

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

CARRERA DE LICENCIATURA EN FARMACIA

**“MODELO DE EXPRESIÓN GÉNICA PARA LA
SÍNTESIS DE UN POLIPÉPTIDO DEL GRUPO
FARMACOLÓGICO GLP-1 PARA EL TRATAMIENTO
DE LA DIABETES *MELLITUS* TIPO II:
ACERCAMIENTO DE LA BIOLOGÍA SINTÉTICA”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA
EN FARMACIA**

Daniel Pérez Alcázar

Tutor:

M.Sc. Dennis Jiménez Vargas

Lector:

Dr. Heyner Rodríguez Artavia

San José, Costa Rica

CONTENIDO

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	5
Planteamiento del problema	5
Hipótesis.....	7
Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos.....	7
Justificación.....	8
Antecedentes	10
Antecedentes internacionales	10
Antecedentes nacionales.....	12
Proyecciones.....	12
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	12
El páncreas humano	13
Anatomía y función endocrina del páncreas.....	13
Regulación de la secreción pancreática: relación insulina-glucagón	14
Diabetes mellitus	19
Diabetes mellitus tipo 1	20
Diabetes mellitus tipo 2	21
Diabetes gestacional	22
Complicaciones de la diabetes mellitus tipo 2.....	22
Epidemiología de la diabetes mellitus	29

Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2	36
Biotecnología	51
Aplicaciones de la biotecnología	54
Biología sintética	55
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	65
Enfoque	65
Diseño.....	65
Objeto de estudio.....	66
Variables	67
Instrumentos	69
Procesos para la recolección y análisis de datos	71
Revisión bibliográfica para la elección del chasis para la expresión del vector.....	71
Modelación del análogo de la GLP-1	71
Formulación del vector de expresión.....	72
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	73
Selección del chasis.....	73
Elaboración de un análogo de la GLP-1.....	77
Modificación de la GLP-1 para evitar la degradación de la enzima NEP 24.11	78
Modificación de la GLP-1 para evitar la degradación de la enzima DPP4	80
Adición de glypican 3 (proteína inhibidora de DPP4) a la cadena GLP-1.2.....	82
Elaboración del constructo	82
Promotor	83
UTR 5 ¹ y UTR 3 ¹	83
Sitio de Unión de Ribosoma.....	83

Péptido Señal	84
Cadena de Unión	84
UTR 3 ¹	84
Terminador.....	85
Plásmido	85
Optimización de secuencias de ADN a partir de secuencias de aminoácidos	85
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	87
Referencias.....	89
Anexos	97

Figuras

Figura 1. Islote de Langerhans con células alfa y beta, encargadas de la secreción insulina y de glucagón respectivamente.....	19
Figura 2. Modificación de la proinsulina para la conversión a la insulina, la cual más tarde es expuesta a un desdoblamiento enzimático por las peptidasas PC2 y PC3.....	22
Figura 3. Tendencia en prevalencia de diabetes, 1980-2014, por capacidad adquisitiva de los países a nivel mundial.....	36
Figura 4. Esquema terapéutico recomendado por la ADA para pacientes diabéticos tipo II.....	42
Figura 5. Muestra a los precursores tanto de la GLP-1 como de la GIP antes de ser convertidos en una cadena de aminoácidos más corta con función hormonal.....	47
Figura 6. Diagrama de los efectos insulíntrópicos y no-insulíntrópicos de la GIP y la GLP-1	48
Figura 7. Secreción y metabolismo tanto de las Incretinas.....	49
Figura 8. Árbol de la biotecnología: disciplinas que contribuyen en la biotecnología.....	57
Figura 9. Aprovechamiento de la <i>Komagataella pastoris</i> (antes, <i>Pichia pastoris</i>) en el desarrollo del campo biofarmacéutico.....	81
Figura 10. Estructura de la proteína GLP-1.....	83
Figura 11. Vector de expresión elaborado.....	91
Figura 12. Representación esquemática de los sustratos de la DPP 4.....	114

Tablas

Tabla 1. Prevalencia de diabetes en adultos a nivel mundial.....	35
Tabla 2. Distribución de la estimación de las consultas debido a Diabetes <i>mellitus</i> por año, según sexo y grupo de edad, 2012-2015 en Costa Rica.....	40
Tabla 3. Información farmacocinética de algunos análogos de la GLP-1.....	55
Tabla 4. Prolina/alanina sitio de corte específico de endo- y exopeptidasas.....	86
Tabla 5. Secuencia de ADN y AA utilizados para la elaboración del vector de expresión.....	102

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

La Diabetes *Mellitus* es una patología endocrino-metabólica que afecta la calidad de vida de muchos pacientes a nivel mundial. Esta enfermedad es desencadenante de muchas otras patologías (aterosclerosis, hipertensión arterial, complicaciones en infecciones, entre otras) que pueden perjudicar la calidad de vida del paciente, quien debe tener un riguroso y debidamente definido plan alimenticio y ejercicios para evitar dichas complicaciones (Beldarrain, Díez, Hervás, De Miguel y Zabaleta, 2006)¹.

Uno de los grupos farmacológicos para el tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo II son las moléculas análogas de la hormona proteica GLP-1, conocidas comúnmente como incretinas. Las incretinas juegan un papel muy importante a nivel de la regulación de la glucosa, debido a su capacidad de estimular la secreción de insulina, disminuir el vaciado gástrico y estimular la saciedad (Goodman y Gilman 2007). Las incretinas son degradadas por la enzima proteasa DPP4, haciendo que el tiempo de vida media de la proteína sea de 2-3 minutos (Fukushima y Seino 2011).

Hasta la fecha uno de los aspectos negativos de las incretinas sintéticas (análogas a GLP-1) es el alto costo económico que representan para el paciente; además, las incretinas tienen un tiempo de vida media corto, deben incluirse en esta terapia otros hipoglucemiantes y, por último, pueden producir efectos secundarios (Ardevol, Céspedes, Figueredo, Pérez y Reyes, 2015). Algunos ejemplos de estas incretinas comercializadas en la actualidad como medicamentos son:

exenatida, con un tiempo de vida media plasmática de hasta 4 horas; liraglutida, con un tiempo de vida media de 10-14 horas; albiglutida (en fase de investigación), la que se encuentra la GLP-1 enlazada a una molécula de albumina (disminuye la afinidad por la DPP4), aumentando su tiempo de vida media (Ardevol *et al.*, 2015).

La biología sintética es un nuevo campo en el mundo de la ciencia, en el cual muchos profesionales están incursionando, y que se espera facilite la síntesis de todo tipo de moléculas y proteínas, desde vitaminas y vacunas en el campo de la medicina, hasta combustibles y otros compuestos orgánicos en otros campos de aprovechamiento. La versatilidad de compuestos orgánicos que se pueden aprovechar gracias a la biología sintética es muy amplia.

En esta investigación se pretende, entonces, proponer un modelo de expresión génica para la obtención de un principio activo con características similares a la incretina GLP-1, el cual es previamente descrito a partir del ser humano. El modelo busca maximizar la vía de obtención mediante un vector de expresión basado en partes biológicas que garanticen la productividad, en el organismo de laboratorio *Komagataella pastoris* (antes *Pichia pastoris*), debido al extenso conocimiento como organismo de laboratorio y su semejanza en sus vías de glicosilación con las del *Homo sapiens*.

Por lo tanto, se desarrolla la siguiente pregunta: ¿Cómo diseñar un modelo de expresión génica para la obtención de un medicamento análogo de GLP-1 para el tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo II?

Hipótesis

Con ayuda de los avances científicos interdisciplinarios con los que se cuenta en la actualidad, es posible diseñar un modelo *in silico* de expresión génica para la síntesis de un análogo de la GLP-1, utilizando el acercamiento de biología sintética.

Objetivos

Objetivo general

Diseñar un modelo de expresión génica para la síntesis de un medicamento análogo de la GLP-1, para el tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo II, desde la perspectiva de la biología sintética.

Objetivos específicos

Realizar una revisión bibliográfica sobre los chasis que se utilizan en biología sintética para la expresión génica de vectores que permitan la síntesis de proteínas de interés farmacéutico.

Modelar un análogo de la proteína GLP 1 que presente un tiempo de vida media mayor en el organismo humano.

Construir *in silico* el vector de expresión génica que posibilite la síntesis del análogo de la proteína GLP-1.

Justificación

Los crecientes desgastes de las vías tradicionales para la obtención de nuevas drogas no permiten que estas pasen de la fase I de investigación, testificando la dificultad para innovar medicinas seguras. Al respecto, la biología sintética da la esperanza para un potencial crecimiento de nuevas áreas de investigación, al brindar posibilidades de moléculas con fines farmacológicos con mejor especificidad y capacidad de unión a la diana para la que se sintetiza. Actualmente, esta es una disciplina que emerge poco a poco y se puede utilizar para el descubrimiento de nuevos y mejores fármacos. Esta nueva área de la ciencia reorienta el campo del descubrimiento de fármacos, de igual manera que sucede hace 100 años con la química orgánica, llegando a ser el centro de innovación en las industrias farmacéuticas (Carbonell y Trosset, 2015).

La realización de este proyecto puede acarrear resultados positivos para la comunidad científica y estudiantil, así como industrial del Estado de Costa Rica, pues tal y como lo menciona London Imperial College (2013), una de las mayores metas de la biología sintética es buscar una forma de industrializar los procesos, lo que puede desbloquear el potencial en este campo de la ciencia y lograr investigaciones más sofisticadas.

Con este tipo de investigaciones, los pacientes son beneficiados con nuevas, mejores y más especializadas terapias, además la elaboración de medicinas puede ayudar a entender mejor las patologías (a nivel científico). En relación con esto, BiotechSpain (2013) indica que la biología

sintética es capaz de proporcionar un marco para construir de nuevo sistemas biológicos naturales con el fin de explorar los comportamientos patológicos de los mismos.

Una de las problemáticas de la síntesis de moléculas por vía orgánica es la gran fuente de contaminación ambiental que puede provocar. Según Barceló, Gros y Petrović (2007), estudios evidencian una enorme cantidad de productos farmacéuticos presentes en el medio acuático, porque algunos de los compuestos no se eliminan con facilidad durante los procesos de tratamiento de aguas. Cabe destacar que uno de los efectos negativos más preocupantes es la incorporación de moléculas o metabolitos activos en el ambiente sin considerar los daños que estos puedan causar.

El tema de esta investigación se aplica no solo a las ciencias de la salud, sino también en muchas áreas de desarrollo. etcGROUP (2012) señala que el mercado global en productos elaborados con el acercamiento de la biología sintética es de \$1 600 millones para el año 2011 con una proyección de crecimiento a \$ 10 mil 800 millones de dólares para el 2016. El mismo artículo cita algunas áreas en las que hoy es aprovechada la biología sintética: productos como bioplásticos derivados del maíz, saborizantes y biodiésel (etcGROUP, 2012).

Desarrollar un análogo de la GLP-1 que se administre en dosis semanales o mensuales realizando cambios en la proteína en base a estudios *in vitro* que garanticen dosis prolongadas; resulta importante debido a que las terapias de este tipo demuestran una alta adherencia del paciente a las mismas, impulsándolo a un mejor control de la patología, lo cual beneficia su calidad de vida. Las investigaciones en la industria farmacéutica en Costa Rica y el aprovechamiento de

las ciencias emergentes, como la biología sintética, pueden crear un mejor panorama para elaborar nuevos fármacos.

Esta investigación propone diseñar el modelo de expresión génica *in silico* para obtener un fármaco similar a la GLP-1, implementado como tratamiento para la diabetes *mellitus* tipo 2, el cual puede ser luego llevado al campo experimental para la recolección física de la proteína.

Antecedentes

Se realiza una búsqueda bibliográfica de proyectos de investigación similares a este estudio en las universidades privadas y públicas del país y en distintas revistas indexadas en bases de datos dedicadas a la investigación; por ejemplo: BINASSS, Scielo, EBSCO, PudMed, Clinical Key y CUMED.

Antecedentes internacionales

Clomburg y González (2010) realizan un estudio bibliográfico donde analizan la producción de biocombustibles en *Escherichia coli* mediante ingeniería metabólica y biología sintética. Los autores llegan a la conclusión de que *E. coli* es un microorganismo para la producción industrial de compuestos biocombustibles basados en su metabolismo, fisiología y genética.

Connor y Liao (2008) proponen un experimento para la obtención del 3-metil-butanol mediante el uso de *Escherichia coli* en un laboratorio; la expresión de la biosíntesis de los genes de valina y leucina lleva a la producción de 3-metil-1-butanol.

Avignone-Rossa, González, Jiménez, Kim, Salvador y Saunders (2016) exploran algunas propiedades que le posibilitan al chasis (organismo encargado de llevar la información genética) ser parte integral de los diseños de la biología sintética. Hacen referencia a una lista de bacterias que se utilizan para la biología sintética y llegan a la conclusión de que con independencia del estudio por efectuar, se debe escoger el microorganismo con el que se va a trabajar.

Admiraal, Blaine, Cane, Gramajo y Khosla (2001) desarrollan un estudio de biosíntesis de complejos de policétidos en una cadena ingenierizada metabólicamente en una cepa de *E. coli*, con ella se trabaja la biología sintética con el propósito de lograr un metabolito para la posterior obtención de otros productos como la eritromicina.

Chang *et al.* (2006) llevan a cabo un estudio con la finalidad de obtener un precursor de la droga para el tratamiento de la malaria, la artemisinina, elaborado con el apoyo de la biología sintética; consiguiendo el metabolito en el laboratorio.

Market Line (2016) realiza un estudio de las empresas que investigan y obtienen ingresos a partir de la biotecnología. Incluye datos del mercado a nivel mundial y el valor monetario de la biotecnología en el mercado, comparando su crecimiento año tras año. Se relaciona con esta investigación porque se hace hincapié en el crecimiento del mercado y se evidencia la atención de las grandes empresas en las nuevas y emergentes biotecnologías, como lo es la biología sintética.

Antecedentes nacionales

Vásquez (2014) efectúa una tesis titulada *Diseño de una herramienta para la asistencia en el ensamblaje sintético de la bacteria E. Coli en la producción de biocombustibles*, en la cual especifica el catálogo de componentes genéticos, establece las características estructurales y la aproximación de las funciones de los ensamblajes en la bacteria *E. coli*, diseña una herramienta orientada al ensamblaje sintético de la *E. coli* utilizando rutas metabólicas para una cepa de *E. coli* y lleva a cabo búsquedas de compuestos de relevancia.

Proyecciones

Esta investigación permite obtener un vector de expresión génica de una proteína análoga a la GLP-1 para luego ser obtenido a nivel experimental como un medicamento para el tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo 2.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Este capítulo abarca el marco teórico, en donde se tratan los siguientes temas: primeramente se explica la anatomía y función del páncreas (el órgano secretor de insulina y glucagón) y su relación con la regulación de la glicemia; luego, las características de la diabetes, las estadísticas de diabetes tanto a nivel nacional como internacional, sus posibles complicaciones y su tratamiento; posteriormente se desarrollan aspectos claves de la biotecnología, como su significado, sus avances a lo largo del tiempo, los campos que abarca y sus aplicaciones; por

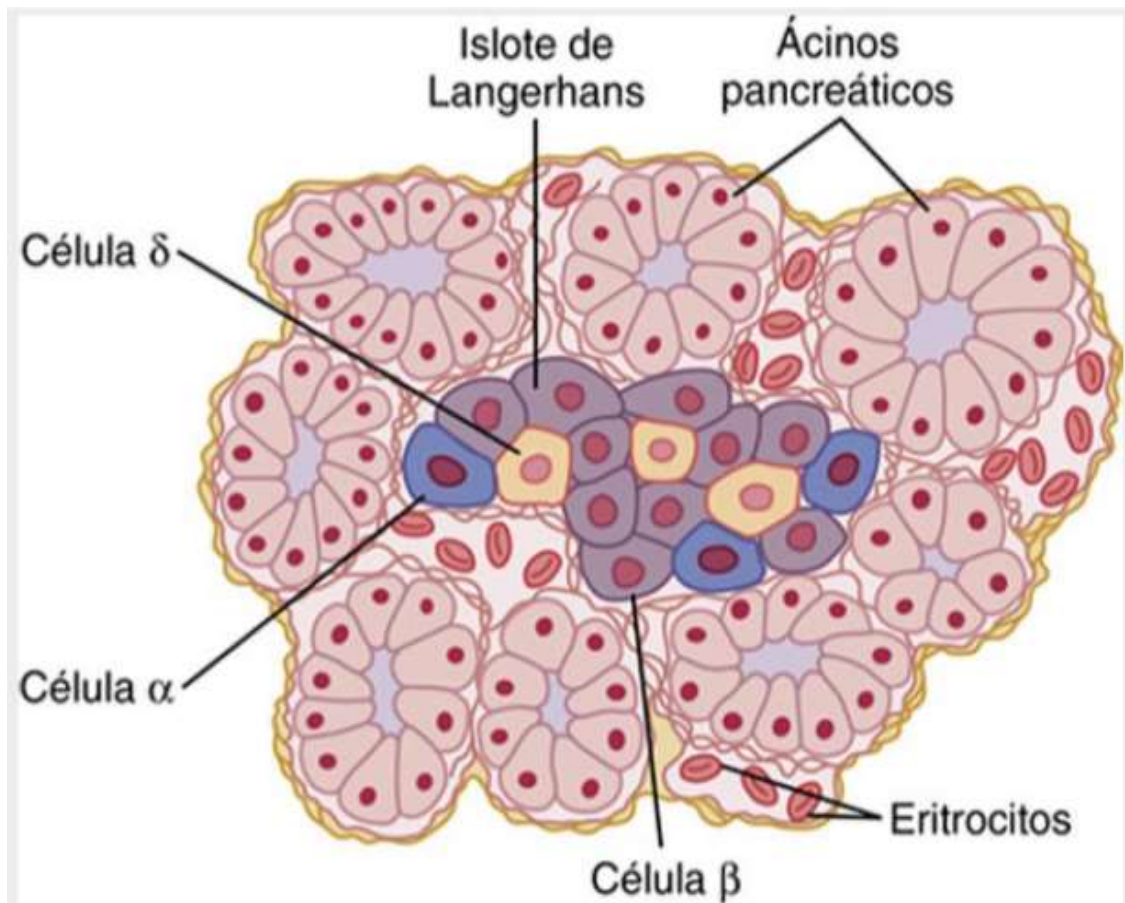
último, se explican los atributos de la biología sintética, como su significado, su aplicación en el área farmacéutica, sus avances a nivel nacional y los principios experimentales básicos para su aplicación como BioBricks como partes elementales para la modulación de un vector para la expresión génica y los organismos modelos o chasis, utilizados para expresar el vector de expresión génica.

El páncreas humano

Anatomía y función endocrina del páncreas

El páncreas humano es un órgano secretor alargado y de textura esponjosa, que se encuentra localizado debajo y detrás del estómago. Es sobre todo una glándula exocrina digestiva, sin embargo cuenta con un grupo de células endocrinas denominadas islotes de Langerhans (figura 1), que representan de un 2 % aproximadamente del tejido total, y secretan hormonas esenciales para la regulación de la glucosa, la insulina y el glucagón (Saladin, 2013).

Figura n.º 1. Islote de Langerhans con células alfa y beta, encargadas de la secreción insulina y de glucagón respectivamente



Fuente: Guyton y Hall, 2016

Regulación de la secreción pancreática: relación insulina-glucagón

La secreción de las hormonas insulina y glucagón es un mecanismo altamente regulado, con la finalidad de proporcionar al organismo concentraciones estables de glucosa en el torrente sanguíneo. La secreción pancreática se encuentra parcialmente regulada por el control humoral (hormonas pancreáticas y gastrointestinales), e interacciones de varios nutrientes (glucosa,

aminoácidos, ácidos grasos y cuerpos cetónicos) y neurotransmisores del sistema nervioso autónomo (Goodman y Gilman, 2007).

Las células secretoras de hormonas pueden detectar directamente las concentraciones sanguíneas de glucosa (VanPutte, Regan y Russo, 2017). Cuando las concentraciones de glucosa se encuentran elevadas en el organismo, se puede esperar que la secreción de insulina incremente; en caso contrario, cuando los niveles de glucosa se encuentran disminuidos en el plasma, la secreción de insulina disminuye. Además, los islotes de Langerhans poseen una gran inervación de nervios tanto colinérgicos como adrenérgicos (Goodman y Gilman, 2007). Los niveles bajos de glucosa en el plasma estimulan la secreción del glucagón, el cual estimula la gluconeogénesis (la obtención de glucosa) y la glucogenólisis a nivel del hígado y la lipólisis a nivel del tejido adiposo (VanPutte *et al.*, 2007).

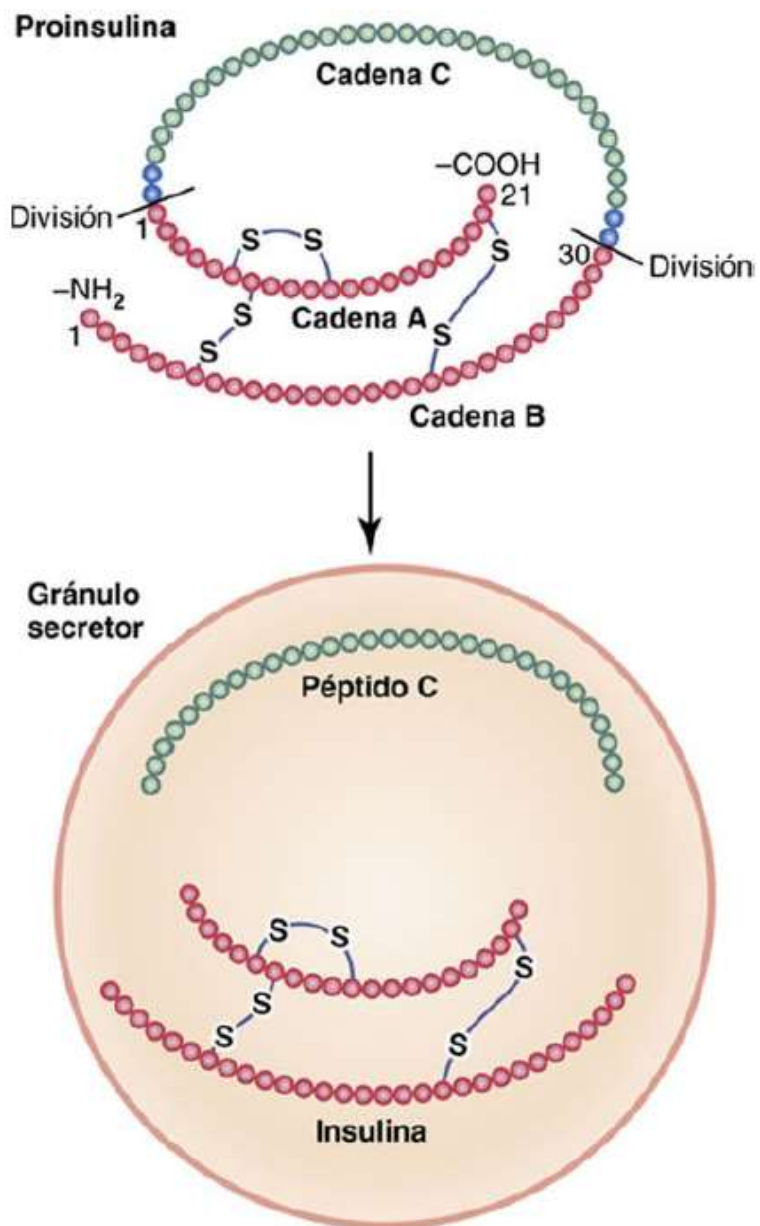
La insulina.

La insulina es una pequeña hormona proteica conformada por 2 cadenas polipeptídicas unidas entre sí por enlaces disulfuro (sintetizada como proinsulina, complejo proteico formado de 3 cadenas) (figura 2), la cual tiene como función principal disminuir los niveles de glucosa sanguíneos mediante la estimulación de la entrada de glucosa a algunos tejidos diana para ser aprovechada como fuente de energía y para su almacenamiento como fuente de energía (VanPutte *et al.* 2017).

La insulina cumple una enorme gama de funciones biológicas y no se limita solo a la regulación o el control de los niveles de glucosa. Contribuye también con el almacenamiento de aminoácidos y ácidos grasos, bloqueando además los procesos catabólicos de glucógeno, grasa y proteína (Goodman y Gilman 2007).

Las células diana de la insulina se ubican en el hígado, el músculo esquelético, el tejido adiposo y el centro de la saciedad en el hipotálamo. En ausencia de insulina, los niveles de glucosa en sangre pueden aumentar dramáticamente. En esta situación, el centro de la saciedad hipotalámica se ve imposibilitado para detectar la glucosa en el torrente sanguíneo, siendo el resultado observado en la mayoría de los casos la polifagia, y por los niveles elevados de glucosa, se manifiesta poliuria y polidipsia (Regan *et al.* 2017).

Figura n.º 2. Modificación de la proinsulina para la conversión a la insulina, la cual más tarde es expuesta a un desdoblamiento enzimático por las peptidasas PC2 y PC3



Fuente: Guyton y Hall, 2016

El glucagón.

El glucagón es una hormona secretada por los islotes de Langerhans, específicamente por las células alfa. Esta hormona tiene funciones opuestas a las de la insulina, siendo la más importante la de aumentar la glucemia en condiciones de ayuno o de estrés. Es un polipéptido conformado por una cadena de 29 aminoácidos (Guyton-Hall, 1998). El producto final del proglucagón es una prohormona que además de contener la secuencia del glucagón, posee las secuencias de la GLP-1, GLP-2, la oxintomodulina y la glicentina.

El proceso de transformación de proglucagón al glucagón es realizado por unas enzimas conocidas como prohormonas convertasas (PC), PC1 (cerebro y células L del intestino) y la PC2 (se encuentra exclusivamente en las células alfa-pancreáticas); esta última tiene la función de liberar glucagón. La excreción del glucagón está regulada de igual manera que la insulina, es glucosa-dependiente, mostrando el siguiente patrón: cuando la glicemia se encuentra elevada, tiene un efecto sobre la secreción del glucagón, inhibiendo la secreción del mismo; cuando sucede lo contrario, la secreción del glucagón aumenta para cumplir con sus efectos en el cuerpo (Bermúdez, Betancourt y Lima-Martínez, 2011).

Dentro de los órganos diana el glucagón se encuentra principalmente en el hígado y el riñón, y en menores proporciones en el corazón, adipocitos, páncreas, cerebro, retina y tracto gastrointestinal. A nivel hepático estimula la glucogenólisis y la gluconeogénesis. También, el glucagón favorece la captación de alanina, glicina y prolina, los cuales sirven como sustrato para la gluconeogénesis. A nivel de adipocito, una lipasa sensible al glucagón degrada los triglicéridos (Bermúdez *et al.*, 2011).

Diabetes mellitus

Según Donnelly, King y Peacock (2019), la diabetes *mellitus* fue reconocida hace 3500 años atrás por los egipcios. Fue una de las primeras descripciones clínicas realizadas por Aretaeus, quien escribió dos aseveraciones acerca de esta condición: “afortunadamente rara”, pero “corta será la vida del hombre quien desarrolle esta enfermedad completamente”. Donnelly, King y Peacock (2019) se refieren a las dos aseveraciones hechas por Aretaeus aplicándolas a la realidad de los últimos tiempos. La primera está muy lejos de la verdad puesto que la incidencia de la diabetes se ha duplicado en 20 años desde el 1945 al 1994 con una prevalencia por la diabetes *mellitus*; con respecto a la segunda aseveración, los autores concuerdan -arrojando datos estadísticos- que un alto porcentaje de los pacientes diabéticos fallecieron 10 años después de haber sido diagnosticados mayoritariamente por enfermedades cardiovasculares.

La diabetes es consecuencia de una disminución de la secreción de la insulina, una resistencia progresiva de los tejidos a la misma o una pérdida de la sensibilidad de estos a la insulina; como consecuencia, la persona tiene elevadas concentraciones de glucosa en sangre. Además, la disposición genética es un factor muy importante para determinar si un paciente tiene probabilidad de adquirir diabetes o no en algún momento de su vida (Guyton-Hall, 1998). La diabetes se puede encontrar en diferentes formas: diabetes tipo 1, conocida como diabetes insulino dependiente o dependientes de insulina, en donde el organismo no es capaz de sintetizar su insulina; tipo 2, gestacional, la cual es presentada en algunas pacientes en periodo de embarazo. Generalmente los pacientes diabéticos experimentan complicaciones; al pasar de los años, las complicaciones macrovasculares en esta población incluyen problemas en arterias coronarias,

cerebrovasculares y problemas periféricos vasculares. En cuanto a las complicaciones microvasculares, consisten en retinopatías, nefropatías y neuropatías (Saladin, 2013).

Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1) ocurre a raíz de que el páncreas no secreta suficiente cantidad de insulina para asimilar la cantidad de glucosa en sangre, o bien, cuando del todo la hormona se encuentra ausente en el organismo. Entonces, el paciente tiene elevados niveles de glucosa en sangre y presenta los siguientes síntomas: polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso, visión borrosa, fatiga o cansancio (Isley y Molitch, 2005).

Una de las causas de la DMTI puede ser que incrementa la susceptibilidad de las células beta a una autodestrucción, debido a la infección por un virus o a la formación de anticuerpos autoinmunes de parte del mismo organismo (Guyton-Hall, 1998). La diabetes *mellitus* tipo 1 también es conocida como insulino dependiente, debido a que al paciente se le debe de administrar insulina como tratamiento crónico. Con frecuencia es una enfermedad desarrollada en la niñez y en la etapa de la juventud; sin embargo, se puede desarrollar en adultos (en la menor frecuencia de los casos) (Zachary, 2014).

Diabetes *mellitus* tipo 2

La Diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) es ocasionada por un déficit de la efectividad de la insulina y normalmente es acompañada por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. La DMT2 puede ser desencadenada por factores genéticos y factores medioambientales (Olimpo, 2007). La DMT2 es una enfermedad crónica que obliga al paciente a someterse a tratamiento por el resto de su vida. Esta acarrea graves problemas cardiovasculares y complicaciones, donde convergen varios elementos como neuropáticos, isquémicos, metabólicos y ortopédicos (como el pie diabético).

Existen varias hipótesis que intentan explicar el origen de la predisposición genética de la DMT2: la hipótesis del “genotipo ahorrativo” y la hipótesis de que la resistencia a la insulina es el genotipo “no tan ahorrativo”. El genotipo ahorrativo son los genes responsables de la resistencia a la insulina, los cuales protegen a los individuos durante prolongados periodos de ayuno. El genotipo no ahorrativo (o resistencia a la insulina) es aquel que permitió la prevalencia de los pobladores de la Tierra en épocas de hambruna en el último periodo glacial, su objetivo era evitar la degradación de proteínas para ser utilizadas como fuente de energía y así conservar masa muscular para cazar o realizar huidas cuando se encontraban en peligro (Carrillo y Cerda, 2001).

Diabetes gestacional

La diabetes gestacional se presenta en 1-3 % de las mujeres en estado de embarazo. Esta condición sucede porque en la mujer disminuye la sensibilidad a la insulina, reduciendo de esta manera la capacidad de entrada de glucosa a los tejidos diana; como resultado final se obtiene una concentración elevada de glucosa en sangre, la misma es caracterizada por la glucosuria. La diabetes gestacional no suele durar más de la época del embarazo, muy pocas veces las pacientes continúan con esta patología (Guyton-Hall 1998).

Complicaciones de la diabetes *mellitus* tipo 2

La diabetes *mellitus* desencadena una serie de complicaciones que tienden a afectar la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad, las cuales se deben a diversos mecanismos patológicos, ambientales, fisiológicos, entre otros. A continuación se discuten algunas de estas complicaciones y mecanismos patológicos:

Hipoglucemia.

De acuerdo con Mediavilla (2001), la hipoglucemia es la complicación más comúnmente asociada al tratamiento de origen farmacológico de la diabetes *mellitus*; se puede definir como una concentración en el torrente sanguíneo de glucosa inferior a 60 mg/dl, y dividir en tres niveles principales en relación con su gravedad y síntomas: en la hipoglucemia leve, el paciente llega a percibir síntomas tanto adrenérgicos (ansiedad, inquietud, taquicardia, palpitations y temblores,

entre otros) como colinérgicos (sudoración); asimismo logra percibir síntomas hipoglucémicos vinculados con el sistema nervioso como lo son: disminución de la concentración, mareo, polifagia y visión borrosa, las cuales no interfieren con las actividades normales.

La hipoglucemia moderada va acompañada de un estado neurológico con deterioro en cuanto a la función motora, además de confusión o conducta inadecuada. Por último, la hipoglucemia grave es un episodio en donde se ve mayormente afectado el sistema nervioso central, exponiendo al paciente a un coma y crisis convulsivas; situación de gran importancia debido a que el paciente presenta incapacidad para el autotratamiento o rescate.

Hiper glucemia.

La hiper glucemia es causada por complicaciones metabólicas debido a la falta total o relativa de insulina, lo cual puede exponer al paciente a un síndrome hiperglucémico, o bien, cetoacidosis diabética. La cetoacidosis diabética es propia de la diabetes *mellitus* tipo 1, sin embargo, también se puede observar en pacientes que padecen de diabetes *mellitus* tipo 2 en situaciones de estrés. Por lo general se aprecian concentraciones de glucosa sanguíneas de 300 mg/dl y cetonemia con cuerpos cetónicos en suero mayores a 3 mmol/L. Respecto a la incidencia de la cetoacidosis diabética, el mismo autor indica que se produce en un 2-5 % de los pacientes que padecen diabetes *mellitus* tipo 1 (Mediavilla, 2001).

Coma hiperglucémico hiperosmolar no cetósico.

Es la complicación metabólica aguda más frecuente para los pacientes que padecen de diabetes *mellitus* tipo 2, se observa mayor incidencia en pacientes mayores de 60 años, provocando una mortalidad superior al 50 % que la ocasionada por la cetoacidosis diabética (Mediavilla, 2001). Según Álvarez y Remuñán (2001), un paciente que experimenta un cuadro de coma hiperglucémico hiperosmolar no cetósico presenta valores de glucemia >500 mg/dL, osmolaridad plasmática >330 mmol., ausencia de cetonemia, pH arterial >7,3, bicarbonato sérico >20 mEq/L, trastornos mentales y ausencia de cetonuria.

Álvarez y Remuñán (2001) indican que este estado clínico es la presentación más severa de la resistencia a la insulina o el déficit de insulina disponible para ejercer su función esperada, lo que desencadena el desaprovechamiento de insulina circundante en el torrente sanguíneo y un exceso de producción, incrementado la osmolaridad sanguínea. La situación antes mencionada ocasiona la salida del líquido intracelular lo que produce crenación en la célula, provocando deshidratación y expandiendo el espacio extracelular, lo que genera síntomas como deshidratación severa, hiponatremia, hipertermia, estupor o coma, signos neurológicos focales, convulsiones, respiración estertorosa, hipotensión o shock. Los factores de riesgo que predisponen a este cuadro son: deshidratación, inadecuada administración de drogas hipoglucemiantes, infecciones, drogas diabetogénicas (glucocorticoides, tiazidas), cirugía, nutrición parenteral, función renal inadecuada, sexo femenino (Álvarez y Remuñán, 2001).

Complicaciones cardiovasculares.

En los últimos tiempos la diabetes *mellitus* se ha comenzado a considerar como un fuerte factor predisponente a una enfermedad cardiovascular, por consiguiente, se puede decir que un paciente que padezca de diabetes *mellitus* sin alguna cardiopatía o complicaciones vasculares en su historia clínica tiene un riesgo similar a un paciente que sí ha padecido de alguna patología en este aspecto (Boichuk, Kriskovich, Lujan y Vanina, 2005).

De acuerdo con el estudio UKPDS (UK Prospective Diabetes Study, 2000), una investigación observacional realizada en 23 hospitales de Inglaterra, Escocia y el Norte de Irlanda en donde participaron 4585 pacientes, cuyo objetivo era determinar la relación que tiene la exposición de la glicemia a lo largo del tiempo y el riesgo de complicaciones tanto microvasculares como macrovasculares, arrojó como conclusiones que en pacientes diabéticos tipo 2 las complicaciones están fuertemente asociadas con hiperglicemia. Cualquier reducción de la hemoglobina glucosilada disminuye considerablemente los riesgos en las complicaciones.

Las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de morbimortalidad entre los pacientes que padecen de diabetes *mellitus*, siendo en estos pacientes el riesgo de presentar patologías cerebrovasculares o coronarias o de fallecer debido a estas de 2 a 3 veces mayor al de la población que no padece de diabetes *mellitus*; aproximadamente el 70-80 % de los pacientes diabéticos fallecen por estas patologías (Mediavilla, 2001).

La predisposición del riesgo cardiovascular aumenta cuando el paciente diabético tiene el hábito del tabaquismo o presenta presión arterial alta o dislipidemias. Las enfermedades cardiovasculares se ven favorecidas con factores de riesgo como la obesidad, hiperinsulinemia, anormalidades de la función plaquetaria y de la coagulación sanguínea (Mediavilla, 2001).

La macroangiopatía es una afectación arterosclerótica que se ubica a nivel de los vasos de mediano y de gran calibre. Es similar a la aterosclerosis desde el punto de vista histológico y bioquímico, y en los pacientes diabéticos, si esta enfermedad tiene un inicio precoz, es de mayor gravedad y de mayor extensión, y se presenta en los pacientes diabéticos con un pronóstico peor que en pacientes no diabéticos. El punto clave al igual que la población en general es la prevención primaria, siendo el objetivo primordial el control adecuado de los factores de riesgo cardiovasculares, hipertensión arterial y tabaquismo (Mediavilla, 2001).

Retinopatía diabética.

La retinopatía diabética es una de las primeras dos causas más frecuentes de ceguera en occidente y la causa más común en pacientes con edades entre 30 y 69 años. Además, la retinopatía diabética es la complicación que por lo general padecen los pacientes diabéticos. Los pacientes con diabetes *mellitus* tipo 1 presentan este padecimiento luego de 20 años de prevalencia en la enfermedad; de igual manera, un 60 % aproximadamente de los pacientes diabéticos tipo 2 experimentan complicaciones de este tipo.

Los factores que predisponen al empeoramiento de la retinopatía diabética son el periodo de duración de la diabetes, valores altos de hemoglobina glucosilada, gravedad de la diabetes, presión arterial elevada, cifras elevadas de lípidos y, más comúnmente, en pacientes diabéticos tipo 1 y pacientes diabéticas en estado de embarazo (Mediavilla, 2001). El estudio UKPDS (2000) evidenció que el control de la presión arterial disminuye el riesgo en 34 % la progresión de la retinopatía diabética.

Nefropatía diabética.

La nefropatía diabética es la principal causa de complicación terminal a nivel renal alrededor del mundo, la misma es una de las principales causas de mortalidad en pacientes que padecen de diabetes *mellitus*. Esta se caracteriza por un aumento en los niveles de albuminuria, hipertensión y glomeruloesclerosis, y una reducción en la tasa de filtración glomerular (Carvajal, 2015).

Como lo expresa Mediavilla (2001), alrededor de un 20-30 % de los pacientes diabéticos presentan nefropatías, siendo los pacientes diabéticos tipo 2 quienes tienen una incidencia más elevada. Asimismo, el autor señala que las lesiones nefróticas se dividen por estadios, donde el estadio primero es la hipertrofia renal e hiperfiltración, caracterizada por un incremento rápido de tamaño renal, acompañado por un aumento de la tasa glomerular, flujo plasmático y presión glomerular. El segundo estadio es una lesión renal y es desarrollada en los siguientes 2 o 3 años luego de haber sido diagnosticado el paciente como diabético.

La nefropatía diabética es el estadio 3 y se define tras la aparición de cantidades pequeñas de albumina en la orina (30-300 mg/24h o 20-200 mg/min) debido a un aumento de presión arterial y una disminución del filtrado glomerular. El cuarto estadio de la nefropatía diabética comienza luego de los 10 o 15 años de haber sido diagnosticado el paciente como diabético, se observan cantidades de albumina en orina mayores a 300 mg/día, es asociado a un descenso progresivo de la filtración glomerular además de la hipertensión arterial. Por último, el quinto estadio puede comenzar a los 10 y 20 años del diagnóstico de diabetes y luego del paciente haber presentado proteinuria (proteína en orina) 7-10 años de manera persistente, valores de plasmáticas de creatinina superiores a 2 mg/dl, hipertensión arterial, retinopatía y problemas cardiovasculares.

Neuropatía diabética.

La neuropatía periférica diabética es simétrica y atribuida a trastornos metabólicos y alteraciones microvasculares debido a la hiperglicemia en concomitante a covariables de riesgo cardiovascular. La prevalencia de la neuropatía periférica diabética puede ser del 50 %, dependiendo de la edad del paciente y la duración de la diabetes. Los dolores sintomáticos severos por neuropatías diabéticas pueden afectar a más del 30 % de pacientes con este padecimiento. La neuropatía periférica diabética afecta de manera sensitiva, motora y componentes autonómicos del sistema nervioso, manifestándose como una pérdida de la sensación protectora y disfunción de los músculos (Azmi, Alam, D'Août, Jugdey, Malik, Rajbhandari y Riley, 2017).

Epidemiología de la diabetes *mellitus*

Epidemiología de Diabetes *Mellitus* a nivel mundial.

La Organización Mundial de Salud o mejor conocida por sus siglas OMS en su último reporte global de diabetes realizado en el 2016, menciona que para el año 2012 hubo 1.5 millones de muertes a nivel del mundo causadas directamente por la diabetes, por lo cual fue la octava causa de muerte más frecuente de ambos sexos y la quinta causa de muertes en mujeres (OMS 2016). La OMS estima que a nivel global 422 millones de adultos mayores de 18 años padecían de diabetes en el año 2014, el mayor número de incidencias fue registrado en la región del sureste de la región asiática (tabla n.º 1).

Tabla n.º 1 Prevalencia de diabetes en adultos a nivel mundial

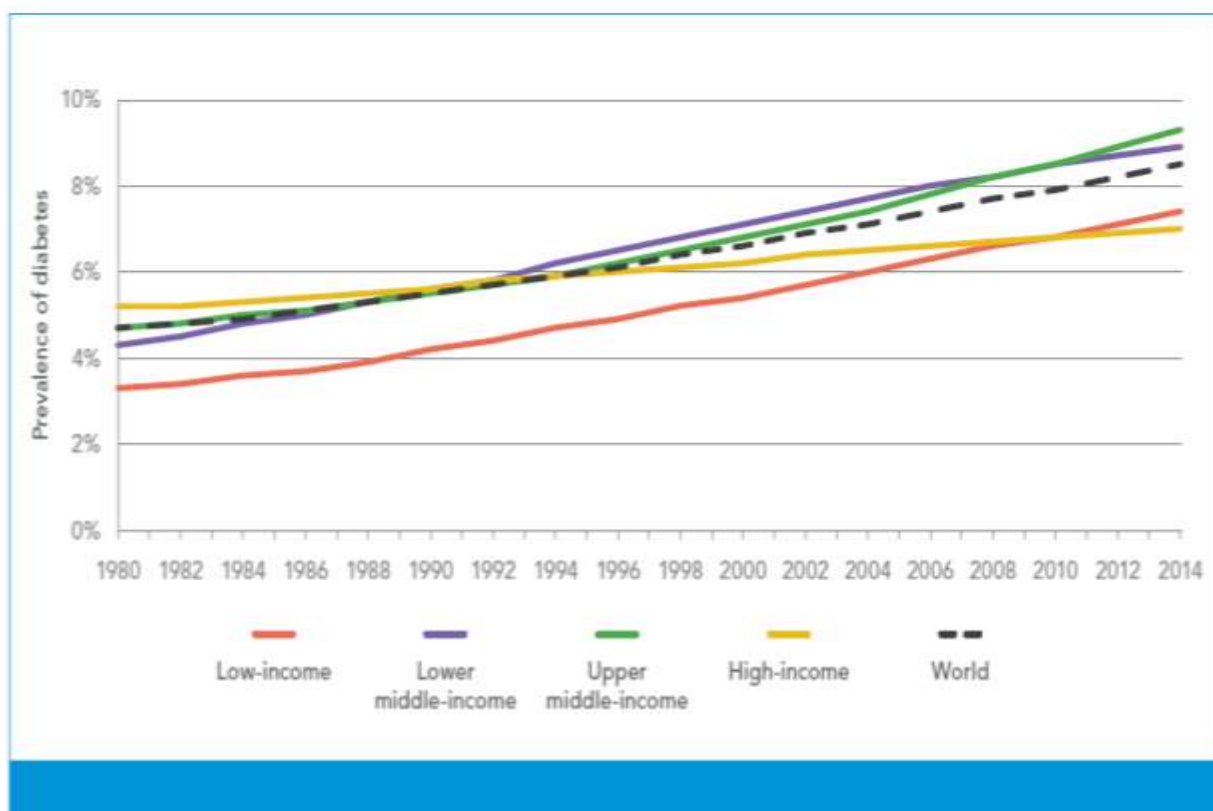
Región ONU	Prevalencia (%)		Número (millones)	
	1980	2014	1980	2014
Región Africana	3.1	7.1	4	25
Región Americana	5	8.3	18	62
Región Mediterráneo del este	5.9	13.7	6	43
Región europea	5.3	7.3	33	64
Región sureste de Asia	4.1	8.6	17	96
Región pacífico oeste	4.4	5.4	29	131
Total	4.7	8.5	108	422
Fuente: Elaboración propia adaptada al español de OMS (2016)				

En las últimas 3 décadas la prevalencia de la diabetes se ha duplicado (figura 3). La tendencia de crecimiento aumentó en todos los niveles de ingreso, lo cual va de la mano con la tasa de crecimiento de obesidad o sobrepeso (OMS, 2016).

La prevalencia global de la diabetes incrementó de un 4.7 % en 1980 a un 8.5 % en 2014; además, durante la última década la prevalencia aumentó de manera rápida en países de ingreso mediano-alto y de ingreso bajo en contraste con países de ingreso alto (figura 3) (OMS, 2014).

Figura n.º 3 Tendencia en prevalencia de diabetes, 1980-2014, por capacidad adquisitiva de los países a nivel mundial

FIGURE 4A. TRENDS IN PREVALENCE OF DIABETES, 1980–2014, BY COUNTRY INCOME GROUP



Fuente: WHO, 2016

Epidemiología de diabetes *mellitus* a nivel latinoamericano.

La región latinoamericana abarca 21 países y más de 577 millones de habitantes. Según las guías de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) (2013), se estimó que para el año 2011 la prevalencia de la región de diabetes *mellitus* era de 9.2 % entre adultos de edades de 20-79 años, el pronóstico para el año 2013 era mayor para la región de Latinoamérica que otras regiones, con un 39.9 millones de casos, y una de las disposiciones más graves es que el 45 % de los pacientes no tienen conocimiento de su condición de salud.

La diabetes *mellitus* se relaciona con el 12.3 % de las muertes totales en pacientes adultos, donde un 58 % de los casos fueron pacientes menores a los 60 años de edad. Las causas que más frecuentemente causan muerte entre los pacientes diabéticos son la cardiopatía isquémica y los infartos cerebrales. Cabe destacar que la diabetes es la primera causa de ceguera, insuficiencia renal y amputaciones (ALAD, 2013).

Epidemiología de DM en Costa Rica.

La diabetes *mellitus* tipo 2 en Costa Rica surgió de forma emergente. Se debe tomar en cuenta la tendencia de la población costarricense a seguir los patrones de los países de primer mundo, en los cuales la obesidad afecta aproximadamente a un 60 % de la población. En los últimos 50 años el perfil epidemiológico ha variado considerablemente, las enfermedades crónicas predominan sobre las enfermedades infectocontagiosas. Entre las enfermedades crónicas destacan la diabetes *mellitus* tipo 2, siendo importante tanto en términos de morbilidad y mortalidad. Según

los datos del censo realizado en el año 2000, alrededor de 134 000 habitantes padecían de esta enfermedad (Alfaro *et al.*, 2009).

La prevalencia en Costa Rica de pacientes con diabetes *mellitus* es muy alta, similar a la prevalencia de países industrializados. Un estudio publicado en 2003 evidenció la alta prevalencia de diabetes *mellitus* tipo 2 en la población de San Rafael de Heredia, dicho estudio se realizó con una muestra de 281 personas (52.7 % mujeres y un 47.3 % hombres), con una media de edad de los 38 años y un índice de masa corporal promedio de 26.6 % (Hasbum-Fernández, 2010).

La prevalencia de diabetes tipo 2 determinada por la muestra de glucemia en ayunas fue del 6.4 %, además un 3.6 % de la población tenía su glucemia en un rango prediabético definido entre 110-125 mg/dL en ayunas. Los pacientes diabéticos de la muestra presentaban una prevalencia de la obesidad del 73 %, considerada como un índice de masa corporal >27 . Mientras tanto los pacientes no diabéticos tenían una prevalencia de la obesidad del 40 %. En cuanto a la hipertensión arterial, fue de un 2.6 veces más frecuente en pacientes diabéticos que en pacientes sanos y de la población solo la mitad de la misma refirió tener antecedentes familiares de diabetes *mellitus* 2 (Hasbum-Fernández, 2010).

El comportamiento de la diabetes *mellitus* fue en incremento en los años 2012 al 2015 en Costa Rica, pasando de 12.21 a 20.34 por cada 100 000 habitantes. Además, la prevalencia en las mujeres fue mayor que en la de los hombres (INEC). Los mismos autores se refieren a la

distribución a nivel nacional. En cuanto a la distribución en el territorio, la provincia que destacó con mayor registro de casos de diabetes para el tiempo comprendido del estudio fue Cartago, seguida por Puntarenas, San José, Guanacaste, Alajuela, Heredia y finalmente Limón (Cubero y Rojas, 2017).

La mortalidad debida a la diabetes *mellitus* en el territorio costarricense fue en aumento del año 2012 al 2015, donde se observó un incremento en la tasa de 5 puntos, pasando de un 14.14 a 20.34 por cada 100 000 habitantes. El uso del servicio de consulta externa que dispone la Caja Costarricense del Seguro Social fue aprovechado por un total de 446 116 pacientes que padecen de diabetes *mellitus* (tabla n.º 2) (Cubero y Rojas 2017).

Tabla n.º 2. Distribución de la estimación de las consultas debido a diabetes *mellitus* por año, según sexo y grupo de edad, 2012-2015 en Costa Rica

Sexo Grupo de Edad	y	Año			
		2012	2013	2014	2015
Total		443.593	448.056	443.399	446.116
Hombre		169.117	170.857	169.366	170.376
Menos de 20		2.154	2.172	2.246	2.230
20 – 44		22.527	22.846	22.549	22.705
45 – 64		85.767	86.576	85.807	86.294
65 y Más		58.668	59.264	58.764	59.147
Mujer		274.306	274.306	274.306	274.306
Menos de 20		3.469	3.516	3.565	3.575
20 – 44		37.349	37.611	37.153	37.297
45 – 64		135.803	136.979	135.206	136.004
65 y Más		97.685	98.926	97.942	98.693
Desconocido		171	168	167	171

Nota: Estimación con base en la Encuesta Nacional de Consulta Externa 2012 (ENCE-2012).

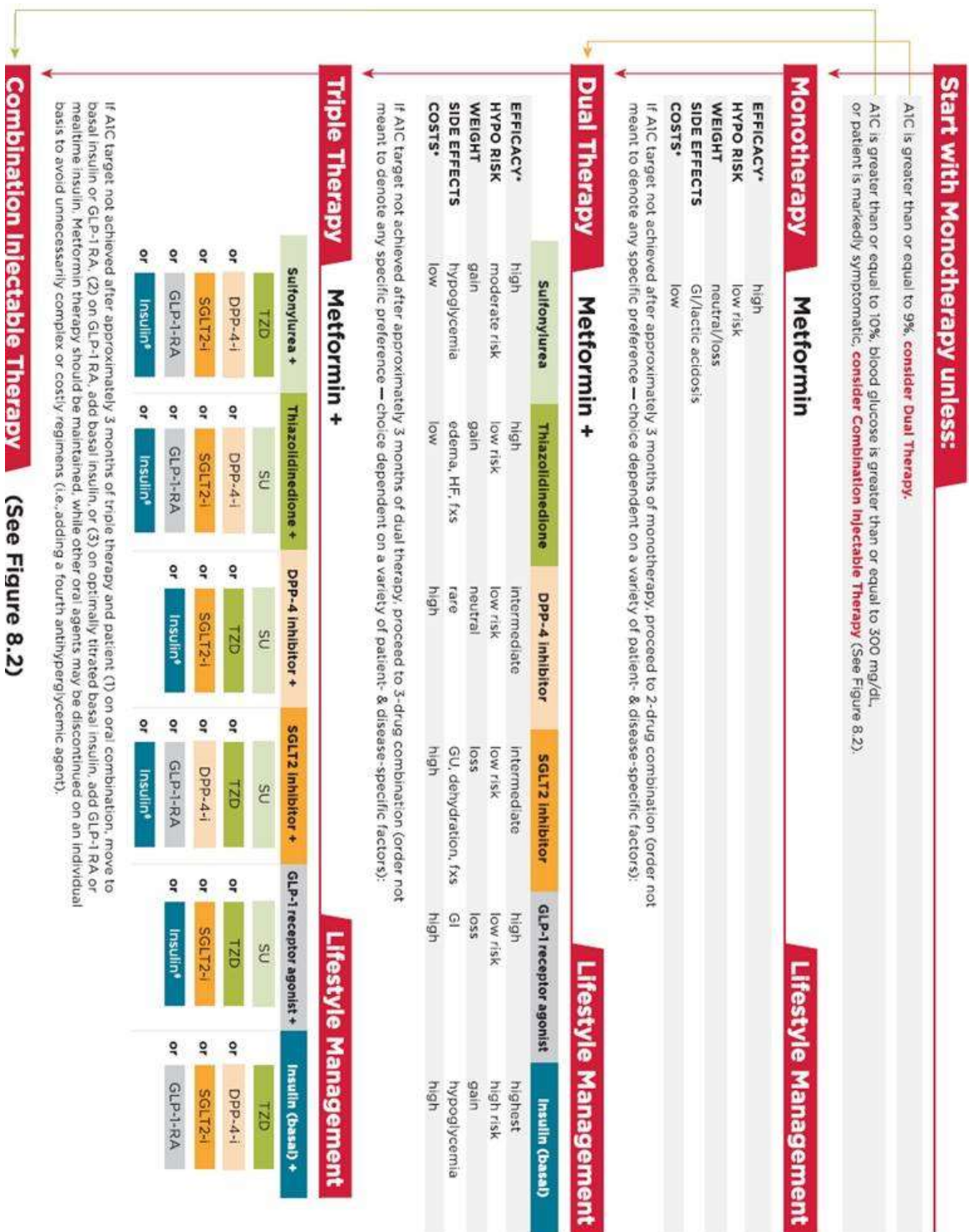
Fuente: C.C.S.S., Área de Estadística en Salud.

Fuente: Cubero y Rojas, 2017, p. 215

Tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo 2

El tratamiento sugerido por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) consta de monoterapia y terapia múltiple de fármacos hipoglucemiantes acompañado de una rigurosa dieta. El único medicamento de monoterapia es la metformina, como terapias de dos medicamentos se le adjunta a la terapia un segundo tratamiento, como terapia triple es cuando el paciente no muestra control sobre los niveles de glucosa por lo que se le recomiendan dos medicamentos sumado a un tercero que le ayude a controlar los niveles de glucosa sanguínea (ADA, 2017) (figura 4).

Figura n.º 4. Esquema terapéutico recomendado por la ADA para pacientes diabéticos tipo II



Fuente: American Diabetes Association, 2017

Hipoglucemiantes orales.

Sulfonilureas.

Son muy utilizadas para el tratamiento de la DM2. Hasta el momento se cuenta con una gran variedad de fármacos tanto de primera como de segunda generación y hasta una tercera generación. Todas son arilsulfonilureas sustituidas que difieren por sustituciones en la posición *para* del anillo benceno y en un residuo de nitrógeno a la mitad de la urea. Su receptor diana son los canales de K_{ATP} (Lorenzo, Moreno, Lizasoain, Leza, Moro y Portolés, 2008).

Las sulfonilureas son de primera elección para pacientes que padecen DM2 que no presenten obesidad. Su mecanismo de acción es que estimulan a las células beta pancreáticas para secretar insulina. Lorenzo *et al.* (2008) enlistan los fármacos según su familia: primera generación: acetohexamida, clorpropamida, tolazamida y tolbutamida; segunda generación: glibenclamida, glicacida, glipentida, glipicida y gliquidona; y, finalmente, de la tercera generación: glimepirida.

Análogos de las meglitinidas.

Su mecanismo de acción es capaz de estimular a las células β pancreáticas, encargadas de la secreción de insulina. Al igual que las sulfonilureas provoca el cierre de los canales de K_{ATP} , uniéndose a la subunidad SUR1 y estimulando la secreción de la insulina de una manera similar

que las sulfonilureas, sin embargo, debido a las diferencias estructurales entre las meglitinidas y las sulfonilureas, se les confiere propiedades farmacocinéticas distintas (Lorenzo *et al.*, 2008).

Las meglitinidas presentan un tiempo de vida media menor con respecto a las sulfonilureas. Además de tardar menor tiempo en producir el efecto esperado, las meglitinidas reducen la glicemia en periodos posprandiales (después de la ingesta de algún alimento). Los dos fármacos pertenecientes a los análogos de las meglitinidas son la rapaglinida y la nateglinida, ambas son metabolizados por el hígado mediante el CYP3A4 (Lorenzo *et al.*, 2008).

Biguanidas.

La metformina es un medicamento que no ejerce acción sobre el páncreas, sino que su mecanismo de acción se basa en que potencia el efecto de la insulina en los tejidos adiposo y muscular, aumenta la afinidad de los tejidos a la absorción de glucosa, ayuda a los tejidos a sensibilizarse a la acción de la insulina, reduce la resistencia a la insulina, inhibe la gluconeogénesis y antagoniza los efectos del glucagón (Lorenzo *et al.*, 2008).

En los años 1950 se introdujeron la fenformina y la buformina, esta última tuvo un uso muy limitado y la fenformina se dejó de utilizar alrededor de los años 1970 debido a los reportes relacionados a reacciones adversas por acidosis láctica (Goodman y Gilman, 2007).

Tiazolidinedionas.

Las tiazolidinedionas tienen la capacidad de disminuir la hemoglobina glucosilada en un 0.5 % en pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2. Se puede utilizar en terapia con otros hipoglucemiantes, tanto orales como con insulina. Históricamente se utilizaron tres compuestos diferentes pertenecientes a esta categoría la troglitazona, rosiglitazona y la pioglitazona; la troglitazona fue prohibida debido a sus altos efectos hepatotóxicos (Goodman y Gilman, 2007).

Inhibidores de la glucosidasa α .

Los inhibidores de la glucosidasa α inhiben la absorción a nivel intestinal de almidón, dextrina y disacáridos mediante su capacidad inhibitoria de la glucosidasa α a nivel intestinal. Esta enzima, al verse inhibida, lentifica la absorción de carbohidratos, debido a esto los inhibidores de la glucosidasa α se utilizan para disminuir la concentración plasmática de glucosa posprandial (Goodman y Gilman, 2007).

Este grupo farmacológico no estimula la liberación de insulina, por ende, el paciente no se expone a hipoglucemia. Por esto se aprovecha su empleo en terapias para pacientes ancianos o pacientes que presenten hiperglucemia posprandial. Cabe destacar que los inhibidores de la glucosidasa α se utilizan como terapia combinatoria con otros anti hipoglicemiantes orales, insulina o ambos (Goodman y Gilman, 2007).

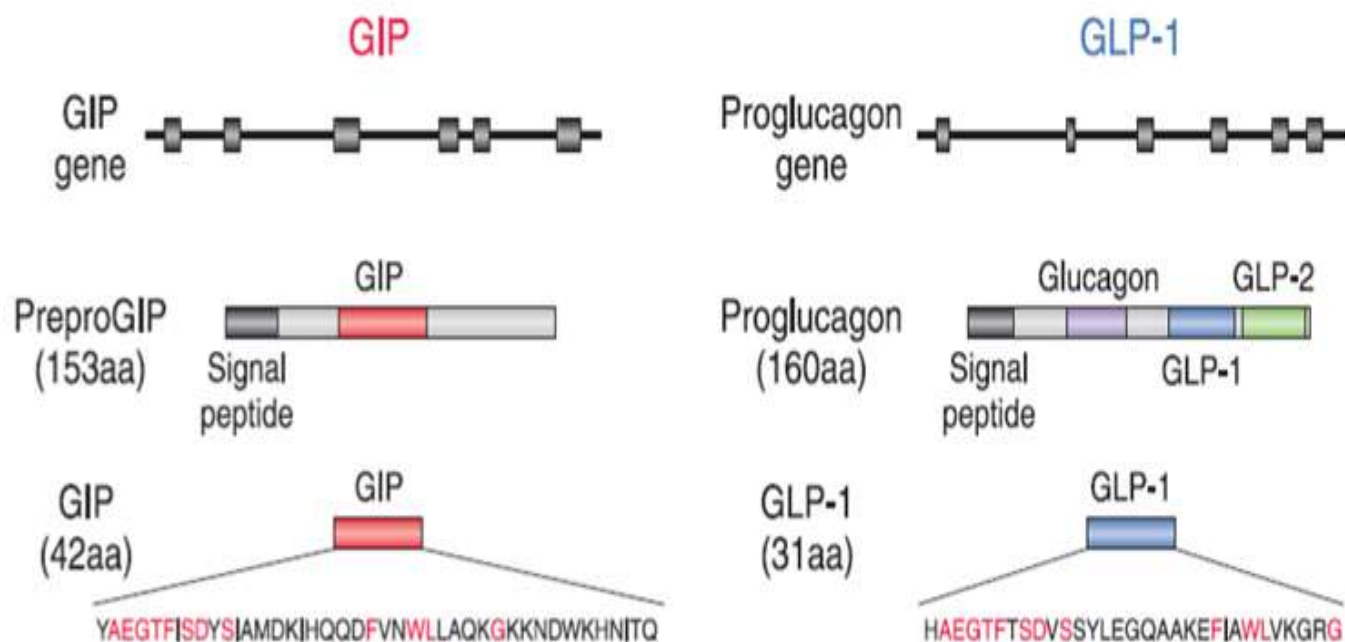
Incretinas.

Hace más de 40 años unos investigadores observaron que la administración de glucosa por vía oral, en comparación por vía intravenosa, producía mayor producción de insulina. Investigaciones posteriores identificaron 2 hormonas (Goodman y Gilman, 2007) mediante la purificación de los elementos, capaces de disminuir la glucosa; estos fueron compuestos existentes en extractos de intestino realizados por La Barre, dándole el nombre de Incretin (La Barre y Zunz, 1929).

Las hormonas reciben el nombre de “glucopéptido insulínico dependiente de glucosa” (GIP) y el “péptido glucanoide” (GLP-1). GIP es una proteína de 42 aminoácidos secretada por las células K en las porciones superiores del intestino delgado; GIP tiene una forma de preproGIP, una cadena de 153 aminoácidos que debe ser reducida a su forma activa de GIP (figura 5), la cual estimula la secreción de insulina en pacientes sanos y se definió que actúa directamente sobre los islotes pancreáticos (Daisuke, Fukushima y Seino, 2011).

La GLP-1 se encuentra en su forma inactiva en una cadena larga de 160 aminoácidos, la cual debe ser reducida a una cadena de 31 aminoácidos producida a partir del proglucagón y secretada por el intestino en porciones más inferiores y colon en las células L, con capacidad de estimular la secreción de insulina como su homóloga la GIP (Daisuke *et al.*, 2011).

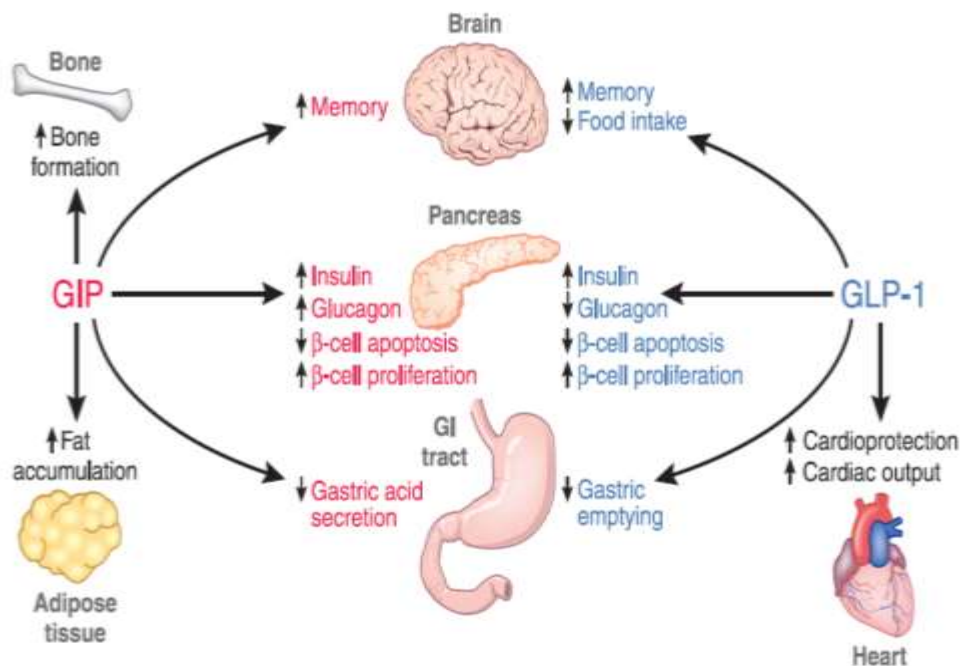
Figura n.º 5 Muestra a los precursores tanto de la GLP-1 como de la GIP antes de ser convertidos en una cadena de aminoácidos más corta con función hormonal



Fuente: Daisuke *et al.*, 2011

Las incretinas comparten propiedades en común y diferencias biológicas; las similitudes y diferencias en el proceso de secreción y metabolismo, así como sus acciones insulínótropas en las células beta del páncreas y sus funciones no insulínótropas (figura 6) (Daisuke *et al.*, 2011).

Figura n.º 6. Diagrama de los efectos insulíntricos y no-insulíntricos de la GIP y la GLP-1



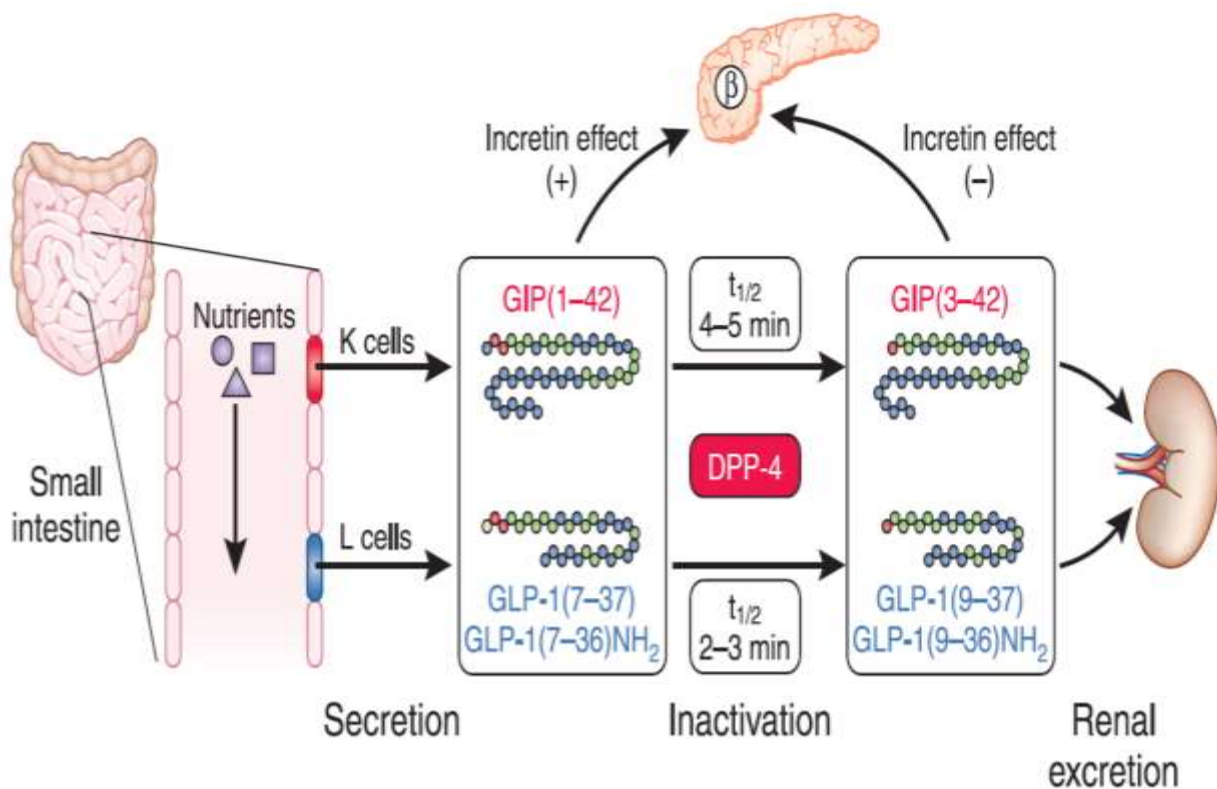
Fuente: Daisuke *et al.*, 2011

En cuanto a su metabolismo, ambas incretinas son rápidamente degradadas por la enzima DPP-4, siendo su tiempo de vida media de 4-5 minutos para GIP y de 2-3 minutos para GLP-1 (figura 7). Daisuke *et al.* (2011) determinan que el sitio de reconocimiento de la enzima DPP-4 es en el extremo N-terminal de ambas hormonas, realizando un corte en el segundo aminoácido del extremo N-terminal y obteniendo como productos finales GIP (3-42) y GLP-1 (9-36) NH₂ (Kieffer, McIntosh y Pederson, 1995).

Según Ahn *et al.* (2014), el tiempo de vida media de la GLP-1 es muy corto debido al rápido metabolismo realizado por proteasas tales como DPP4 y endopeptidasa neutral 24.11 (NEP 24.11); esta última corta en múltiples regiones, particularmente en los enlaces peptídicos en Glu²⁷-Phe²⁸,

Trp³¹-Leu³², Asp¹⁵-Val¹⁶, Ser¹⁸-Tyr¹⁹, Tyr¹⁹-Leu²⁰ y Phe²⁸-Ile²⁹. No obstante, la degradación de la GLP-1 mediada por la DPP-4 es la mayor causa de pérdida de funcionabilidad de la GLP-1.

Figura n.º 7. Secreción y metabolismo de las Incretinas



Fuente: Daisuke et al., 2011

Análogos de la GLP-1.

La administración de la GLP-1 nativa vía subcutánea a pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2 disminuye rápidamente los niveles de glucosa posprandial y los niveles de hemoglobina glucosilada de manera efectiva; también ayuda a la pérdida de peso (Drucker y Lovshin, 2009). A diferencia de otras drogas para la diabetes, los efectos insulínotropicos de la GLP-1 son autolimitados, ya que su efecto desaparece una vez que los niveles de glucosa son llevados a un rango normal, reduciendo el riesgo de hipoglucemia. Las propiedades farmacocinéticas de las GLP-1 modificadas en el laboratorio tienden a variar según el producto farmacéutico y las modificaciones que se hayan realizado (tabla n.º 3).

GLP-1 regula la elevación de la glucosa posprandial mediante varios mecanismos: promueve la expresión génica de la insulina por medio del estímulo a las células pancreáticas, estimula las células beta del páncreas a la proliferación celular y la neo-génesis, inhibe la apoptosis de las células beta del páncreas y bloquea la liberación de del glucagón. También retarda el vaciado gástrico e induce a la saciedad, lo que lleva a la disminución del peso corporal. La terapia con GLP-1 parece ofrecer además efectos cardioprotectores (Jung-Mo y Manandhar, 2014).

Exenatide (Byetta).

La exenatide es el primer agonista de GLP-1 que fue aprobado para el uso como tratamiento para la diabetes tipo 2. Exenatide es la forma sintética de la proteína natural, la cual se encuentra en el monstruo de Gila (*Haloderma suspectum*), péptido de nombre exendin-4. Este tiene

semejanza en un 50 % con la incretina humana GLP-1 y se une de manera potente al receptor de la GLP-1. La exendin-4 contiene una glicina en la posición 2, lo cual lo hace resistente a la degradación por la DPP-4 (Drucker y Lovshin, 2009).

Bydureon (exenatide LAR).

La formulación del bydureon permite la administración de manera semanal. Es una formulación basada en tecnología de microesferas, que incorpora la sustancia medicamentosa en una matriz en un polímero biodegradable, permitiendo su liberación lenta a lo largo del tiempo mediante una administración subcutánea (Gupta, 2013).

Liraglutida

Debido al éxito que obtuvo la exenatide, se aceleró el desarrollo de un nuevo agonista con propiedades farmacocinéticas optimizadas para una dosis de una sola administración al día o una vez a la semana. La liraglutida es una modificación de la GLP-1 humana que contiene un cambio en el aminoácido 34 de la cadena original y también se adicionó una cadena de ácido palmítico. Estas modificaciones facilitan la interacción entre la liraglutida a la albumina sérica, lo cual hace que los niveles plasmáticos permanezcan estables por más de 13 horas (Drucker y Lovshin, 2009).

Formas modificadas de la exenatide.

La AVE0010 es una forma modificada de la Exendin-4 con residuos de lisina al carboxi-terminal, en la fase IIb, dosis-rango. Se estudió en 542 pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2 que se encontraban inadecuadamente controlados solo con metformina. Los pacientes fueron tratados por 13 semanas con dosis escalonadas (5ug, 10 ug, 20 ug o 30 ug) una vez al día o dos veces al día o con placebo. Los datos observados de la hemoglobina glucosilada con base en tratamiento de una vez al día, fueron reducciones de (0.28-0.57 %) y dos veces al día de (0.47-0.69 %). En la actualidad se encuentra en investigación fase III (Drucker y Lovshin, 2009).

Albiglutida.

La albiglutida es un agonista recombinante de larga duración que consiste en 2 proteínas enlazadas entre una GLP-1 de humano modificada con una proteína de albumina sérica. Esta estructura le confiere la capacidad de ser administrada de manera semanal. A pesar de lo relativamente grande que es la albiglutida, los estudios en roedores demostraron ser capaces de activar el GLP-1R de forma satisfactoria (Drucker y Lovshin, 2009). Los efectos secundarios más comúnmente observados son náusea, vómitos, dolor de cabeza, mareo, nasofaringitis, dolor de espalda, infecciones del tracto respiratorio a nivel superior y reacciones cutáneas.

Tapsoglutida.

Es una proteína de GLP-1 basada en sustituciones en las posiciones 8 y 35 por ácido aminoisobutírico, lo cual le confiere resistencia a la degradación. Una formulación basada en zinc de tapsoglutida la hace capaz de ser administrada semanalmente. Drucker y Lovshin (2009) señalan que comparte un 93 % de homología con la GLP-1 nativa y es muy resistente a la degradación de la DPP4; también se identificó que disminuye los niveles de hemoglobina glucosilada en 1.1 % (Gupta, 2013).

Lixisenatide.

Es un agonista del receptor de GLP-1 de 44 aminoácidos, basado en la estructura del exendin-4, es desarrollado por Sanofi Aventis bajo la licencia de Zealand Pharma. El segmento C-terminal es modificado con un residuo de seis lisinas, lo que le confiere resistencia a la degradación por la DPP4 (Gupta, 2013).

Dulaglutide.

La dulaglutide es un análogo de la GLP-1 que está covalentemente unido a un fragmento de la inmunoglobulina clase 4 (IgG4). Esta combinación le brinda a la proteína mayor protección contra la DPP4 y disminuye el aclaramiento renal por el tamaño resultante de esta proteína fusión (peso molecular=59.7 kDa). Entre sus efectos adversos se enlistan náuseas, diarrea y distensión abdominal (Gupta, 2013, pp. 415, 417).

Otros agonistas de larga duración de la GLP-1R.

En estudios clínicos se encuentra la CJC-1134-PC, una proteína que contiene un péptido de Exendin-4 enlazada de manera covalente con una molécula de albumina sérica (Drucker y Lovshin, 2009). Datos de la fase I/II demostraron un perfil de tolerabilidad positiva y eficacias iniciales demuestran reducción de glucosa con una dosis semanal, este producto es altamente soluble, su vía de administración es subcutánea y se utiliza una formulación precargada de un pequeño volumen utilizando agujas de pequeño calibre (Conjuchem s.f).

La VRS-859 tiene el mismo mecanismo de acción que la exenatide, solo que con un tiempo de vida media proyectada sustancialmente más prolongada (139 horas) y una potencia *in vivo* más sostenida (control glucémico prolongado) que la exenatida u algún otro análogo de la GLP-1. VRS-859 es seguro y bien tolerado a las dosis más altas probadas en ratones (50 mg/Kg) y monos (35 mg/Kg) en estudios toxicológicos. Cuando se combina con resultados previos, el perfil de seguridad preclínica de la VRS-859 respalda el ensayo clínico actual diseñado para demostrar la seguridad y el mantenimiento del control glucémico a partir de una sola dosis mensual en pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2 (Versatis, 2010).

Tabla n.º 3 Información farmacocinética de algunos análogos de la GLP-1

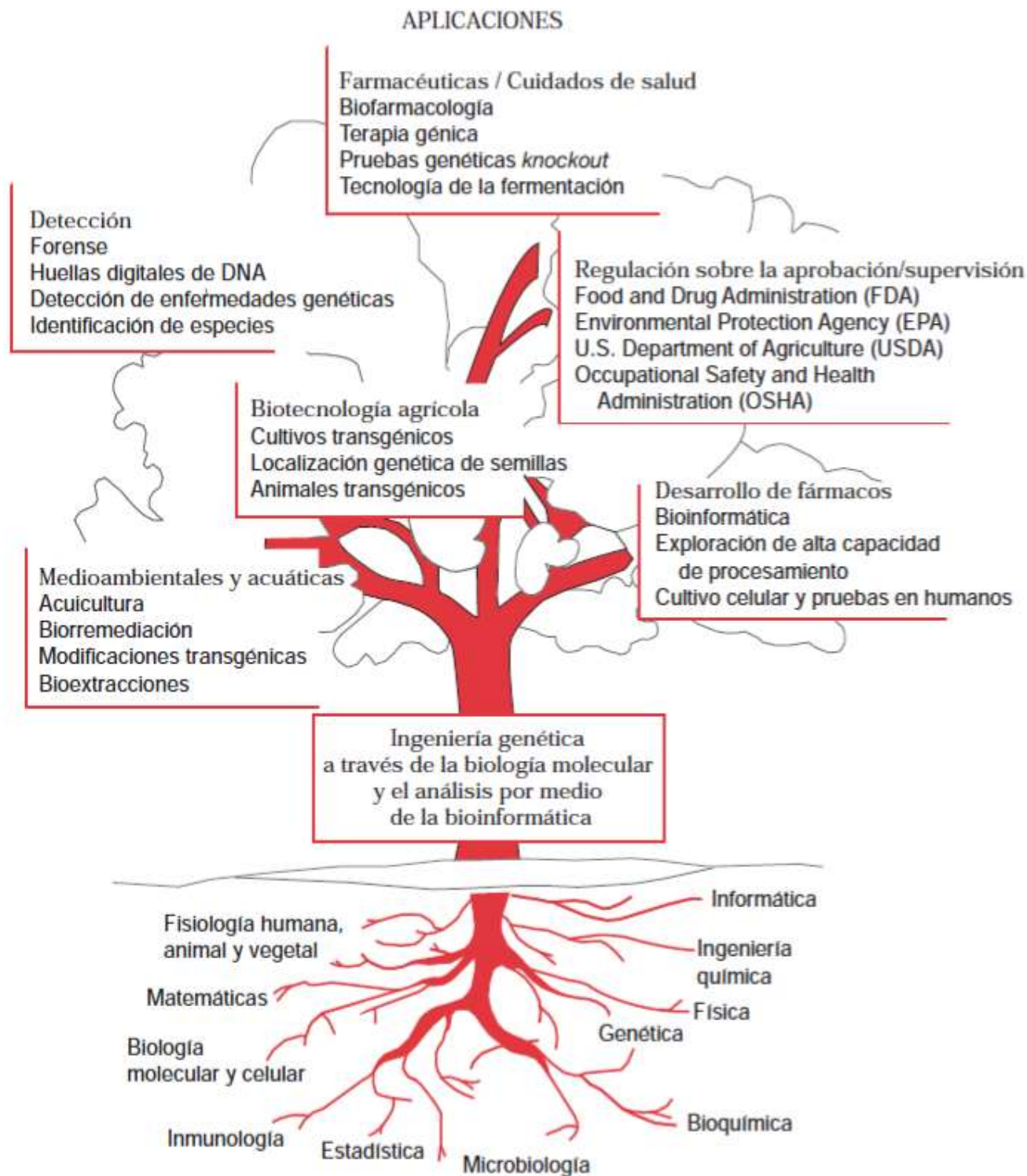
Table 1: Pharmacokinetics of Glucagon-like peptide-1 analogues				
	Manufacturer	Dosage	Plasma half-life	Excretion
Exenatide (approved 2005; USFDA)	Elililly / Amylin	5 mcg bid to 10 mcg bid s/c	2.4 hr	Renal
Liraglutide (approved 2010; USFDA)	NovoNordisk	0.6 mg to 1.8 mg s/c once a day	13 hrs	Metabolized by DPP4 and endopeptidase (not renally excreted) Renal
Exenatide LAR (approved EU, 2011)	Elilly / Amylin	2 mg/week s/c	95.4 hr (4 days)	Renal
Taspoglutide (halted)	Roche	Halted by Roche because of gastrointestinal and hypersensitivity reactions		
Lixisenatide	Sanofi Aventis	Uncertain (probably 20 mcg/day)	2-3 hrs	Renal (30% reduced clearance with GFR < 30 ml/mt)
Albiglutide	Glaxo-Smith-Kline	Uncertain (probably 30 mg/week)	6-8 days	
Dulaglutide	Elilly	Uncertain (once a week)	90 hrs	

Fuente: Gupta, 2013, p. 416

Biotecnología

La biotecnología es el uso de los organismos vivos, o los productos de los mismos, para el beneficio humano (o beneficio de su entorno) con el fin de desarrollar un producto o resolver un problema, la misma puede responder a muchas disciplinas y se puede aplicar para resolver diversos campos de las ciencias (Palladino y Thieman, 2017) (figura 8).

Figura n.º 8. Árbol de la biotecnología: disciplinas que contribuyen en la biotecnología



Fuente: Palladino y Thieman, 2017

La biotecnología abarca un amplio campo de estudio y diversas aplicaciones. Los productos de la biotecnología moderna van desde vacunas hasta la obtención de insulina, que fue el primer producto de la biotecnología para el aprovechamiento en humanos. Además, ayuda a la síntesis de fármacos. Muchos de los productos de la biotecnología para el aprovechamiento en humanos son para el tratamiento del cáncer (Palladino y Thieman, 2017).

Desde el año 2000 a.C. se realizaron estudios biotecnológicos por civilizaciones como la china, griega, romana, babilónica y egipcia. Desde la antigüedad, los seres humanos utilizaban la biotecnología para mejorar la producción de cultivos y ganado. Para el año 1928, Alexander Fleming descubrió que el moho *Penicillium* era el responsable de inhibir el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* que provoca enfermedades cutáneas en el hombre. Luego, por medio de distintos trabajos e investigaciones, se llevó a cabo el descubrimiento y la purificación de la penicilina antibiótica (Thieman y palladino, 2010).

Desde los años 1960 hubo un desarrollo muy rápido de la biotecnología, debido al descubrimiento de la estructura y función del ADN, y por medio de la ingeniería genética se logró manipular el ADN de un organismo. Esta técnica se conoce como tecnología del ADN recombinante y se utiliza para producir, por ejemplo, proteínas como la insulina, la hormona del crecimiento y factores coagulantes.

La biotecnología no es una disciplina de estudio único y limitado, sino que depende de muchas contribuciones de distintas áreas. Entre las disciplinas de la biotecnología, se encuentran: informática, ingeniería química, matemáticas, biología molecular y celular, física, genética,

bioquímica, inmunología, estadística y microbiología que realizan estudios de investigación en los organismos vivos tanto bioquímicos, como moleculares y genéticos (figura 8) (Thieman y Palladino, 2010).

Aplicaciones de la biotecnología

Las áreas en las que se desarrolla la biotecnología son la ingeniería genética, las medioambientales y las acuáticas, como por ejemplo la agricultura, biorremediación, modificaciones transgénicas, bioextracciones y desarrollo de fármacos. Su regulación en cuanto a aprobación y supervisión, es por medio de los entes reguladores de los Estados Unidos de América: Food and Drug Administration (FDA), Environmental Protection Agency (EPA), U.S. Department of Agriculture (USDA) y Occupational Safety and Health Administration (OSHA) (figura 8) (Thieman y Palladino, 2010, p. 5).

En el área forense se aprovecha la biotecnología en la detección de enfermedades genéticas, en la identificación de especies y en las pruebas de huellas para la identificación del ADN. En el área farmacéutica se aprovecha la biotecnología en la biofarmacia, terapia génica, pruebas genéticas, tecnología de la fermentación y cuidado de la piel (Thieman y Palladino, 2010). Como se puede observar, la biotecnología se utiliza tanto en las áreas para uso humano como en la microbiología, agricultura y biología marina (Thieman y Palladino, 2010).

A nivel de la industria farmacéutica, en Estados Unidos alrededor de 65 compañías biotecnológicas están trabajando en conjunto, por ejemplo la empresa Genetech en el año 1982 obtuvo la aprobación para la fabricación del primer producto biotecnológico usado en la diabetes (insulina recombinante). Hoy existen muchos productos desarrollados por medio de la biotecnología como lo son las vacunas, productos para el derrame cerebral, diabetes y cáncer (Thieman y Palladino, 2010).

Muchos de los productos son producidos mediante proteínas recombinantes, las cuales son creadas por técnicas de clonación de genes implicados en la transferencia genética de un organismo a otro, como genes humanos que se insertan en las bacterias para generar las proteínas recombinantes utilizadas en el tratamiento de enfermedades (Thieman y Palladino, 2010).

Biología sintética

La biología sintética es una ciencia no tan antigua, ya que desde hace muchos años los científicos alteran el material genético tanto de plantas como animales con el fin de crear nuevas especies. Sin embargo, es necesario diferenciar la ingeniería genética de la biología sintética. El objetivo de la biología sintética es diseñar nuevos sistemas genéticos utilizando partes que ya fueron estandarizadas (Choffnes, Pray y Relman, 2011).

El término de biología sintética es utilizado en diversos ámbitos, se entiende como aquella ciencia que combina tanto la biología, la ingeniería, el diseño, la construcción o la adaptación del ADN u otras estructuras biológicas en bloques de construcción estandarizadas e intercambiables

para poderlos utilizar en la creación de sistemas genéticos que van a tener una función específica según el diseño que se le haya asignado (Choffnes *et al.*, 2011).

La biología sintética es una ciencia interdisciplinaria donde principios de genética, robótica, nanotecnología, biología de sistemas, ingeniería y biología computacional pueden ser aplicados en conjunto para estudiar, manipular o introducir a un circuito genético a un chasis para varias aplicaciones; con el propósito de crear organismos sintéticos con funcionabilidad definida por el usuario a beneficio de la sociedad humana. La construcción de un circuito genético personalizado, robusto y confiable requiere de partes estandarizadas, es decir: promotores, reguladores, reporteros, unidades de traducción, terminadores, chasis, entre otros (Chung, Bhatia y Jain, 2015, p. 300).

La biología sintética, al igual que muchas áreas de la ciencia e investigación, se beneficia de los avances tecnológicos y del internet, ya que gracias a estos se desarrolla una base de datos en línea llamada *Registry of Standard Biological Parts*, que posee información genética actualizada con más de cinco mil BioBricks, donde cada uno de las biopartes contiene una secuencia de ADN con características particulares que permiten ensambles sistemáticos. Esta base de datos está conformada por información actualizada que aportan los estudiantes e investigadores de diferentes países (Aguilar, Ángeles, Trujillo y Váldez, 2012).

Otra herramienta computacional es *From Metabolite to metabolite*, que permite diseñar nuevas rutas metabólicas y predice el funcionamiento genético para así saber si el proyecto va a funcionar y llevarlo al laboratorio para crearlo; sin embargo, esto no significa que el circuito

genético funcione en el organismo una vez introducido pues todos los sistemas biológicos son complejos (Aguilar *et al.*, 2012).

Para la expresión de una proteína, se debe contar con cuatro partes fundamentales: un promotor para iniciar la transcripción; un sitio de unión de ribosoma para iniciar la traducción; una secuencia de proteína por codificar; y un plásmido. Estas cuatro partes de ADN fueron estandarizadas por profesionales en biología sintética conocidas como BioBricks o partes biológicas para que el ensamblaje pueda ser simple (asemejado al juego del lego) (Forster, Gullberg y Liljeruhm, 2010).

BioBricks o partes biológicas.

Una parte biológica (o simplemente, parte) es una secuencia de ADN que codifica una función biológica, por ejemplo, promotores o secuencias de codificación de proteínas. En su forma más simple, es una parte básica, una unidad funcional única que no puede ser dividida en unidades funcionales más pequeñas.

Son partes básicas que se pueden ensamblar entre sí para formar piezas de materiales compuestos más complejos, que a su vez se interrelacionen para que puedan ser operados por células vivas (iGEM, s.f.), con la finalidad de mejorar la compatibilidad y acceso a piezas estandarizadas.

Los investigadores de todo el mundo iniciaron un registro de partes estandarizadas o BioBricks que proporcionan una lista de elementos genéticos estandarizados que se han construido hasta el momento (Chung *et al.*, 2015).

Normas de montaje de los BioBricks.

Una parte es compatible con un estándar de montaje, siempre y cuando su secuencia cumpla con los requisitos de dicho estándar de montaje; esto significa que la parte no tiene ningún sitio de restricción que pueda interferir con el montaje. Se hace referencia a los sitios de restricción como “ilegales” (iGEM, s.f.).

Métodos de montaje.

Es el proceso físico de la combinación de dos o más muestras básicas o compuestos de piezas entre sí en serie para formar una pieza de material compuesto más grande (iGEM, s.f.).

Tipos de partes.

Promotores.

Un promotor es una secuencia de ADN que tiende a liderar la transcripción de una secuencia más larga de ADN (iGEM, s.f.).

Ribosome binding sites.

Es una secuencia de ARN encontrada en el ARNm que le da la señal al ribosoma al cual se une para iniciar la replicación (iGEM s.f.).

Terminadores.

Un terminador es una secuencia de ARN que por lo general se produce al final de un ARNm del gen u operón y hace que la transcripción se detenga (iGEM s.f.).

Cadenas principales de plásmido.

Un plásmido es una molécula circular, de doble cadena de ADN que contiene típicamente unos cuantos pares de bases mil que se replican dentro de una célula independientemente del ADN cromosómico. Un esqueleto del plásmido se define como la secuencia del plásmido comenzando con el sufijo BioBrick, incluyendo el origen de replicación y el marcador de resistencia a los antibióticos, y terminando con el prefijo BioBrick (iGEM s.f.).

Aplicación en la farmacia de la biología sintética.

Hoy las industrias farmacéuticas están interesadas en la producción biofarmacéutica, que se refiere a la combinación terapéutica de proteínas y de productos basados en ácidos nucleicos, también existen productos basados en células y tejidos (Glieder, Hartner y Vogl, 2013, p. 1).

La biología sintética se ha utilizado desde años atrás. En el 2003 el Dr. Keasling utilizó el microorganismo *E. coli* como precursor de la artemisinina para el tratamiento de la malaria, en donde la *E. coli* fue modificada genéticamente, se le introdujo información genética codificante para las enzimas que están involucradas en la vía metabólica del mevalonato de la levadura *S. cerevisiae* y el gen que codifica la enzima amorfadieno sintetasa, lográndose producir amorfa-1, 11-dieno, que es el compuesto a partir del que se puede sintetizar el medicamento en la bacteria (Aguilar *et al.*, 2012).

Asimismo, en el 2006 el Dr. Keasling reportó la producción de ácido artemisínico en la *S. cerevisiae* que es otro precursor del medicamento para la malaria. Esta molécula necesita menos modificaciones químicas para poder obtener el fármaco. Lo anterior se logró gracias a la modificación de la regulación de la vía del mevalonato y la introducción de dos genes de *Artemisia annua* en la levadura (Aguilar *et al.* 2012).

Gracias a la biología sintética, se crearon diseños para poder combatir infecciones virales y microbianas que son resistentes a los tratamientos convencionales, lo cual se desarrolló por medio del diseño y construcción de diferentes microorganismos, por ejemplo, la modificación genética de la *E. coli* Nissle 1917, para que se pudiera sintetizar el autoindicador CAI-17 que promueve la inhibición de los genes de virulencia de la *Vibrio cholerae*, del cual se hicieron estudios en ratones, en los que se disminuyó la colonización del virus, aumentando la supervivencia en los ratones infectados en un 85 % (Aguilar *et al.*, 2012).

Desarrollo actual de la biología Sintética en Costa Rica.

Prostal.

Prostal es un proyecto que pretende desarrollar un sistema de diagnóstico para la detección del cáncer de próstata mediante métodos no invasivos, el cual consiste en el diseño de una bacteria que, a partir de una muestra de orina, se detecta la presencia del carcinoma (Tecnológico de Costa Rica, 2016, párr. 2).

Magenta biolabs.

Diseña mediante la biología sintética la producción de ácido hialurónico, el cual tiene muchas aplicaciones y aprovechamientos tales como cosméticos para prevenir el envejecimiento, hidratantes de piel y para pacientes que padecen de artritis, entre otros (Dittel, 2016, párr. 2).

Hemoalgae.

Un proyecto basado en la biología sintética para producir anticoagulantes en microalgas con la finalidad de abaratar los procesos de fabricación (Umaña, 2017).

Cibus 3.0

Es un grupo tanto de estudiantes como de egresados del Instituto Tecnológico de Costa Rica y la Universidad Nacional de nacionalidad costarricense, quienes se encuentran desarrollando un proyecto de biología sintética. Su objetivo es de producir biodiésel a partir del suero de la leche, utilizando bacterias para la transformación del mismo. Se desarrolla dentro del marco del iGEM, una competencia mundial de biología sintética (*Cibus 3.0.*, s.f.).

Retos de la biología sintética.

Uno de los retos que se plantea en esta área es la bioseguridad, ya que en todos los países se deben de crear, revisar y discutir los marcos regulatorios para los nuevos organismos y saber que esto se desarrolla con objetivos beneficiosos para la población, pues se mejora el tratamiento de diversas enfermedades y la producción de diferentes energías renovables (Aguilar *et al.* 2012).

Otro de los retos que presenta esta ciencia es el interés de si existe la posibilidad de la creación descontrolada de patógenos que puedan causar graves daños tanto a la población como al medio ambiente. Por lo tanto, existe el temor de que alguna nación por problemas bélicos pueda transformar los patógenos en armas biológicas. Debido a esto, se deben de aplicar acuerdos y tratados internacionales rigurosos que sean efectivos (Murray, 2014).

A nivel bioético, según el informe *Principio para la supervisión*, la biología sintética presenta riesgos sanitarios, ambientales, de seguridad, económicos, sociales y éticos, por lo que se

insiste en que se aplique con debida precaución, siempre dándole seguimiento y controlando los estudios que se realicen (Murray, 2014).

Organismos modelos o “chasis”.

La biología sintética reúne dos entidades separadas: un programa (la extensión conceptual de un programa genético) y un chasis (la extensión conceptual de la célula viva). La biología sintética debe tomar en cuenta el chasis utilizado para expresar los diseños humanos (Danchin, 2012). En primer lugar, se define el término organismo artificial y organismo sintético. Deplazes y Huppenbauer (2009) señalan que los términos artificial y sintético tienen una definición similar. Ambos adjetivos se refieren a algo que ha emergido de una síntesis artificial. No obstante, el término artificial acentúa que el tema en cuestión ha sido hecho por el ser humano, algo opuesto a lo natural; sintético enfatiza que el tema en cuestión proviene de la síntesis (implica también que es algo que el humano hizo). Ambos términos son usados en conexión con la vida, organismo y célula. Así como el término de vida artificial se refiere a otras tecnologías más relacionadas con inteligencia artificial, un organismo sintético puede ser un organismo que ha sido sintetizado por el humano. Para producir un organismo que lleve la carga y exprese el genoma como tal, se debe aplicar una metodología de reemplazo de genoma, en la cual el genoma de una bacteria existente es reemplazado por el genoma sintético (Deplazes y Huppenbauer, 2009).

Se puede argumentar que la biología sintética se fundamentaba en un conjunto muy pequeño de organismos domesticados en el laboratorio, principalmente utilizando *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Estos organismos penetraron en el mundo de la biología molecular e ingeniería genética porque se adaptaban a condiciones de laboratorio, donde las tasas de crecimiento son altas y la abundante producción de proteínas se tomaron en cuenta. Se convirtieron así en los mejores microorganismos para ser utilizados como chasis para el desarrollo de biología sintética, ya que este campo creció fuera de biología molecular e ingeniería genética. Sin embargo, es cada vez más claro que estos no son los chasis ideales para que las capacidades de la biología sintética avancen en medicina, academia, industria y gobierno (Adams, 2016).

En la industria farmacéutica la terapia basada en proteínas actualmente se encuentra en un rápido crecimiento. Desde la introducción de la primera proteína recombinante humana, la insulina, numerosas proteínas fueron aprobadas para el tratamiento terapéutico en humanos, incluyendo eritropoyetina, varios interferones, factores de coagulación humana y anticuerpos monoclonales. La información del chasis provee el contexto que va a posibilitar leer la programación e interpretar y tomar acciones. Este tipo de información indica una gran variedad de propiedades: formas, dinámicas y flujos que muestran relaciones entre los componentes de “la máquina” y entre la máquina y el medio ambiente (Danchin, 2009).

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo se hace alusión acerca del tipo de enfoque en el que se centra la investigación, además se habla del diseño, objetos de estudios y variables del mismo. También se mencionan los procedimientos para la obtención del producto final de la modulación de la proteína en estudio.

Enfoque

Según Hernández, Fernández y Baptista (2014), el enfoque cuantitativo presenta un conjunto de procesos, el mismo es secuencial y probatorio. Las etapas del método cuantitativo no pueden ser obviadas o evitar sus pasos. La estructura de dicho método debe ser riguroso y los resultados de los métodos son medibles y/o cuantificables. La finalidad es demostrar la funcionalidad del método.

La investigación se realiza bajo un enfoque cuantitativo, porque se debe llevar a cabo un exhaustivo análisis de las proteínas, así como los cambios que se les efectúen, o proteínas que se pueden enlazar a la proteína análoga, para la culminación con una hormona que satisfaga las necesidades del investigador de manera *in silico*.

Diseño

Hernández *et al.* (2014) mencionan que en el enfoque cuantitativo se deben utilizar diseños para analizar las hipótesis hechas por el investigador en un campo de estudio en particular. El

diseño, además, sirve para concretar las hipótesis elaboradas anteriormente en pro de los objetivos planteados para la investigación que se desarrolla.

El diseño es el plan para obtener la información con el propósito de responder el planteamiento del problema. De esta manera, se formula la resolución del problema planteado, siguiendo diseños de modulación de proteínas ya establecidos con ayuda de páginas de internet especializadas en este tipo de estudios.

La investigación se enfoca en un diseño cuantitativo no experimental, que es definida, según Hernández *et al.* (2014), como “la investigación que se realiza sin manipular deliberadamente variables. Es decir, se trata de estudios donde no se varía en forma intencional las variables independientes para ver su efecto sobre otras variables”.

Además, es de tipo transeccional, correlacional-causal. En este tipo de diseños el investigador toma los datos en un solo momento con el propósito de analizar su interrelación. La causalidad se establece por el investigador en a raíz de su hipótesis, fundamentado en revisión de literatura, son estudios que da la capacidad de predecir el comportamiento (Hernández *et al.*, 2014).

Objeto de estudio

La investigación pretende diseñar un modelo de expresión génica por medio de programas computacionales, estudiando las diferentes variables, chasis y cambios potenciales por efectuar

sobre la GLP-1. Esta investigación se realiza en la Universidad Internacional de las Américas, ubicada en San José, Costa Rica.

Variables

Variable	Definición conceptual	Definición instrumental	Definición operacional
Estructura de ADN	Se conoce como el material genético de un individuo, se encuentra dispuesto mediante un orden establecido.	Proporcionado por <i>Integrated DNA Technologies</i> .	Se analizan las probabilidades de realizar cambios a nivel genético del microorganismo.
Análogo de incretina tipo GLP-1	Hormona incretina, la cual tiene un importante papel en el manejo o control de la glucosa.	Definido por páginas de internet como NCBI, <i>Protein Data Bank</i> y uniprot.	Se determinan posibles cambios que se le puedan efectuar a la hormona para obtener al final una proteína nueva que, con apoyo en evidencia científica, sea guiada a un tiempo de vida media mayor.

Chasis	Es el organismo que lleva el peso de la información genética.	Obtenido de fuentes confiables de información.	Se determina cuál es el chasis que mejor se ajusta a los requerimientos de la investigación.
Promotores	Un promotor es una secuencia de ADN, la cual lidera la transcripción de la secuencia de ADN.	Es obtenido de la base de datos de <i>BioBricks</i> del iGem,org.	Discriminar de una base de datos el promotor por utilizar.
Terminador	Son partes genéticas que usualmente aparecen al final de un gen u operación en función a terminar su replicación.	Es obtenido de la base de datos de partes <i>BioBricks</i> del iGem,org.	Discriminar de una base de datos el terminador por utilizar.
RBS (<i>Ribosome binding site</i>)	Sitio de unión ribosómica, es una secuencia de ARN que se encuentra en el ARNm, al cual los ribosomas se unen para iniciar la traducción.	Es obtenido de la base de datos de partes <i>BioBricks</i> del iGem,org.	Discriminar de una base de datos el RBS por utilizar.
Plásmido	Fragmento de ADN de doble hélice, el cual se	Será obtenido de la base de datos de partes	Discriminar de una base de datos el plásmido por utilizar.

	encuentra en el citoplasma de las bacterias y levaduras.	<i>BioBricks</i> del iGem,org.	
Linker	Secuencia de aminoácidos utilizadas para la combinación de proteínas.	Es obtenido de la base de datos de partes <i>BioBricks</i> del iGem,org.	Discriminar de una base de datos el Linker por utilizar.
Péptido señal	Secuencia de aminoácidos de aproximadamente 16-30 aminoácidos, la misma es una señalización para el transporte al exterior de la célula.	Es obtenido de la base de datos de partes <i>BioBricks</i> del iGem,org.	Discriminar de una base de datos el péptido señal por utilizar.

Instrumentos

En esta investigación, los resultados se obtienen por medio de aplicaciones que permiten al investigador manipular material genético y generar un constructo genético a nivel *in silico* para un organismo en específico y de páginas de internet que aportan al investigador información de proteínas.

Para la elaboración del modelo de expresión génica, se utilizó benchling.com, el cual es una plataforma donde los científicos pueden diseñar, compartir y registrar experimentos en una sola interfaz. Es ampliamente utilizado por compañías farmacéuticas y de biotecnología, así como laboratorios con fines académicos y gubernamentales (Benchling, s.f.).

La herramienta *in silico* para manipular cadena peptídica y realizarle modificaciones para su visualización en tercera dimensión es Chimera, un programa altamente extensible para la visualización interactiva y análisis de estructuras moleculares y datos relacionados, los cuales incluyen mapas de densidad, ensamblajes supramoleculares, resultados de acoplamiento, trayectorias y conjuntos conformacionales (Chimera, s.f.).

Se optimizó la información proteica para el chasis mediante el codón optimization tool, el cual está ideado para simplificar el diseño de genes sintéticos y gBlocks® fragmentos génicos para la expresión en una variedad de organismos. La idea principal es optimizar una secuencia de ADN o proteína de un organismo huésped para su expresión en otro, mediante la reasignación de los codones (Integrated DNA Optimization, s.f.).

Para la obtención de los *BioBrick* se utilizó el catálogo del iGEM una colección de partes genéticas que se encuentra en constante crecimiento, las cuales se pueden mezclar y combinar para construir dispositivos y sistemas de biología sintética (iGEM, s.f.).

Procesos para la recolección y análisis de datos

El siguiente apartado tiene la finalidad de proporcionar una breve descripción del procedimiento que se llevó a cabo para la obtención y el análisis de los datos.

Revisión bibliográfica para la elección del chasis para la expresión del vector

Se recopiló información de distintas bases de datos y revistas indexadas dedicadas a la investigación; por ejemplo: Scielo, EBSCO, PudMed, Springer, Annual reviews y PNAS acerca de los chasis para realizar una pequeña revisión bibliográfica. Con base en la revisión bibliográfica, se hizo la elección del chasis más adecuado para expresar el vector de expresión génica.

Modelación del análogo de la GLP-1

Para efectuar los cambios a la proteína de estudio, se buscaron artículos de interés en páginas de revistas de distintas bases de datos y revistas indexadas dedicadas a la investigación; por ejemplo: Scielo, EBSCO, PudMed, Springer, Annual reviews y PNAS en búsqueda de información acerca de la interacción de la GLP-1 con su receptor y la DPP4.

Para la búsqueda de la cadena de aminoácidos de la GLP-1, se consultó la base de datos del Protein Data Bank para luego ser modificada según lo que expongan otros investigadores.

Se identificaron los posibles cambios que se pueden realizar a la proteína GLP-1 y las posibles combinaciones de proteínas, además de integrar todas las partes que componen el constructo para obtener la expresión génica idónea por parte del microorganismo elegido.

Formulación del vector de expresión

Para la elaboración del constructo, se tomaron los BioBricks (*Promoters, Ribosome Binding Site, Linkers, signal peptide, plasmid, terminator*) del iGEM y artículos de revistas científicas que evidenciaran que las partes biológicas son de utilidad para el chasis escogido.

Se tomó la proteína modificada y se optimizaron los codones para expresar el organismo escogido. Asimismo, se elaboró el constructo tomando toda la información recopilada y se integró al *benchling*.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Este capítulo expone los resultados obtenidos durante el proceso de la investigación. También se discuten los hallazgos encontrados según los objetivos planteados, por lo que se subdivide en las siguientes secciones: la selección del chasis, la elaboración del análogo de la GLP-1 y la elaboración del constructo.

Selección del chasis

Utilizar el correcto sistema de expresión para las características específicas del vector que se trabaja es la clave del éxito. La solubilidad de la proteína, la funcionabilidad y el rendimiento son factores cruciales por considerar cuando se seleccionan sistemas de expresión. La selección del chasis se hace mediante la revisión de artículos científicos publicados en revistas, en donde los autores indican los aspectos negativos y positivos de los chasis que se utilizan actualmente en la biología sintética para el aprovechamiento tanto en investigación como en la industria. Se resumen algunas de sus cualidades a continuación:

La bacteria *Escherichia coli* es el chasis utilizado con más frecuencia en biología sintética, con el kit de herramientas disponible más grande de diseño computacional: programas, partes genéticas y elementos reguladores (promotores, sitios de unión ribosómica, y terminadores), así como vectores de ADN y protocolos de entrega de ADN (Adams, 2016).

Sin embargo, *E. coli* es un organismo procariota y las proteínas de organismos eucariotas que requieren modificaciones no son producidas correctamente; además, se dificulta la secreción de la proteína y las proteínas expresadas en grandes cantidades pueden precipitar formando cuerpos de inclusión. *E. coli* cuenta con maquinaria limitada para realizar cambios postraduccionales, lo cual se considera como una desventaja. Las glicoproteínas se presentan raramente en organismos procariotas debido a que estos organismos carecen de organelas (Khow y Suntrarachun, 2012).

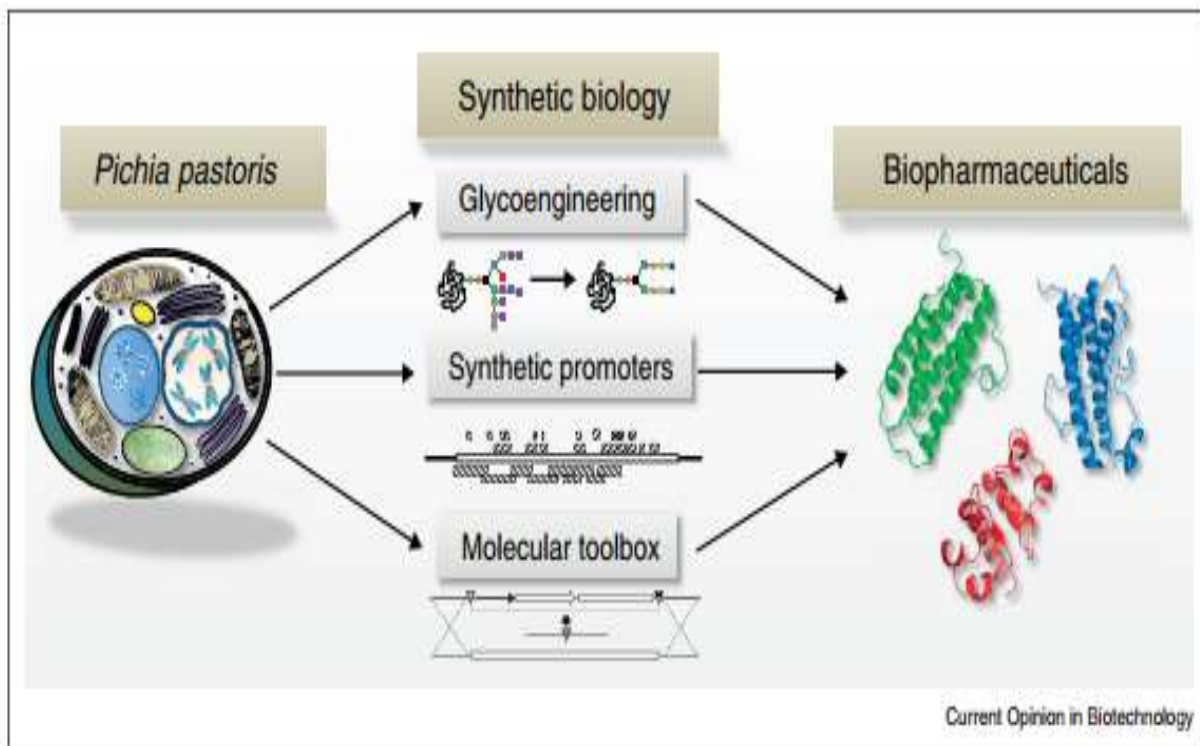
La bacteria *Bacillus subtilis* es un organismo modelo debido a sus vías secretoras endógenas para enzimas y producción de antibióticos. Este organismo no patogénico fue certificado y reconocido como un organismo para su uso en investigación en laboratorios seguro (GRAS), y utilizado ampliamente en aplicaciones de biotecnología, pero su uso en biología sintética fue bastante limitado. Las características principales que hacen que la *B. subtilis* sea un atractivo chasis para la biología sintética son competencia natural, fácil integración del ADN en el cromosoma y una amplia gama de sistemas naturales de dos componentes y sistemas de detección de quórum que pueden modificarse para aplicación en biosensores (Adams, 2016).

Saccharomyces cerevisiae (levadura) es un organismo modelo importante, es uno de los organismos biológicos mejor entendidos alrededor del mundo (Ellington y Enyeart, 2011, p. 413). *Saccharomyces cerevisiae* fue ampliamente usado en la industria alimentaria y biotecnología, considerada como un organismo generalmente seguro, fue estudiada con profundidad a nivel molecular y celular como modelo del sistema eucariota. Por esto las levaduras son un buen organismo plataforma para practicar biología sintética (Jin *et al.*, 2014).

En las dos últimas décadas *Komagataella pastoris* se estableció como uno de los más frecuentes sistemas de expresión en la industria y en la academia. A pesar del gran número de enzimas, muchas proteínas humanas y biofarmacéuticas fueron producidas en *K. pastoris* (Glieder *et al.*, 2013, p. 1096). La mayoría de estas proteínas humanas son glicosiladas.

La levadura *K. pastoris* mostró ser excelente para glicosilar las proteínas con mecanismos similares al del humano. La ampliación y producción de proteínas recombinantes en la levadura es una tecnología bien establecida, es razonable esperar el alto rendimiento y rentabilidad de cepas de levadura manipuladas con glicoingeniería para llegar a hacer impacto en la industria biofarmacéutica (figura 10) (Gerngross y Hamilton, 2017, p. 387). La levadura *K. pastoris* se convirtió en uno de los más exitosos y populares sistemas hospederos para la producción de proteínas heterólogas, debido a su rápido crecimiento (Calic y Massahi, 2014, p. 179).

Figura n.º 9. Aprovechamiento de la *Komagataella pastoris* (antes, *Pichia pastoris*) en el desarrollo del campo biofarmacéutico



Fuente: Glieder *et al.*, 2013

A raíz de la bibliografía revisada se selecciona a la *K. pastoris* debido a su capacidad de realizar glicosilaciones y porque la proteína por sintetizar: GPC3 (proteína que es capaz de inhibir la función degradadora de la DPP4, pertenece a la familia de las proteínas de los proteoglicanos) se encuentra altamente glicosilada. También por la capacidad de glicosilación y su alto rendimiento para producción de proteínas recombinantes de *K. pastoris* (Gerngross y Hamilton, 2017).

En cuanto a las bacterias, en general poseen una habilidad para glicosilar proteínas, salvo el *Campylobacter jejuni*, que tiene la habilidad de modificar proteínas a nivel postraduccional a proteínas en su N-terminal (Cain, Cordwell y Solís, 2013). De esta manera, a la *K. pastoris* se le confiere una característica provechosa para ser escogida como chasis de la presente investigación.

Por consiguiente, todos los BioBricks para realizar el vector de expresión son escogidos pensando en trabajar con *K. pastoris*. Según la bibliografía, otros chasis no son capaces de llevar a cabo glicosilaciones a las proteínas y si son capaces de glicosilar, no lo hacen de forma tan eficiente como la *K. pastoris*. Se tiene un conocimiento amplio de la genética de la mayoría de los organismos con los que se trabaja en biología sintética.

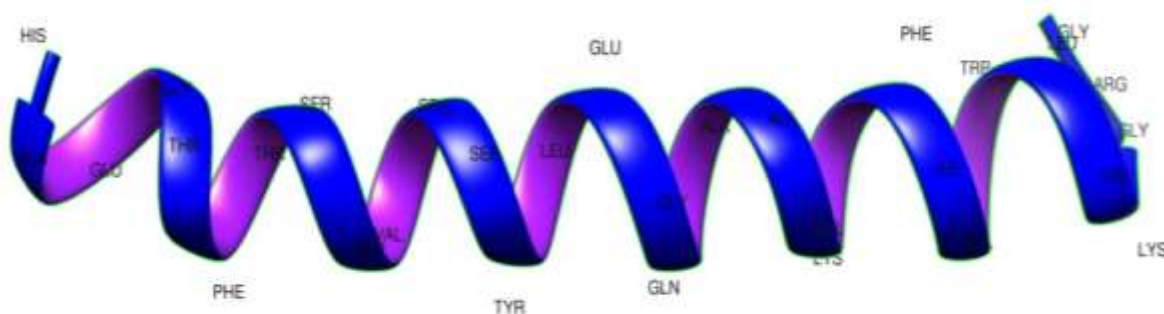
Elaboración de un análogo de la GLP-1

Se obtuvo la información de los fármacos ya existentes tanto en el mercado como en fases de investigación, que se estudiaron para el tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo 2, pertenecientes al grupo farmacológico “análogos de la GLP-1”, los cuales son capaces de unirse al receptor de GLP-1 (GLP-1R) y ejercer los efectos deseados discutidos en el capítulo II de este trabajo de investigación.

Ahn *et al.* (2014) mencionan aminoácidos críticos para la interacción con el receptor, los cuales son: His⁷, Gly¹⁰, Phe¹², Thr¹³, Asp¹⁵, Phe²⁸ e Ile²⁹; además His⁷, Gly¹⁰, Asp¹⁵ y Phe²⁸ son críticos para la activación del receptor. Se tomó la GLP-1 para efectuar los cambios deseados según

la bibliografía consultada, para esto se tomó su secuencia FASTA de amino ácidos (AA), la cual fue facilitada por la página de la PDB, dando con la 5VAI (PDBID) (figura 10) (Chu *et al.*, 2010).

Figura n.º 10 Estructura de la proteína GLP-1



Fuente: Chu *et al.*, 2017

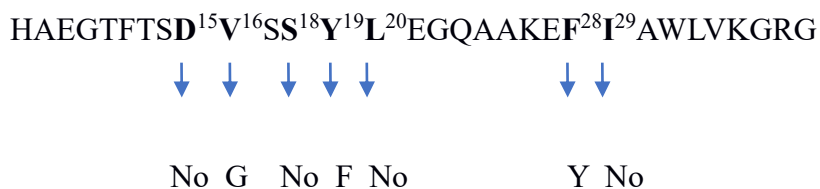
Modificación de la GLP-1 para evitar la degradación de la enzima NEP 24.11

La hidrólisis de la GLP-1 es mediada por la enzima NEP 24.11. Esta hidrólisis ocurre particularmente entre los aminoácidos Glu²⁷-Phe²⁸ and Trp³¹-Leu³², y otros sitios incluidos a continuación Asp¹⁵-Val¹⁶, Ser¹⁸-Tyr¹⁹, Tyr¹⁹-Leu²⁰ and Phe²⁸-Ile²⁹ (Ahn y Manandhar, 2014. p. 1021). Estos mismos sitios de corte son mencionados por Carr, Deacon, Holst y Plamboeck (2005), los cuales son marcados con “negrita” en la secuencia de AA de la GLP-1 (5VAI).

HAEGTFTSD¹⁵**V**¹⁶SS¹⁸**Y**¹⁹**L**²⁰EGQAAKEF²⁸**I**²⁹AWLVKGRG

Los cambios se hicieron considerando las características fisicoquímicas de los aminoácidos para conservar las cargas intermoleculares e interacciones de la proteína (McMurry, 2008, pp. 1018-1019). Respetando además los aminoácidos importantes para la unión con el receptor.

Se realizan los cambios en la cadena de aminoácidos apoyado en la bibliografía consultada obteniendo la nueva cadena proteica la cual se va a utilizar para la elaboración del modelo de expresión para la síntesis. Los cambios de los aminoácidos V¹⁶, Y¹⁹, F²⁸ por Glicina (G), Fenilalanina (F), Isoleucina (I) respectivamente, se respeta el cambio sobre los aminoácidos D¹⁵, S¹⁸, L²⁹ e I²⁹ debido a que estos son necesarios en el acople al GLP-1R.



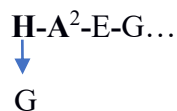
Luego de haber realizado los cambios de AA a la GLP-1, obtenemos la siguiente cadena de aminoácidos. GLP-1.1 (se resaltan en negrita los AA que forman parte de la nueva cadena):



Modificación de la GLP-1 para evitar la degradación de la enzima DPP4

La proteína GLP-1 es degradada por la DPP4, liberando los dipéptidos His-Ala de la cadena de aminoácidos de la GLP-1 que se encuentran en la posición N-terminal de la cadena peptídica. La DPP4 tiene una afinidad de corte por prolina/alanina y la longitud (residuos) de 3-80 aminoácidos (Mentelein, 1999).

El sitio de corte de la DPP4 es en el segundo aminoácido (X_{1aa} - X_{2aa} -/ X_{3aa} -polipéptido) (tabla 4). Además, el sitio los residuos aceptados en el X_{2aa} = P, A y en X_{3aa} es cualquier aminoácido menos una prolina para que se realice el corte polipéptidos (figura 12, anexos) (Mentelein, 1999, pp. 10-12). A continuación, se detalla el cambio realizado de la alanina (A) por una glicina (G) en el aminoácido X_{2aa} .



Luego de haber hecho los cambios en los aminoácidos a la GLP-1.1, se obtiene la siguiente cadena de aminoácidos. GLP-1.2 (se resaltan en negrita los AA que forman parte de la nueva cadena):

HG²EGTFTSDGSSFLEGQAAKEYIAWLVKGRG

Tabla n.º 4 Prolina/alanina sitio de corte específico de endo- y exopeptidasas

Protease	Requirement of the cleaved peptides			M _i		Catalytic properties		Membrane m	
	Cleavage site	Residues accepted at	Chain length (residues)	Native	Subunit	Inhibitors ^b	pH Optimum		
DPP IV EC 3.4.14.5 ^c	○-■-□-	P.A	≠P	3-80	220 000	110 000	Dip-F Diprotin A	8.0	m (s)
DPP II EC 3.4.14.2	○-■-□-	A.P	Many	3-11	110 000	53 000	Dip-F K-A-CH ₂ Cl	4.5-6.0	s (m)
X-Pro aminopeptidase EC 3.4.11.9	□-■-○-	P	Many	3-40	270 000	90 000	Phen Apatatin	7-8	m (s)
Prolyl aminopeptidase EC 3.4.11.5/1 ^d	■-□-	Many	Many	2-30	300 000	54 000	Phen Amastatin	7-8.5	s
Prolyl oligopeptidase EC 3.4.21.26	-■-□-	P.A	≠P	4-30	81 000	81 000	Dip-F Z-P-prolinal	7.5-8	s
Membrane Pro-X carboxypeptidase EC 3.4.17.16	-■-□	P.A.G	≠P	2-7	240 000	135 000	Phen	8	m
Lysosomal prolyl carboxypeptidase EC 3.4.16.2	-■-□	P	≠P	≧3	200 000	25 000	Dip-F	4.5-5.5	s
X-Pro dipeptidase EC 3.4.13.9	□-■	PHyp	≠P	2	108 000	54 000	EDTA Z-Pro	7.5	s
Pro-X dipeptidase EC 3.4.13.8	■-□	P.A	≠P	2	300 000		Phen	8-9	s

Fuente: Mentlein, 1999, p. 10

Adición de glypican 3 (proteína inhibidora de DPP4) a la cadena GLP-1.2

Glypican 3 (GPC3) es una proteína que demostró tener interacción con la DPP4 (Gorrel, Kirby, O'connor y Yu, 2010, p. 38) inhibiendo células hematopoyéticas a la actividad de la DPP4 en células de hepatocarcinoma (Kim, et al. 2014). Las propiedades inhibitorias de la GPC3 la hacen una proteína de interés, debido a su capacidad de brindarle un mayor tiempo de vida media a la GLP-1 modificada. Se decide entonces llevar a cabo una proteína fusión de GLP-1.2 y glypican 3. Se busca la secuencia de aminoácidos en NCBI, obteniendo la isoforma XP_016884902.1 (tabla 5, Anexos) de glypican 3.

Elaboración del constructo

En el siguiente apartado se indican los BioBricks con los que se elaboró el vector de expresión génica. El **promotor** es una secuencia de ADN con la función de promover la transcripción, estos pueden ser constitutivos (dependen de la viabilidad de ARN polimerasa para comenzar la transcripción) e inducibles (es decir, la expresión puede ser controlada); **UTR 5¹** y **UTR 3¹** (*Untranslated regions*) son partes que no son traducidas; **RBS** es el sitio donde se une el ribosoma para comenzar la traducción; **péptido señal** es agregado con la finalidad de que la proteína sea incorporada al sistema de endomembranas de *K. pastoris*; el **linker** es una secuencia de aminoácidos que tiene la función de enlazar la GLP-1.2 con la glypican 3; **terminador** es la parte que se encuentra al final del vector de expresión, su función es la de indicar que la

transcripción se debe de detener. Todas las partes son seleccionadas de acuerdo con su compatibilidad y su funcionabilidad según el vector de expresión. A continuación, la selección de los BioBricks:

Promotor

Para la selección del promotor se buscaron en el catálogo del iGEM promotores para organismos eucariotas estandarizados, de esta manera se aseguró el funcionamiento en la *K. pastoris*; los mismos pueden ser positivos, negativos o constitutivos. Para esta investigación se buscó uno constitutivo que pudiera utilizarse para una célula eucariota con el nombre de identificación de iGEM: BBa_K076017 (tabla 5, Anexos).

UTR 5¹ y UTR 3¹

Los UTR seleccionados como BioBrick para la elaboración del constructo fueron diseñados por Julia Schirmacher, del grupo de iGEM de Alemania, el mismo es un vector utilizado para la recombinación de genes para levadura de sus códigos en el catálogo del iGEM son para el UTR 5¹: BBa_K863200 y para el UTR 3¹: BBa_K863201 (tabla 5, Anexos).

RBS (*Ribosome Binding Site*)

El RBS es escogido para levadura de la página del iGEM, BioBrick Código iGEM: BBa_J63003 (tabla 5, Anexos).

Signal peptide

Se discriminó de los 56 *signal peptides* reportados en el artículo publicado por Calic y Massahi (2014, pp. 182-184), siendo el de mayor interés por su eficacia SP13, debido a que fue utilizado de manera *in vitro* para *K. pastoris* en investigaciones previas a la que se realizó en esta tesis (Calic y Massahi, 2014, pp. 182-185) (tabla 5, Anexos).

Linker

Las proteínas de interés deben estar enlazadas por un *linker*, el cual es una cadena de aminoácidos rígida, para que los dominios de las 2 proteínas se mantengan separados (Chen, Shen y Zaro, 2013, p. 5). Debido a que mejora la estabilidad en la recombinación de proteínas, se escogió la secuencia: GGGGGGGG.

UTR 3'

Los promotores seleccionados como BioBrick para la elaboración del constructo fueron diseñados por Julia Schirmacher, del grupo de iGEM de Alemania, el mismo es un vector utilizado para la recombinación de genes para levadura sus códigos en el catálogo del iGEM son para el UTR 5': BBa_K863200 y para el UTR 3': BBa_K863201 (tabla 5, Anexos).

Terminador

De la base de datos del iGEM se selecciona el terminador que se adecúe al chasis seleccionado (tabla 5, Anexos).

Plásmido

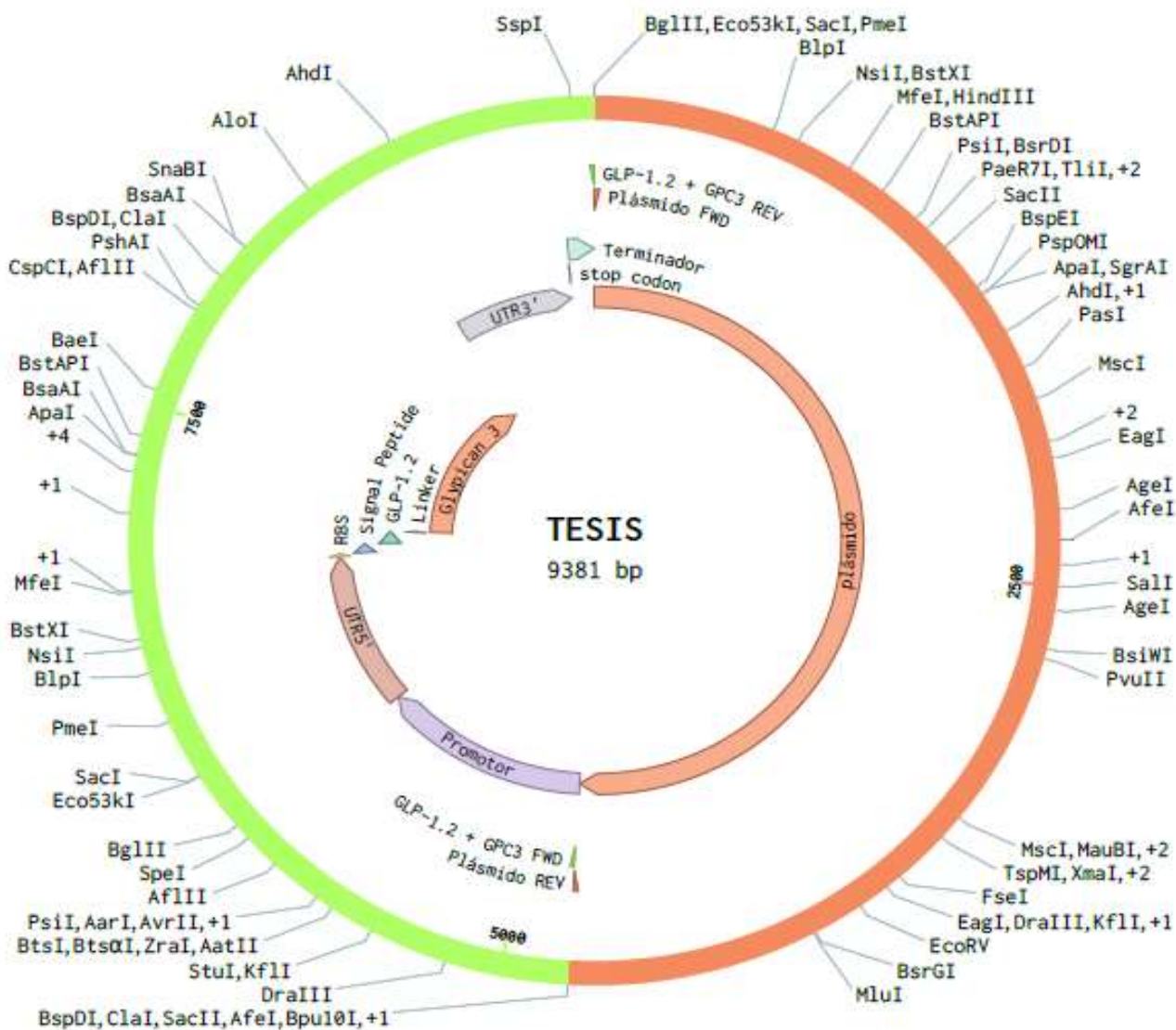
De la base de datos del iGEM se selecciona un plásmido para levadura, el BBa_K805020, debido a su ventaja de cantidad y calidad, en cuanto a la expresión de proteínas recombinantes (tabla 5, Anexos).

Optimización de secuencias de ADN a partir de secuencias de aminoácidos

Antes de integrar la información en el *benchling* para realizar el constructo, se tradujo la información de secuencia de aminoácidos de la GLP-1, glypican 3 y el *signal peptide* al idioma de la *K. pastoris*. La síntesis de proteínas de información de aminoácidos a bases de gen se llevó a cabo con IDT, Codon Optimization Tool. Los resultados de la traducción se encuentran en la tabla 5, Anexos.

El constructo elaborado (figura 11) integró todas las partes anteriormente señaladas, el mismo está elaborado para ser expresado por la levadura *K. pastoris* para la obtención del análogo de la GLP-1, pensado para aumentar el tiempo de vida media de la incretina.

Figura n.º 11 Vector de expresión elaborado



Fuente: Elaboración propia, el vector se puede observar en el siguiente link.

<https://benchling.com/s/seq-OPbGf4MFK2n3Q30c8KvR>

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La biología sintética brinda nuevas y mejores herramientas para la elaboración de nuevas sustancias con fines terapéuticos, la misma puede ser altamente aprovechada en enfermedades con un elevado grado de dificultad de tratamiento, tales como diferentes tipos de cáncer, enfermedades degenerativas, enfermedades crónicas, entre otros.

Como bien lo menciona su nombre, la biología sintética es aquella ciencia que diseña organismos para que ayuden en diferentes áreas de la vida cotidiana. A nivel farmacológico se demuestra que esta ciencia puede desarrollar métodos para tratar una enfermedad, como la diabetes *mellitus* por medio de la modificación de bacterias o levaduras.

La elección de la *Komagataella pastoris* en este trabajo de investigación representa la función para la que fue diseñado el vector de expresión, por medio de la información genética y la expresión del ADN en el organismo. Para la selección del chasis fue crítica la capacidad de glicosilar proteínas, además de que es considerado un organismo seguro para la expresión de proteínas y actualmente se produce un precursor de la vacuna contra la malaria mediante la biología sintética.

Se realizaron cambios a la incretina GLP-1 en aminoácidos manipulando la información proteica de manera dirigida; cambios críticos para evitar su degradación y así aumentar su tiempo de vida media; también la combinación de la glypican 3, una proteína con capacidad de inhibir a la DPP4.

El vector de expresión génica se ideó con el propósito de elaborar un medicamento nuevo para el tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo II por medio de la *Komagataella pastoris*, el cual tiene la característica de ser expresado de manera constitutiva con la capacidad de ser excretado fuera de la célula una vez sintetizado por el chasis.

Como recomendación, es necesario estimular la participación del profesional farmacéutico en proyectos y competencias relacionados con la biología sintética y que trabaje en conjunto con el biotecnólogo en la investigación y fabricación de nuevos productos con fines farmacológicos, tales como encontrar la cura a diversas enfermedades de las cuales hoy no existe tratamiento.

Otra recomendación, como se desarrolló en este trabajo de investigación, es el aprovechamiento de los chasis, tales como las bacterias y levaduras. Por medio de la organización genética en los organismos se pueden desarrollar ideas que ayuden a la elaboración de nuevas rutas de fabricación de medicamentos. Además aprovechar la biología sintética para idear proyectos en pro de cuidar el ambiente, al generar energía limpia y otras formas de combustible.

REFERENCIAS

- Adams, B. (2016). The next generation of synthetic biology chassis: moving synthetic biology from the laboratory to the field. *ACS Synth. Biol.*, 5 (12), pp. 1328–1330. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00256.
- Admiraal S., Blaine A., Cane D., Gramajo H. y Khosla C. (2001). Biosynthesis of Complex Polyketides in a Metabolically Engineered Strain of *E. coli*. *Science*, 2 (291), 1790-1792.
- Ahmadi, M. y Pfeifer, B. (2016). Recent progress in therapeutic natural product biosynthesis using *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 42, 7-12.
- Aguilar, D., Ángeles, I., Trujillo, M. y Valdez, N. (2012). Biología sintética: diseñando sistemas biológicos con piezas genéticas. *BioTecnología*, 16 (1). Recuperado de: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2012_1/Valdez_Cruz.pdf
- Alfaro, L., Cedeño, M. y Sánchez, I. (2009). Análisis epidemiológico de la diabetes mellitus. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, LXVII (590) 331-336.
- Álvarez, J. y Remuñán, C. (2001). Coma Hiperosmolar. *Revista Cubana Médica*, 40 (3).
- American Diabetes Association. (2017). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, 40 (suplemento 1), S4-S5. Recuperado de: http://care.diabetesjournals.org/content/40/Supplement_1/S4
- Asociación Latinoamericana de Diabetes. (2013). *Sobre el diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 con medicina basada en evidencia*. Autor.
- Ardevol, E., Céspedes, Y., Figueredo, A., Pérez, M. y Reyes F. (2015). Las incretinas como nueva opción terapéutica en la diabetes mellitus tipo 2, Hospital General Docente "Dr. Guillermo Luis Fernández Hernández Baquero". *Revista Cubana de Medicina*, 54 (2): 151-166.

- Avignone-Rossa, C., González J., Jiménez J., Kim J., Salvador, M. y Saunders, E. (2016). Properties of alternative microbial hosts used in synthetic biology: towards the design of a modular chassis. *Essays Biochem*, 30, 60 (4):303-313.
- Azmi, S., Alam, U., D'Août, K., Jugdey, R., Malik, R., Rajbhandari, S. *et al.* (2017). Diabetic neuropathy and gait: a review. *Diabetes Ther*. DOI: 10.1007/s13300-017-0295-y.
- Barceló, D., Gros, M. y Petrović, M. (2007). Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the ebro river Basin (northeast Spain). *Environ Toxicol Chem.*, 26 (8), 1553-1562.
- Beldarrain, O., Díez, J., Hervás, A., De Miguel, G. y Zabaleta, A. (2006). Calidad de vida relacionada con la salud en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Anales Sis San Navarra*, 30 (1). Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272007000100005
- Bermúdez, A., Betancourt, L. y Lima-Martínez, M. (2011). Glucagón: ¿Un simple espectador o un jugador clave en la fisiopatología de la diabetes? *Avances de Diabetología*, 27 (5). DOI: 10.1016/j.avdiab.2011.09.002
- Benchling. (s.f.). *What is benchling?* Recuperado de: <https://benchling.com/faq>
- BiotechSpain. (2013). *La biología sintética y sus aplicaciones*. Recuperado de: <https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1102tecnica>
- Bjerre, L., Garibay, P., Hastrup, S., Peters, G., Reedtz-Runge, S., Rudolph, R. *et al.* (2010). Crystal Structure of Glucagón-like Peptide-1 in complex with the extracellular domain of the glucagón-like peptide-1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (1), 723-730.

- Boichuk, V., Kriskovich, J., Luján, M. y Vanina, G. (2005). La diabetes mellitus en el espectro de la enfermedad cardiovascular. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*, (144), 16-20.
- Brunton, L., Lazo, J. y Parker, K. (2007). *Goodman y Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica*, (10° ed.). Colombia: McGraw-Hill.
- Cain, J., Cordwell, S. y Solís, N. (2013). Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria. *Journal of Proteomics*, 97. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.08.012
- Carbonell, P. y Jean-Yves, T. (2015). Synthetic biology for pharmaceutical drug discovery. Francia. *Drug Design, Development and Therapy*, 9. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S58049>
- Carrillo C., y Panduro Cerda A. (2001). Genética de la diabetes mellitus tipo 2. *Investigación en Salud*, III (99), 27-34.
- Carvajal, C. (2015). Productos finales de glicación (AGEs) y la nefropatía diabética. *Medicina Legal de Costa Rica*, 32 (1).
- Chang, M., Eachus, R., Fisher, K., Ham, T., Ho, K., Keasling, T. *et al.* (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440, 940–943.
- Choffnes, E., Pray, L. y Relman, D. (2011). *The science and applications of synthetic and systems biology*. Estados Unidos: The National Academies Press.
- Chung, A., Bhatia, P. y Jain A. (2015). Synthetic biology for the development of biodrugs and designer crops and the emerging governance issues. *Curr Synthetic Sys Biol.*, (1). DOI: 10.1007/978-94-017-9514-2_16.
- Cibus 3.0.* (s.f.). Recuperado de: https://www.facebook.com/pg/cibus30/about/?ref=page_internal

- Conjuchem. (s.f.). *CJC-1134-PC*. Recuperado de: <http://www.conjuchem.com/pipeline/cjc-1134-pc>
- Connor, M. y Liao, J. (2008). Engineering of an *Escherichia coli* Strain for the Production of 3-Methyl-1-Butanol. *Appl Environ Microbiol.*, 74 (18): 5769-75.
- Clomburg, J. y González, R. (2010). Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 86 (2), 419-34.
- Cubero, C. y Rojas, L. (2017). Comportamiento de la diabetes mellitus en Costa Rica. *Horizonte Sanitario*, 16 (3). DOI: 10.19136/hs.a16n3.1871.
- Daisuke, Y., Fukushima, M. y Seino, Y. (2011). Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and β cell preservation. *J Diabetes Investig.*, 22 1 (1-2), 8–23. DOI:10.1016/j.pbiomolbio.2011.07.010
- Danchin, A. (2009). Information of the chassis and information of the program in synthetic cells. *Syst Synth Biol.*, 3 (1-4), 125–134. DOI: DOI 10.1007/s11693-009-9036-5.
- Danchin, A. (2012). Scaling up synthetic biology: Do not forget the chassis. *FEBS Lett.*, 16 (15), 2129-37. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.12.024
- Deplazes, A. y Huppenbauer, M. (2009). Synthetic organisms and living machines. *Syst Synth Biol.*, 3 (1-4), 55-63. DOI: 10.1007/s11693-009-9029-4.
- Dittel Samuda, L. (2016). “*Magenta Biolabs*”, de estudiantes del TEC, gana premio “Yo emprendedor” Centroamérica. Recuperado de: <https://www.tec.ac.cr/hoyeneltec/2016/11/10/magenta-biolabs-estudiantes-tec-gana-premio-yo-emprendedor-centroamerica>
- Donnelly, R., King, P. y Peacock, I. (2010). The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol.*, 48 (5), 643–648.

- Drucker, D. y Lovshin, J. (2009). Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.*, 5 (5), 262-9. DOI: doi:10.1038/nrendo.2009.48.
- Ellington, A. y Enyeart, P. (2011). A yeast for all reasons. *Nature*, 477, 413–414. DOI: 10.1038/477413a
- ETCgroup, (2012). *Biología sintética: 10 puntos clave para delegados*. Recuperado de: <http://www.etcgroup.org/es/content/biolog%C3%ADa-sint%C3%A9tica-10-puntos-clave>
- Feng, A., Li, W. y Peña, Y. (2017). La cardiopatía isquémica en pacientes diabéticos y no diabéticos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16 (2).
- Forster, A., Gullberg, E. y Liljeruhm, J. (2014). *Synthetic Biology: a Lab Manual*. Inglaterra: World Scientific Publishing.
- Gerngross, T. y Hamilton, S. (2017). Glycosylation engineering in yeast: the advent humanized yeast. *Curr Opin Biotechnol.*, 18 (5), 387-92. DOI: 10.1016/j.copbio.2007.09.001.
- Glieder, A., Hartner, F., y Vogl, T. (2013). New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 24 (6).
- Gupta, V. (2013). Glucagón-like peptide-1 analogues: an overview. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 17 (3), 413-421.
- Guyton, A. y Hall, J. (1998). *Tratado de fisiología médica*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hasbum-Fernández, B. (2010). Epidemiología de la diabetes en Costa Rica. *Avances en Diabetología*, 26 (2). DOI 10.1016/S1134-3230(10)62004-2
- Hernández R., Fernández C. y Baptista P (2014). *Metodología de la investigación*. México. McGraw Hill.
- iGEM. (s.f.). *Catalog*. Recuperado de: http://parts.igem.org/Catalog#Browse_parts_and_devices_by_function

iGEM. (s.f.). *Help:Parts*. Recuperado de: <http://parts.igem.org/Help:Parts>

Integrated DNA Optimization. (s.f.). *Codon optimization tool makes synthetic gene design easy*.

Recuperado de: <http://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/web-tools/decoded/2016/04/27/codon-optimization-tool-makes-synthetic-gene-design-easy>

Isley, W. y Molitch, M. (2005). Diabetes tipo 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90 (1). DOI: <https://doi.org/10.1210/jcem.90.1.9996>.

Jin, Y., Kwak, S., Tsai, C. y Turner, T. (2014). Yeast synthetic biology toolbox and applications for biofuel production. *FEMS Yeast Res.*, 15 (1), 1-15.

Jung-Mo, A. y Manandhar, B. (2014). Glucagón-like peptide-1 (GLP-1) analogs: Recent Advances, New Possibilities, and Therapeutic Implications. *Journal of medicinal Chemistry*, 58 (3), 1020-1037.

Khoo, O. y Suntrarachun, S. (2012). Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacteria expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (2). DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60213-X

Kieffer, T., McIntosh, C. y Pederson, R. (1995). Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagón-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidasa IV. *Endocrinology*, 136 (8), 3585-96.

La Berre, J. y Zunz, E. (1929). *Contributions a l'étude des variations physiologiques de la secretion interne du pancreas. Relations entre les secretions externe et interne du pancreas*.

London Imperial College. (2013). *Discovery in synthetic biology a step closer to new industrial revolution*. Recuperado:

http://www3.imperial.ac.uk/newsandeventspggrp/imperialcollege/newssummary/news_31-1-2013-12-18-1

- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, L., Leza, J. C., Moro, M. A. y Portolés, A. (2008). *Velásquez farmacología básica y clínica*, (18° ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- MarketLine. (2016). *Global Biotechnology*. Recuperado de:
<https://www.marketresearch.com/MarketLine-v3883/>
- McMurry, J. (2008). *Química orgánica*, (7° ed.). México: Cengage Learning.
- Mediavilla, J. (2001). Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. *SUMERGEN*, 27 (3).
- Murray, T. (s.f.). *La ética y la biología sintética: cuatro corrientes, tres informes*. Recuperado de:
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjrm4r76q3XAhUP62MKHdGXBiEQFggkMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.bcn.cl%2Fobtienearchivo%3Fid%3Ddocumentos%2F10221.1%2F46693%2F1%2Finforme5Eticaylabiolog%25C3%25ADasint%25C3%25A9tica.pdf&usg=AOvVaw0JMNkLdaU7Tz8z0bwuBOFK>
- Olimpo, C. (2004). *Diabetes mellitus tipo 2: Guías de práctica clínica basadas en la evidencia sobre el tamizaje, diagnóstico y tratamiento*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Palladino, M. y Thieman, W. (2010). *Introducción a la biotecnología*. España: Editorial PEARSON.
- Saladin, K. (2013). *Anatomía y fisiología: la unidad entre forma y función*, (6° ed.). México D.F.: McGraw Hill.
- Tecnológico de Costa Rica. (2016). “*Prostal*” participará en la mayor competencia de *Biología Sintética a nivel mundial*. Recuperado de:

<https://www.tec.ac.cr/hoyeneltec/2016/04/26/prostal-participara-mayor-competencia-biologia-sintetica-nivel-mundial>

Umaña Venegas, J. (2007). *Hemoalgae, la nueva 'startup', recibirá \$100.000 de aceleradora de empresas de biotecnología*. Recuperado de:

VanPutte, C., Regan, J. y Russo, A. (2017). *Seeleys Anathomy & Physiology*, (11° ed). Estados Unidos: McGraw Hill.

Vásquez, L. (2014). *Diseño de una herramienta para la asistencia en el ensamblaje sintético de la bacteria E. coli en la producción de biocombustibles*. (Tesis). Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

Versatis. (2010). *Versartis Data for Type 2 Diabetes Drug VRS-859 (exenatide-XTEN) Featured at American Diabetes Association Annual Scientific Meeting*. Recuperado de: <http://ir.versartis.com/releasedetail.cfm?releaseid=831905>

World Health Organization. (2016). *Global report on diabetes*. Francia: Autor.

Zachary, P. (2014). *Type 1 diabetes: causes, treatment and potential complications*. Nova Science Publishers.

ANEXOS

Tabla n.º 5 Secuencia de ADN y AA utilizados para la elaboración del vector de expresión

Promotor

Cadena de ADN. BBa_K076017 (Código iGEM)

GATCTGGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCCTCA
 CGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGGAGCGTCCTGATCCTTCC
 GCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAAC
 CCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGC
 ACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCG
 GCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAA
 GGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCTAGTTCCGTTCGCAGCCGGGATTTGGGTTCGC
 GGTCTTGTTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTAGCGGGCTGCTG
 GGCTGGCCGGGGCTTTCGTGGCCGCCGGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTG
 TGGAGAGACCGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGA
 ACTGGGGGTTGGGGGGAGCGCAGCAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAA
 TGGAAGACGCTTGTGAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGGC
 ATGGTGGGCGGCAAGAACCAAGGTCTTGAGGCCTTCGCTAATGCGGGAAAG

CTCTTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATCTGGGGACCCTGACGTGAAG
 TTTGTCACTGACTGGAGAACTCGGTTTGTCTGTCTGTTGCGGGGGCGGCAGTTA
 TGCGGTGCCGTTGGGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCCCTCGTCG
 TGTCGTGACGTCACCCGTTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGC
 CGGTAGGTGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGTTCGGGCCTA
 GGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGAT
 AAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTTCGGTTTTATGTACCTATCTTCTTAAGTAGC
 TGAAGCTCCGGTTTTGAACTATGCGCTCGGGGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAA
 GTTTTTTAGGCACCTTTTCAAATGTAATCATTGGGTCAATATGTAATTTTCAG
 TGTTAGACTAGTAAATTGTCCGCTAAATTCTGGCCGTTTTTGGCTTTTTTGTTA
 GACGAAG

UTR 5'

Cadena de ADN. BBa_K863200 (Código iGEM)

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACA
 TCCACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACA
 CTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACAC
 CCACTTTTGCCATCGAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGC
 TCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCT
 ATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTATTTCCGAATGCAACAAGCT
 CCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCA

AATAGTTTCATGTTCCCCAAATGGCCCAAACACTGACAGTTTAAACGCTGTCTT
 GGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTT
 CGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCA
 TACCGTTTGTCTTGTTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATT
 ATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAA
 ACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATT
 GTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGAT
 CAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAA
 GCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAAT
 TGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTAACGACTTTTAACGACAACCT
 TGAGAAGATCAAAAAACAACCTAATTATTCGAAACG

Sitio de unión del Ribosoma

Cadena de ADN. BBa_J63003

CCCGCCGCCACCATGGAG

Péptido señal

Cadena de AA. SP13

MLSTILNIFILLLLFIQASLQ

Cadena de ADN

ATGCTTAGTACGATCCTGAACATCTTCATACTGCTTCTTTTCATCCAGGCATCT

TTGCAG

GLP-1.2, cadena peptídica.

HGEGTFTSDGSSFLEGQAAKEYIAWLVKGRG

GLP-1.2, Cadena de ADN optimizada para *K. pastoris*.

CATGGTGAGGGTACGTTTACGTCTGACGGATCTTCATTCCTGGAAGGCCAGG

CTGCAAAGGAATACATCGCCTGGCTGGTCAAGGGCAGGGGC

GPC3, cadena peptídica. XP_016884902.1 (Código NCBI)

MAGTVRTACLVVAMLLSLDFPGQAQPPPPPDATCHQVRSFFQRLQPLKWVP

ETPVPGSDLQVCLPKGPTCCSRKMEEKYQLTARLNMEQLLQSASMELKFLIIQN

AAVFQEA FEIVVRHAKNYTNAMFKNNYPSLTPQAFEFVGEFFTDVSLYLGS DIN

VDDMVNELFDSLFPVIYTQLMNPGLPDSALDINECLRGARRDLKVFGNFPKLIMT

QVSKSLQVTRIFLQALNLGIEVINTTDHLKFSKDCGRMLTRMWYCSYCQGLMM

VKPCGGYCNVVMQGC MAGVVEIDKYWREYILSLEELVNGMYRIYDMENVLLG

LFSTIHDSIQYVQKNAGKLTTTIGKLC AHSQQRQYRSAYYPEDLFIDKKVLKVA

HVEHEETLSSRRRELIQKLKSFISFY SALPGYICSHSPVAENDTLCWNGQELVERY

IQKNTEEPFLPLFTTYSRDATQEKNPPGTLFPVSDLPLSQTCLSVKSDCLGGL

GPC3, Cadena de ADN optimizada para *K. pastoris*.

ATGGCTGGCACGGTCCGTACCGCTTGTCTGGTGGTCGCCATGTTGCTTTC ACTA

GATTTCCCAGGTCAGGCCCAACCCCTCCTCCTCCACCCGATGCAACCTGTCA
CCAGGTTTCGTTCTTCTTTCAAAGGCTACAGCCAGGTTTGAAGTGGGTACCCG
AAACACCAGTGCCAGGATCCGATCTGCAGGTATGCCTGCCTAAGGGCCCTACG
TGTTGTAGTAGGAAAATGGAGGAGAAATATCAACTTACTGCAAGATTAACA
TGGAGCAATTACTGCAGTCCGCTTCCATGGAATTGAAATTTCTTATCATCCAG
AACGCAGCCGTATTTACAGGAGGCATTCGAGATTGTGGTACGTCATGCTAAGAA
TTACACAAATGCCATGTTCAAGAACA ACTATCCCTCCTTGACGCCCCAAGCAT
TCGAGTTCGTGGGTGAGTTCTTTACGGACGTATCACTGTATATATTGGGATCTG
ACATTAATGTTGACGATATGGTGAACGAGTTATTCGATAGTCTATTCCCCGTC
ATTTACACCCA ACTGATGAATCCCGGACTTCCTGACTCTGCCCTTGACATTAAT
GAGTGTTTGCGTGGAGCCCGTAGAGACTTGAAAGTATTCGGCAATTTTCCCAA
GCTAATAATGACGCAAGTTAGTAAAAGTTTACAGGTA ACTAGGATATTTTTGC
AAGCTCTGAATCTGGGAATCGAAGTGATTAATACAACGGACCACCTTAAGTTC
TCCAAGGACTGTGGTCGTATGCTTACTAGAATGTGGTATTGTAGTTATTGCCA
AGGTCTTATGATGGTAAAGCCTTGCGGAGGCTACTGCAACGTCGTTATGCAGG
GTTGTATGGCTGGTGTAGTTGAAATCGATAAATACTGGAGGGAATACATCCTT
TCACTGGAAGAACTTGTCAACGGTATGTACCGTATATATGACATGGAGAATGT
GTTACTGGGCCTTTTTTCTACCATACACGATAGTATTCAGTACGTACAGAAGA
ACGCCGGTAAACTGACTACGACGATAGGAAA ACTATGCGCCCACTCTCAGCA

GAGGCAATACCGTAGTGCCTATTATCCCGAAGACCTTTTTATAGACAAAAAAG
TTCTTAAAGTGGCACATGTCGAACACGAGGAACTTTGTCTAGTCGTCGTAGG
GAATTGATACAGAAGCTAAAGTCCTTCATTTCTTTTTATTCTGCTCTGCCCCGA
TATATTTGTTCCCACTCTCCTGTTGCCGAAAATGATACTTTGTGCTGGAACGGA
CAAGAGTTGGTAGAACGTTACATCCAAAAGAATACGGAGGAACCATTTCTGC
CACTATTTACCACCTACTCCCGTGACGCCACCCAAGAAAAAAATCCCCCGGA
ACTCTTTTCCCCGTAAGTGATTTGCCATTATCACAAACCTGCCTGGAGTCCGTT
AAGTCTGACTGTCTAGGAGGACTG

UTR 3'

BBa_K863201 (Código iGEM)

CGAGTATCTATGATTGGAAGTATGGGAATGGTGATACCCGCATTCTTCAGTGT
CTTGAGGTCTCCTATCAGATTATGCCCAACTAAAGCAACCGGAGGAGGAGATT
TCATGGTAAATTTCTCTGACTTTTGGTCATCAGTAGACTCGAACTGTGAGACTA
TCTCGGTTATGACAGCAGAAATGTCCTTCTTGGAGACAGTAAATGAAGTCCCA
CCAATAAAGAAATCCTTGTTATCAGGAACAACTTCTTGTTTCGAACTTTTTTCG
GTGCCTTGAACTATAAAATGTAGAGTGGATATGTCGGGTAGGAATGGAGCGG
GCAAATGCTTACCTTCTGGACCTTCAAGAGGTATGTAGGGTTTGTAGATACTG
ATGCCAACTTCAGTGACAACGTTGCTATTTTCGTTCAAACCATTCCGAATCCAG

AGAAATCAAAGTTGTTTGTCTACTATTGATCCAAGCCAGTGCGGTCTTGAAAC
TGACAATAGTGTGCTCGTGTTTTGAGGTCATCTTTGTATGAATAAATCTAGTCT
TTGATCTAAATAATCTTGACGAGCCAGACGATAATACCAATCTAAACTCTTTA
AACGTAAAGGACAAGTATGTCTGCCTGTATTAAACCCCAAATCAGCTCGTAG
TCTGATCCTCATCAACTTGAGGGGCACTATCTTGTTTT

Terminador

Secuencia de ADN. BBa_K392003 (Código iGEM)

GCATGTGCTCTGTATGTATATAAACTCTTGTTTTCTTCTTTTCTCTAAATATTC

TTTCCTTATACATTAGGACCTTGCAGCATAAATTACTATACTTCTATTACTAG

AGCCCGCCGCCACCATGGAG

Plásmido

Secuencia de ADN. BBa_K805020 (Código iGEM)

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATC
CACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACTAGC
AGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTTCTCCTCAACACCCACTTT
TGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAAT
TCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCC
TGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGA
ACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCC
AAATGGCCCAAACACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAAAG
CGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTT
GGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATAACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATT
GACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTCTG
AACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGAT
GATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGA
TAGCCTAACGTTTCATGATCAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAATAT
ATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCT
TACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTAACGACTTTTA
ACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAACGATGAGATTTCC
TTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAA
CACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTAC
TCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAA

TAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAG
GGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTGAATTCATGAGATCCTCACATAA
GCGTAATTTGGCTGCGCTGCTTTCCATCAGCGGAGCCGCGGTGGCACAGCAGACG
GCATGGGGTCAATGCGGAGGACAAGGATGGTCCGGTGGCAGCATCATGTGTGTCAG
GCTACACTTGCTCCTACACAAATGACTGGTACTCCCAGTGCGTTCCTGGATCATCC
GGCGGCGGAGGTAGCAACCCTACAACGACCACCACGATGATCCGGACGACCACG
ACGGCTTCCTCCTCGGGCCCCACCGGCGGCGCTGGTGGTGGTAAGGTTCGATTTG
CCGGTGTCAACATCGCCGGCTTTGATTTCCGGAGTGGTGTATCAGCGGCACTCAAGA
CATGACCCAAATTGTGGACGAGTCCGTTCGATGGTGTCAATCAGATGCGACACTTT
GTCAACGACGACGGCTTCAACATCTTCCGCCTCCCGTCAGGCTGGCAGTTCCTGG
TGAACAACAACCTCGGTGGCTCACTGGACTCGAACAATTCGCCAAGTACGACA
AGCTGGTTCAAGGATGTCTGTCCCTGGGAGCATACTGTATCGTCGATGTCCACAAT
TACGCTCGCTGGAACGGCGGCGTCATCGGACAAGGCGGTCCCACCGACGACCAG
TTCACCAGTCTCTGGACTCAACTGGCCACTCACTACAAGAGTGAAAGCAAGATCA
TCTTTGGTGTGATGAACGAGCCACACGACCTGGACATCAACCGATGGGCCACCAC
CGTGCAAAAGGCCGTGACGGCGATCCGCAAGGCCGGCGCCACTTCCCAAATGAT
CCTTCTTCCAGGTACCGACTTCACCAGTGC GGCCA ACTTTGTGAGAATGGCTCC
GGTGCCGCGCTCTCGGCCGTACCAACCTGGACGGATCCACCACCAACCTGATCT
TCGACGTGCACAAGTATCTCGACTCCGATAACAGCGGCACCCACGCCGAGTGCCT
GACCAACAACGCCGACGCTTTCAACAGCCTGGCCCAATGGCTCCGCACCAACAA
GCGTCAAGCCATGCTCACCGAGACCGGTGGTGGTAACGTCCAGAGCTGCGGAAC
ATACATGTGCCAGCAACTGGATGTGCTCAACCAAACTCTGACGTTTACCTTGAT
GGACCTCGTGGAGCGCTGGAGGTTTCCAGGTTTCTGGA ACTATGTGCTGGGTGA

GGTCCCAACCAACAACGTTGATACCTACCTGGTCAAGCAATGCTTTGTTCCCAAG
TGGAAGAACCTGCAGCTTCTAGTACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATA
GCGCCGTCGACCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTT
CCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAA
GAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTT
TTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTTGTCATTTTGTTTCTTCTCGTACGAG
CTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTTGGTAGGGGTTTGG
GAAAATCATTCGAGTTTGATGTTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACA
GAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACACACCATAGCTTCAAA
ATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTA
CCTTCAAAAACACCCAAGCACAGCATACTAAATTTCCCTCTTCTTCTCCTCTAGG
GTGTCGTTAATTACCCGTACTAAAGGTTTGGAAAAGAAAAAGAGACCGCCTCGT
TTCTTTTTCTTCGTCGAAAAAGGCAATAAAAATTTTTATCACGTTTCTTTTTCTTGA
AATTTTTTTTTTAGTTTTTTCTCTTTCAGTGACCTCCATTGATATTTAAGTTAATA
AACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTTCTATTACAACCTTTTT
TACTTCTTGTTTCATTAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGGTGTTG
ACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACT
AAACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGGACGTCG
CCGGAGCGGTTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGG
AGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGG
TCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCC
TGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACTTCCGGGACG
CCTCCGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTTCG

CCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACT
GACACGTCCGACGGCGGCCACGGGTCCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCCTTTT
CCTTTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCA
CATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTAT
TTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTT
TTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGA
AGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGAGACCAACATGTGAGC
AAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGG
TGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTC
CCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGT
GTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGAC
CGCTGCGCCTTATCCGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT
ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAG
TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGC
AGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC
GGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGA
TC

