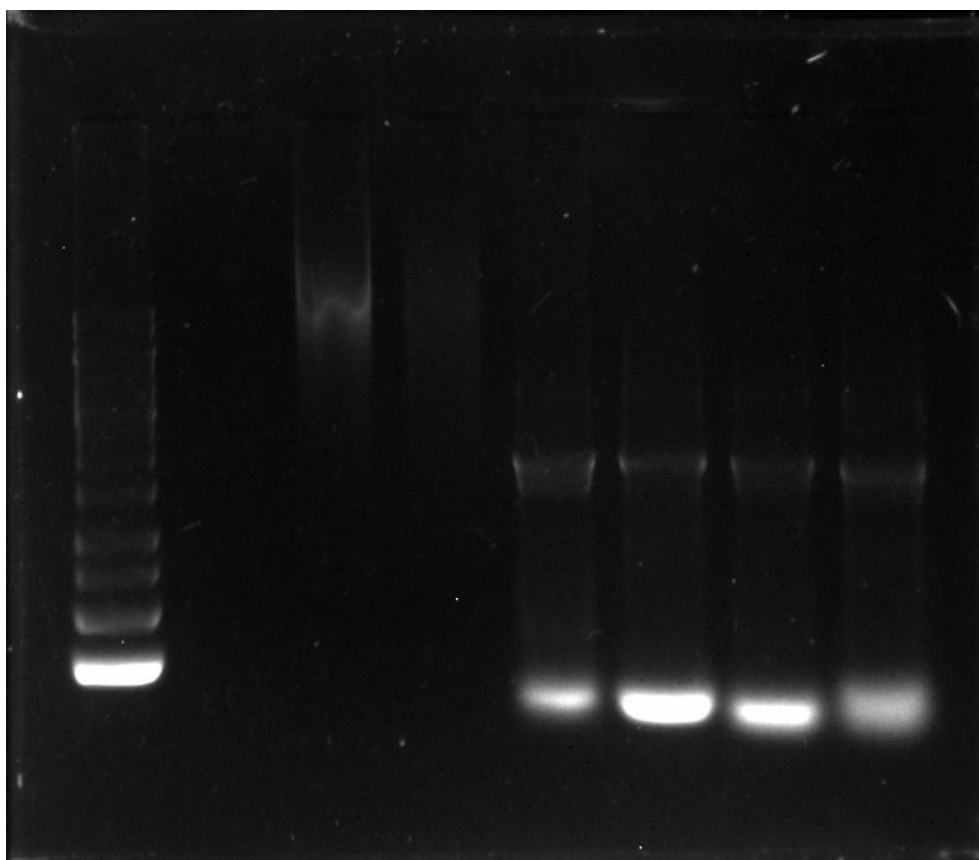


Figura 6. Resultados de la PCR 8-TD5. Gene Ruler: Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 2016): M5-D2: ; Phu-20; Producto de PCR de reacción con polimerasa *Phusion* y concentración final de primers 0.4 μM; Phu-100; Producto de PCR de reacción con polimerasa *Phusion* y concentración final de primers 2.0 μM; TaK-20; Producto de PCR de reacción con polimerasa *TaKaRa* y concentración final de primers 0.4 μM; TaK-100; Producto de PCR de reacción con polimerasa *TaKaRa* y concentración final de primers 2.0 μM.

Una vez que se amplificó el gen, se llevó a cabo la purificación del producto de PCR utilizando el kit comercial NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Alemania),

siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante (MACHEREY-NAGEL, 2017). Se separó el producto de amplificación TaK-20 en un gel de electroforesis de agarosa al 0.7% (p/v) y se concentró el producto de la purificación en un volumen de 30 μ L de Elution Buffer, una vez concluido el proceso, se llevó a cabo una electroforesis de ácidos nucleicos par comprobar la separación del producto de los *primers* (**Figura 7**).

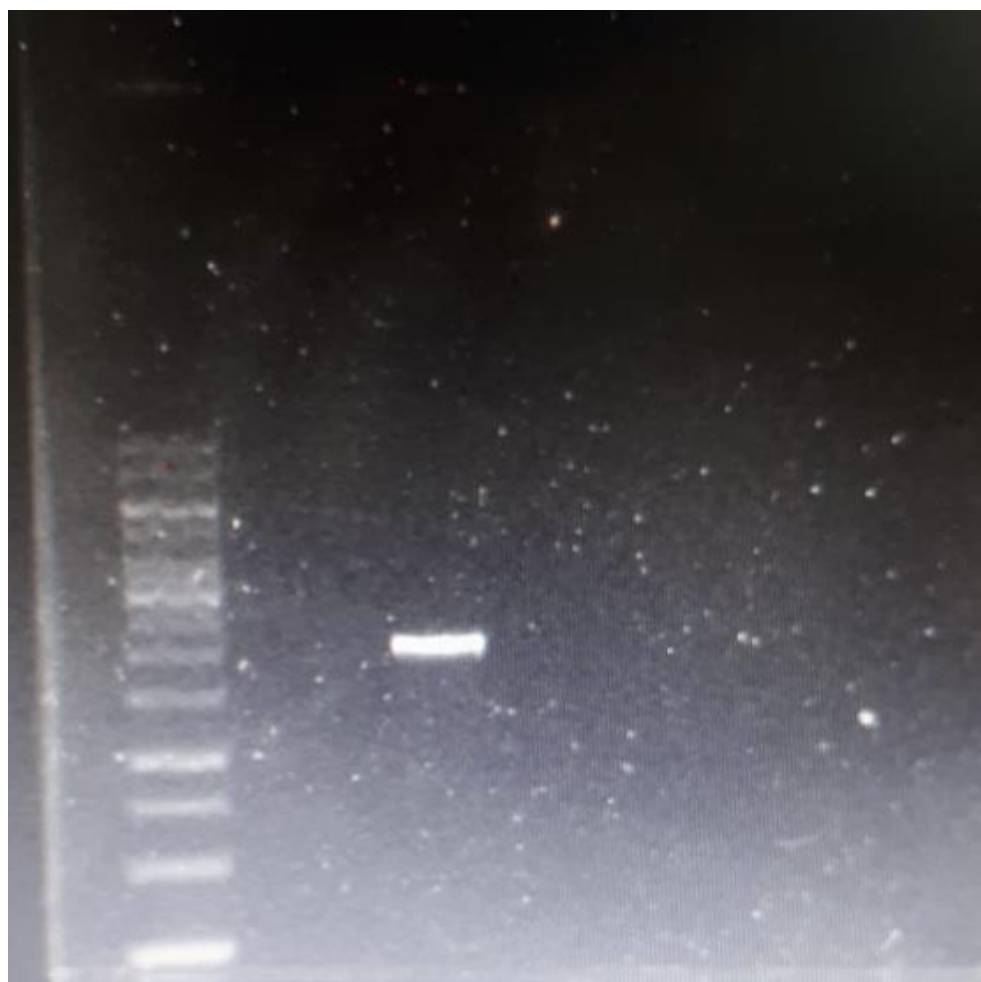


Figura 7. Resultados de la purificación del producto de PCR de la muestra TaK-20. Pocillo 1: Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 2016); GOD-1; Producto de PCR de reacción con polimerasa TaK-20 purificado y concentrado.

Una vez que se confirmó la limpieza del producto de PCR de TaK-20, se almacenó la muestra a -20°C hasta su posterior uso para continuar con el proceso de optimización de PCR.

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, Ingeniería genética, Contexto Histórico y Social, Desarrollo y Administración de Proyectos, Innovación y Emprendimiento y Modelos de Negocios, además, se pusieron en práctica y mejoraron las habilidades relacionadas con la investigación para la solución de la experimentación con ácidos nucleicos, tanto para muestras de DNA fúngico, como para los procedimientos relacionados con la amplificación de genes. Por otro lado, también se pusieron en práctica las habilidades de investigación y contextualización de problemáticas sociales para abordarlos en sus dimensiones sociopolítico-económicas, así como, profesiones y áreas de conocimiento que al parecer están muy alejados de las ciencias sociales, como lo es la Ingeniería en Biotecnología, desde sus saberes puede aportar y contribuir mediante la interdisciplinariedad e innovación abierta.

Dentro de los saberes más significativos de la problemática abordada desde el proyecto, se encuentran la magnitud del problema, su causa raíz, sus implicaciones y sus consecuencias, en especial para la salud de las personas y para la economía del país, es sorprendente que se destine un mayor porcentaje del PIB a el tratamiento de los problemas relacionados con las complicaciones de las diabetes, que a la investigación y desarrollo; esto nos demuestra que en México nos equivocamos al intentar solucionar las consecuencias de los problemas en lugar de sus causas, ya que si se destinaran más recursos a implementar educación sobre buenos hábitos alimenticios en las poblaciones vulnerables y marginadas, aunado a una mayor inversión en investigación y desarrollo aplicado, las estadísticas y las consecuencias del problema serían otras, sin embargo, esfuerzos como el de este proyecto deben de ser suplementados con propuestas de mejora a las políticas públicas y propuestas para cambiar cómo es que tratamos con los problemas en México.

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.

Es claro que cuando los profesionales de las ciencias sociales como las exactas trabajan juntos dentro de sus nichos de conocimiento pueden desarrollar e implementar soluciones a problemas que pueden ser de utilidad, sin embargo, cuando trabajan en colaboración sus capacidades se ven potenciadas por el trabajo con el otro y su aportación, ya que somos seres finitos y aunque poseamos grandes capacidades de aprendizaje y de aplicación, nuestro alcance se verá limitado a nuestros conocimientos y capacidad humana. Tras esta

experiencia, queda como consigna personal continuar colaborando con personas de distintos contextos para solucionar problemas de la vida real, ya que existen necesidades urgentes en el país y en el mundo que tienen que ser solucionadas antes de que las consecuencias sean irreversibles.

5. Conclusiones

En el desarrollo del proyecto se llevó a cabo de forma exitosa el aislamiento, amplificación y purificación del gen de la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* para el diseño de un biosensor no invasivo de glucosa para el monitoreo preventivo y de tratamiento de la diabetes, con el objetivo de mejorar su calidad de vida. Se presentaron múltiples obstáculos durante el desarrollo del proyecto, sin embargo, mediante la investigación y solución de problemas se lograron superar con éxito, sin embargo, 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.
- Clarke, S. F., & Foster, J. R. (2012). A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. *British Journal of Biomedical Science*, 6(2), 83-93.
- Eric, R., Reichardt, M., & Rogers, S. (2003). Preparation of Genomic DNA from Plant Tissue. En F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology* (págs. 2.3.1-2.3.7). New York: John Wiley & Sons.
- 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/>

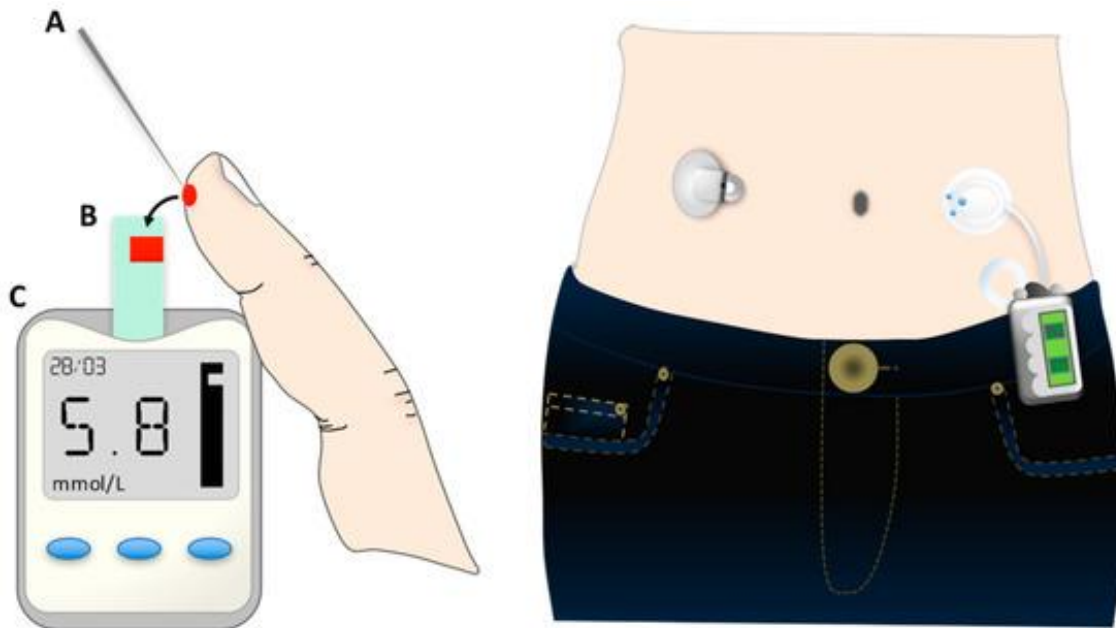
- Fesel, P. H., & Zuccaro, A. (2016). β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology*, 90(1), 53-60.
- Fundación MÍDETE. (2016). *Asumiendo el Control de la Diabetes*. México: Fundación Mídete A.C.
- González-Mendoza, D., Argumedo-Delira, R., Morales-Trejo, A., Pulido-Herrera, A., Cervantes-Díaz, L., Grimaldo-Juarez, O., & Alarcón, A. (2010). A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 162-166.
- Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BioMed Central Biotechnology*, 4(8). doi:10.1186/1472-6750-4-8
- Hecker, K. H., & Roux, K. H. (1996). High and Low Annealing Temperatures Increase Both Specificity and Yield in Touchdown and Stepdown PCR. *BioTechniques*, 20(3), 478-485.
- 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.
- Jullien, N. (2008). AmplifX 1.5.4. Francia.
- King, H., Aubert, R. E., & Herman, W. H. (1998). Global Burden of Diabetes, 1995-2025. *Diabetes Care*, 21(9), 1414.
- Lee, C. K., Araki, N., Sowersby, D. S., & Lewis, L. K. (2012). Factors affecting chemical-based purification of DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 29(2), 73-80.
- MACHERY-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., & Chaubey, 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 Inc. (26 de Abril de 2018). *TaKaRa PCR Amplification Kit*. Obtenido de Takara Taq PCR kit: <https://www.takarabio.com/products/pcr/standard-pcr/takara-taq-products/takara-taq-pcr-kit>

- Tejeda, A., Montesinos, R. M., & Guzmán, R. (2011). Una Perspectiva de las Bioseparaciones. En *Bioseparaciones* (págs. 1-30). México: Pearson.
- Thermo Fisher Scientific. (2017). *Tm Calculator*. Obtenido de Thermo Scientific Web Tools: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>
- 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
- 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.
- Vázquez Álvarez, A. O. (21 de Septiembre de 2018). *El mejor tratamiento para las complicaciones de la diabetes... ¡La prevención!* Recuperado el 14 de Mayo de 2019, de Federación Mexicana de Diabetes, A.C.: <http://fmdiabetes.org/diabetes-prevencion/>
- Wiebea, J. C., Wägnera, A. M., & Novoa Mogollóna, F. J. (2011). Genética de la diabetes mellitus. *Nefrología*, 2(1), 1-119.
- Wilson, K. (2003). Preparation of Genomic DNA from bacteria. En F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology* (págs. 2.4.1-2.4.5). New York: John Wiley & Sons.
- 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.

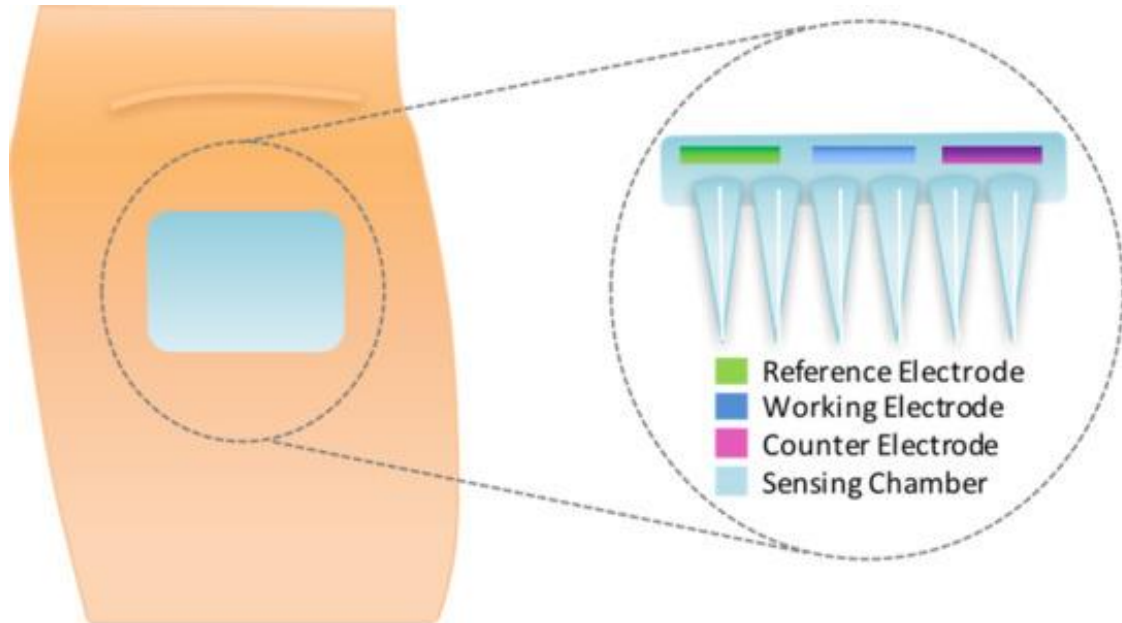
6. Anexos (en caso de ser necesarios)



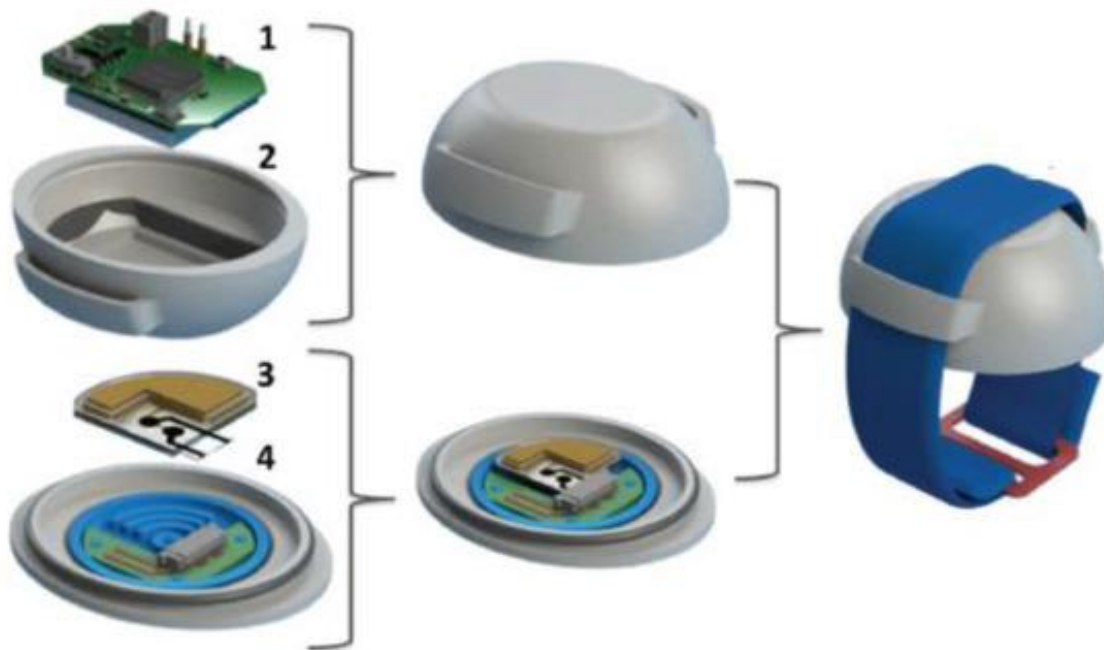
Anexo 1. Costos asociados del tratamiento de la diabetes (Federación Mexicana de Diabetes, Niveles de Glucosa en Sangre y Automonitoreo, 2015).



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).

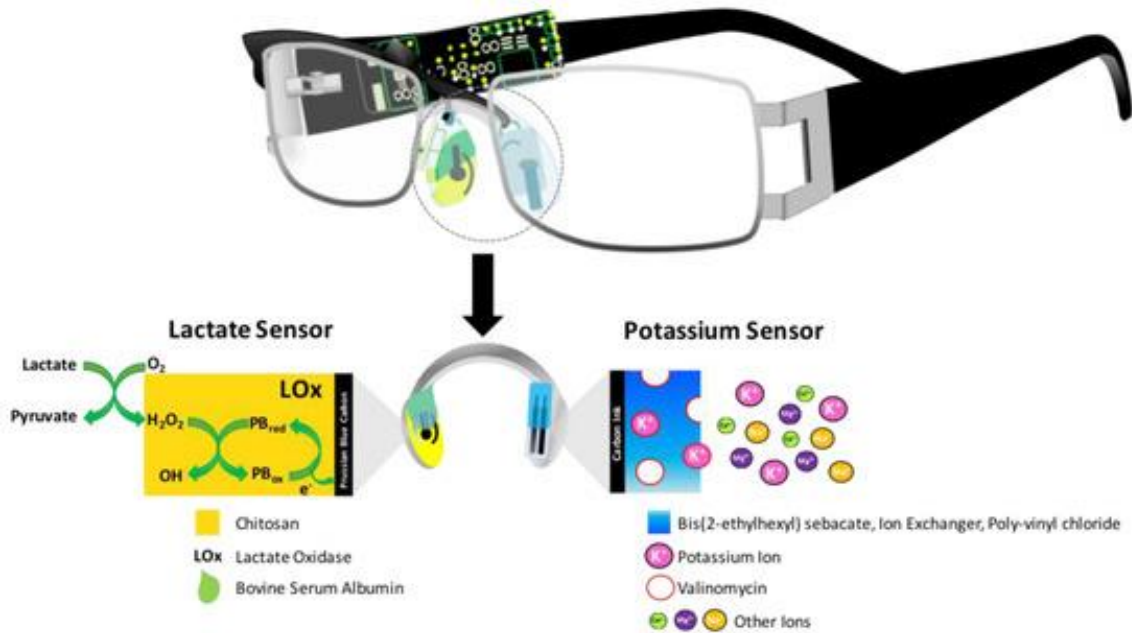


Anexo 3. Esquema de un parche para el antebrazo sensor de glucosa de microagujas (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).

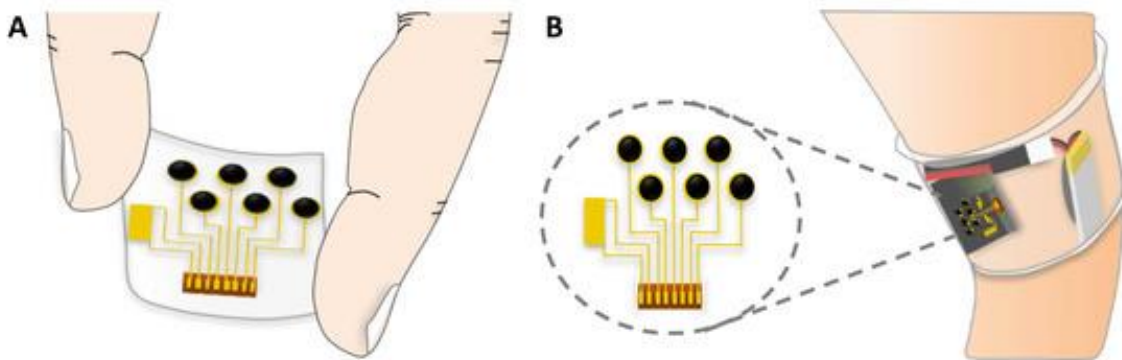


Anexo 4. SwEatch: plataforma de reloj-sensor para la determinación de sodio en el sudor. 1. Electrónica.

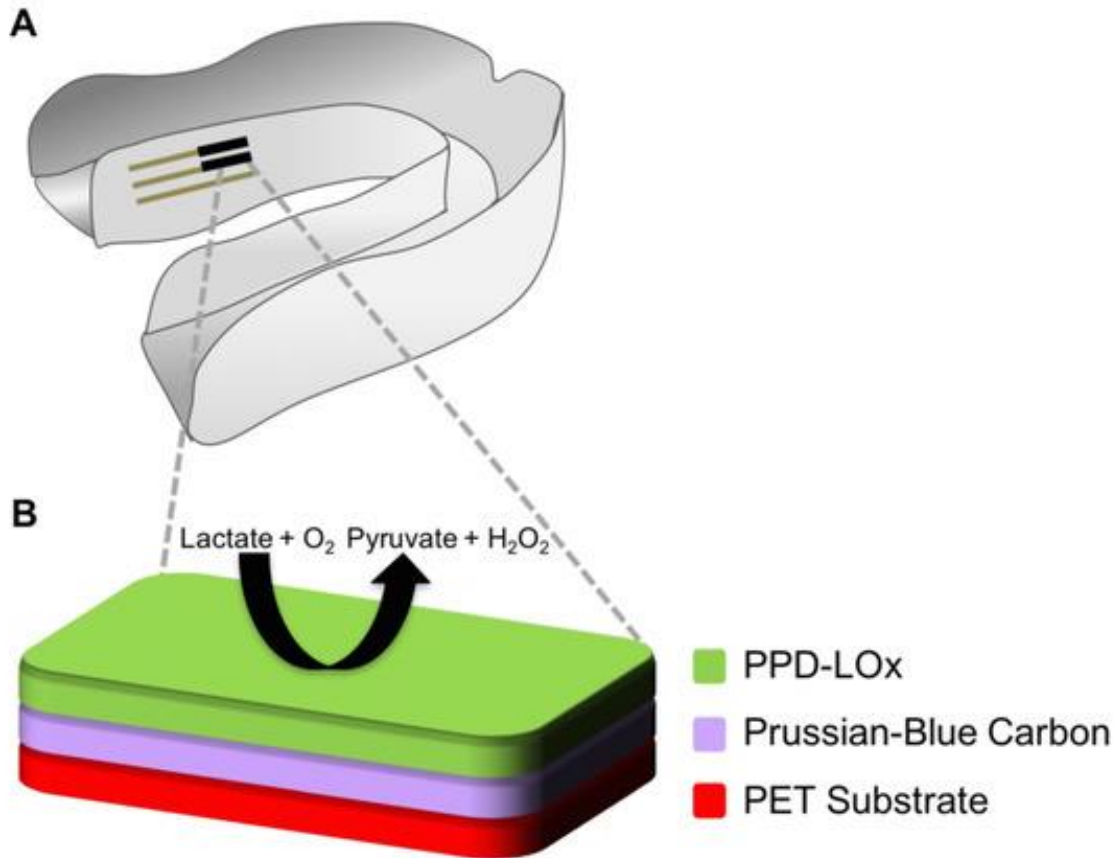
2. Molde impreso en 3D. 3. Chip de microfluídica y electrodo ion-específico/ion-selectivo 4. Cosechador de sudor impreso en 3D y sus conexiones (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).



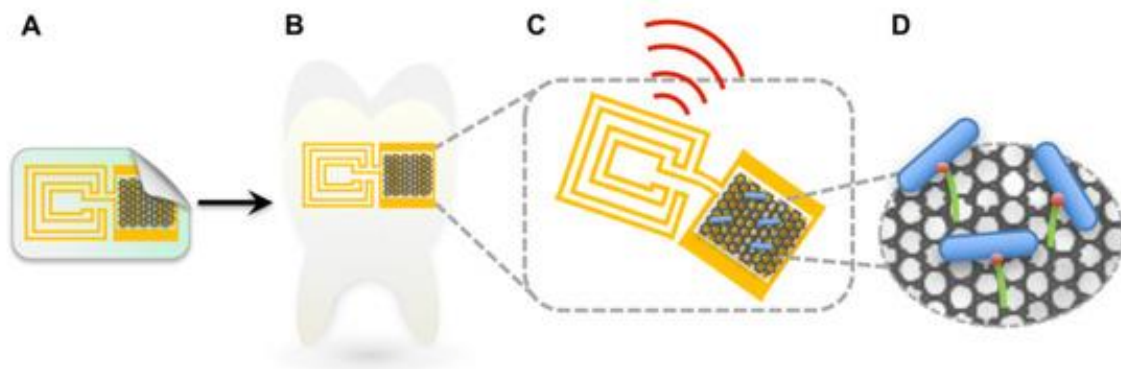
Anexo 5. Esquema de la representación de sistema de biosensor en anteojos, en el cual se integra una tarjeta de circuito inalámbrica a lo largo de las patas de los anteojos y dos sensores electroquímicos de lactato y potasio en los soportes para la nariz. Esquema de el sensor de lactato (izquierda) y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



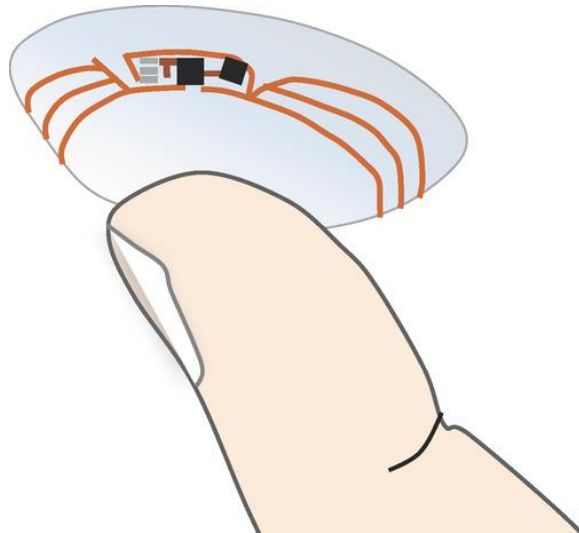
Anexo 6. A. Sensor flexible de glucosa. B. Sensor de glucosa integrado a una banda portable para el monitoreo no invasivo de glucosa en sudor (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).



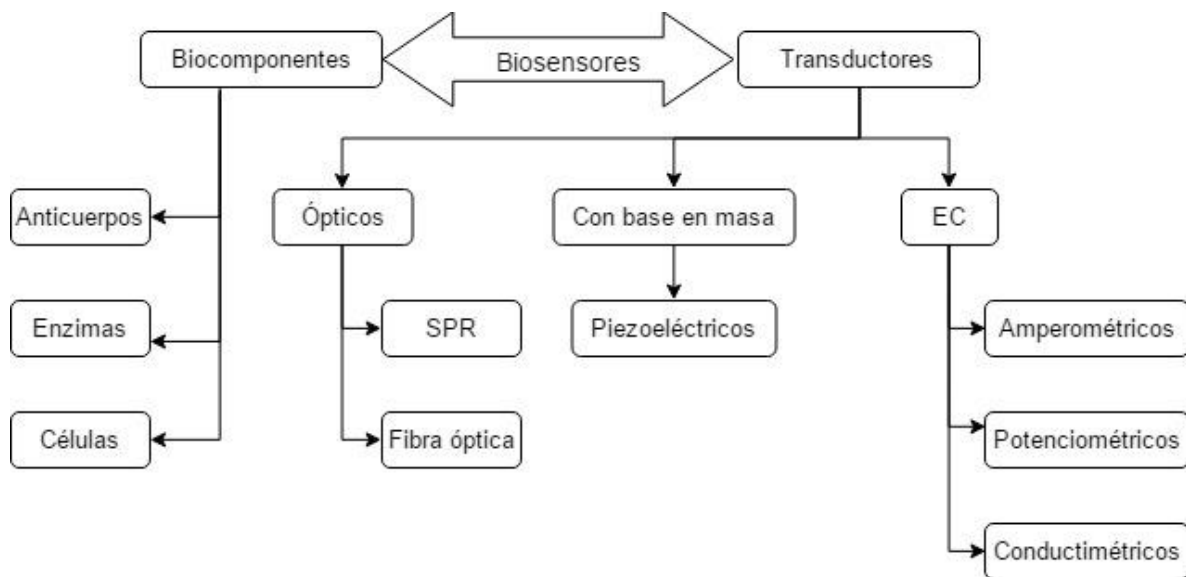
Anexo 7. Guarda sensora de lactato para el monitoreo no invasivo de lactato en saliva. **(A)** Plataforma de guarda sensora mostrando el sistema de electrodo integrado impreso en 3D, con una enzima lactasa inmovilizada en el electrodo de trabajo. **(B)** Representación detallada del electrodo de trabajo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



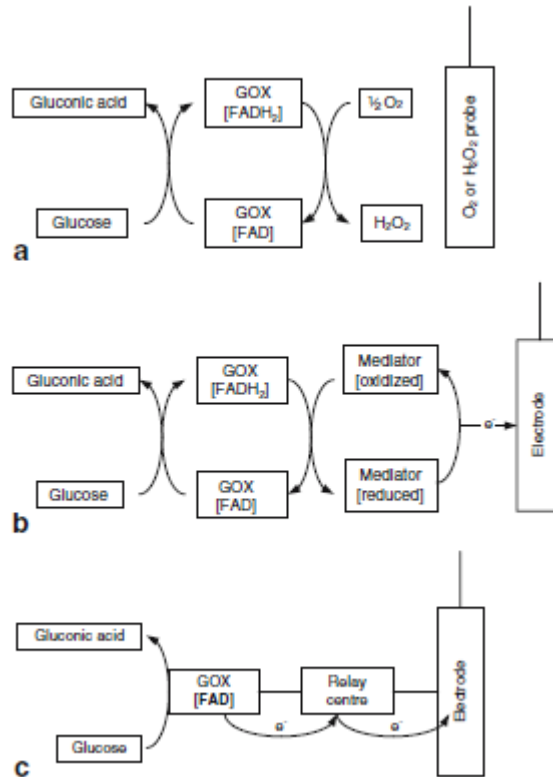
Anexo 8. Sensor de glucosa tatuado en un diente como plataforma de un dispositivo no invasivo para el monitoreo de glucosa. **(A)** Grafeno impreso en seda bio-adsorbente que contiene un cable inalámbrico; **(B)** Sensor bio-transferible al esmalte del diente; **(C)** Ampliación de la unidad de detección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



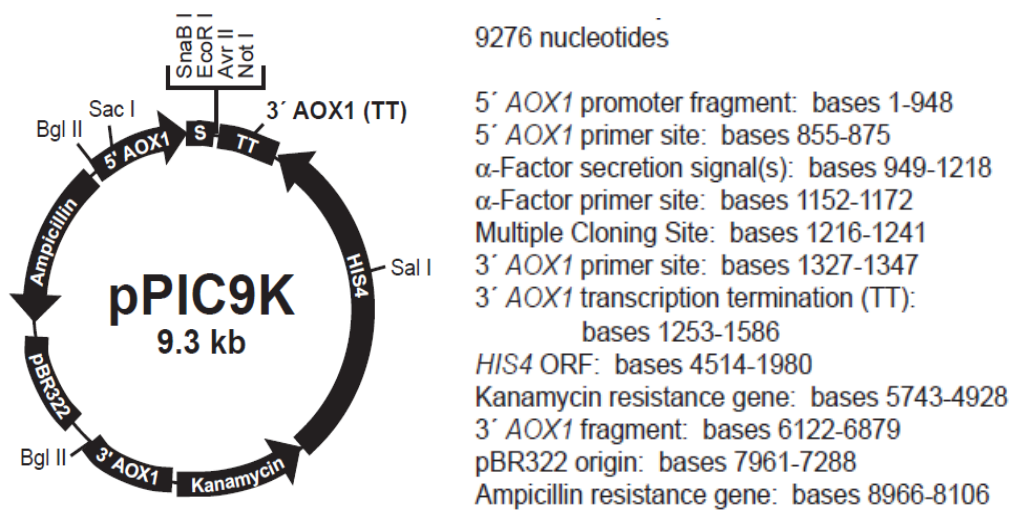
Anexo 9. Lente de contacto de Google y Novartis (Bruen, Delaney, Florea, & Diamond, 2017).



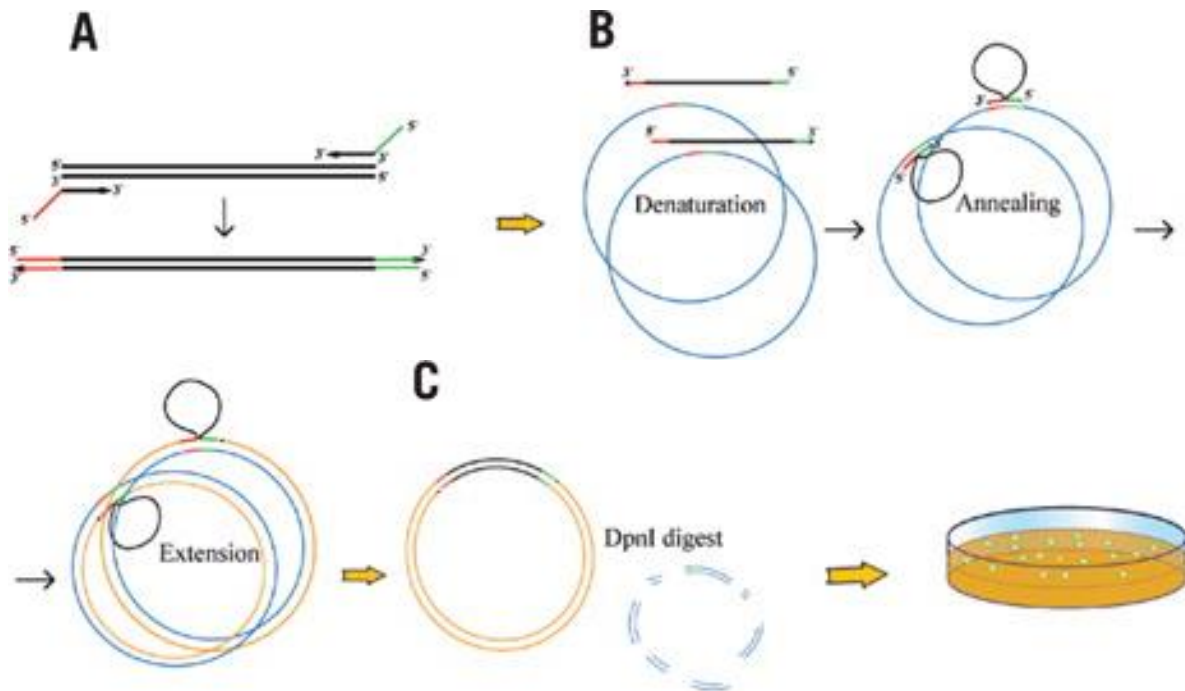
Anexo 10. Esquema que muestra la clasificación de los biosensores, adaptado de Malhotra & Chaubey (2003). (DNA: ácido desoxirribonucleico; SPR: resonancia de superficie de plasmones; EC: electroquímico).



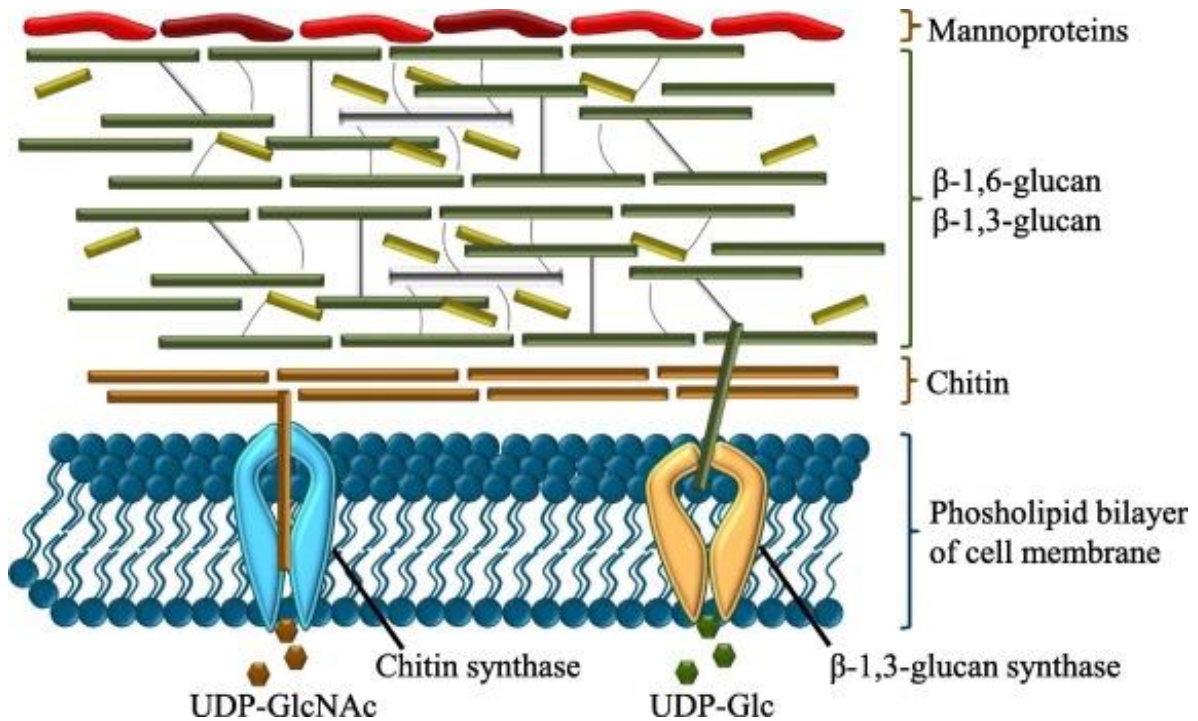
Anexo 11. Principio de operación de un sensor de glucosa de (a) primera, (b) segunda y (c) tercera generación (Wong, Wong, & Chen, 2008).



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).



Anexo 14. Esquema de la representación de la composición de la pared celular fúngica. La pared celular consiste principalmente de quitina (color café), localizada cerca de la membrana celular. β -1,3 y β -1,6-glucanos (color verde) adyacentes a las fibras de quitina y mano proteínas (color rojo) en la región externa de la pared celular. La quitina es sintetizada por la transferencia de residuos de N-acetil glucosamina de uridina difosfato-N-acetil glucosamina (UDP-GlcNAc; hexágono color café) a una cadena que es transportada hacia la membrana de la célula por la proteína de membrana quitina sintasa (color azul claro), mientras que los β -1,3 glucanos son sintetizados por la β -1,3-glucano sintasa (color amarillo) que utiliza uridina difosfato-N-glucosa (UDPGlc; hexágono color verde) como donador para la transferencia de glucosa hacia la fibra de β -1,3-glucano extruida (Fesel & Zuccaro, 2016)