

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**EVALUACIÓN DEL ÍNDICE GLUCÉMICO EN RATAS TRATADAS
CON ISOMALTULOSA DE ORIGEN RECOMBINANTE**

POR:

Q.B.P. JESÚS NOÉ ARANDA DE LA ROSA

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO.

MAYO 2023



CARTA DE LIBERACIÓN DEL COMITÉ DE TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Asunto: **Liberación Tesis**

Chihuahua, Chih., 19 de abril del 2023

M.A.P. TERESA VIRIDIANA ESPINOZA MOLINA
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
PRESENTE. –

Los que suscriben, informamos a usted que se llevó a cabo la revisión de la tesis titulada: **“Evaluación del índice glicémico de ratones tratados con Isomaltulosa recombinante,”** presentada por el estudiante **Jesús Noé Aranda de la Rosa**, con número de matrícula **282351**, alumno del programa de **Maestría en Ciencias en Biotecnología**.

Se le fueron indicadas al estudiante las correcciones que eran necesarias efectuar, y después de realizarse lo anterior y verificar que las mismas fueron atendidas, manifestamos que el documento en cuestión, cumple con los requisitos de calidad y originalidad señalados por el Comité de Tesis y por la Facultad de Ciencias Químicas, por lo que autorizamos que sea impresa para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

ATENTAMENTE

“Luchar para lograr, lograr para dar”



Dr. Quintín Rascón Cruz
Director



Dra. María Lourdes Ballinas Casarrubias
Asesora



M.C. Tania Siqueiros Cendón
Asesora



Dr. Edward Alexander Espinoza Sánchez
Asesor



Dr. Miguel Ángel Flores Villalobos
Asesor



FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS
SECRETARIA
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario,
Campus Universitario 2
Chihuahua, Chih., México C.P 31125
Teléfonos: +52 (614) 236.6000
www.fcq.uach.mx

+uach



I. ÍNDICE

1.1 ÍNDICE DE TABLAS	IV
1.2 ÍNDICE DE FIGURAS	V
1.3 ÍNDICE DE ANEXOS	VI
1.4 LISTA DE ABREVIATURAS	VII
II. RESUMEN	1
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. ANTECEDENTES.....	5
4.1 Isomaltulosa	5
4.2 Sacarosa isomerasa.....	7
4.3 Expresión de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i>	10
4.4 Uso de modelos en animales en experimentos	12
4.5 Experimentación en modelos murinos	14
4.5 Índice glucémico.....	18
4.6 Antecedente particular	19
V. JUSTIFICACIÓN	22
VI. HIPÓTESIS	23
VII. OBJETIVOS	24
7.1 Objetivo General.....	24
7.2 Objetivos Particulares	24
VIII. MATERIALES	25
8.1 Material biológico	25
8.2 Material y equipo de laboratorio.....	25
8.3 Reactivos y sustancias.....	26
IX. MÉTODOS	27
9.1 Estrategia para el cultivo de <i>Pichia pastoris</i> SMD 1163 transformada con el vector pSINX5-L202E y la expresión de sacarosa isomerasa palINX5-L202E.....	27
9.2 Identificación de la enzima sacarosa isomerasa a través de un gel de poliacrilamida por la técnica de SDS-PAGE.....	27
9.3 Cinética de producción de isomaltulosa - trehalulosa.....	28
9.4 Determinación de la pureza de la isomaltulosa recombinante por HPLC (Cromatografía líquida de alto rendimiento)	29



9.5 Animales y alojamiento	29
9.6. Estudio del índice glucémico	29
X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
10.1 Estrategia para el cultivo de <i>Pichia pastoris</i> SMD 1163 transformada con el vector pSINX5-L202E y la expresión de sacarosa isomerasa palINX5-L202E.....	31
10.2 Identificación de la enzima sacarosa isomerasa a través de un gel de poliacrilamida por la técnica de SDS-PAGE.....	32
10.3 Determinación de la pureza de la isomaltulosa recombinante por HPLC (Cromatografía líquida de alto rendimiento)	33
10.4 Animales y alojamiento	37
10.5 Estudio del índice glucémico	37
10.6 Glucosa en sangre	37
XI. CONCLUSIONES	40
XII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	41
XIII. REFERENCIAS.....	42
XIV. ANEXOS	50



1.1 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Información de las estructuras cristalograficas de la isoformas representativas de Sacarosa Isomaerasa	23
Tabla II. Reglas generales para la selección del modelo animal.....	29
Tabla III. Características fisiologicas generales y reproductivas de las ratas Wistar	32
Tabla IV. Preparación de gel de poliacrilamida al 12% para realizar la técnica SDS-PAGE	41
Tabla V. Tiempos de retención y concentración de los productos de la reacción llevada a cabo con la enzima SINX5-L202E	49
Tabla VI. Características físicas de las ratas en estudio	50
Tabla VII. Comparación de las variaciones de la glucosa en sangre entre tratamientos en el intervalo de los primeros 60 min.....	51
Tabla VIII. Comparación de las variaciones de la glucosa en sangre entre tratamientos en el intervalo de los 60 a los 120 min.....	52
Tabla IX. Comparación de las variaciones de la glucosa en sangre entre tratamientos en el intervalo de los 120 a los 180 min	52
Tabla X. Comparación de las variaciones de la glucosa en sangre entre tratamientos en el intervalo de los 180 a los 240 min	52



1.2 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de hidrólisis e isomerización de la sacarosa en la reacción catalizada por la sacarosa isomerasa	7
Figura 2. Correlación del peso corporal con diferentes fases de los días posteriores al alumbramiento.....	16
Figura 3. Plásmido pSINX5-L202E (5293 bp).....	21
Figura 4. Cinética de crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> SMD 1163 transformada con el vector pSINX5-L202E en medio YPD a 30°C y 250 rpm	32
Figura 5. Perfil de proteína inducida en <i>Pichia pastoris</i> SMD 1163.....	33
Figura 6. Cromatograma de la comparación de los estándares de Glucosa, Sacarosa, Isomaltulosa y Trehalulosa.....	34
Figura 7. Curva de calibración del estándar de la isomaltulosa.....	34
Figura 8. Curva de calibración del estándar de la sacarosa	35
Figura 9. Curva de calibración del estándar de la glucosa.....	35
Figura 10. Curva de calibración del estándar de la trehalulosa.....	35
Figura 11. Cromatograma de los productos de la reacción para la producción de isomaltulosa-trehalulosa con la enzima SINX5-L202E	36
Figura 12. Evaluación temporal de la glucosa en sangre.	38



1.3 ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones	64
Anexo 2. Oficio de aprobación para el protocolo con uso de animales en la investigación científica	65



1.4 LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AOX1	Alcohol oxidasa 1
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asp	Ácido aspártico
BMMY	Medio mínimo amortiguado con metanol suplementado con peptona y extracto levadura
bp	Pares de bases
C1	Carbono 1
Ca ²⁺	Calcio
CICUAL	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
cm	Centímetros
DE	Desviación estándar
dL	Decilitros
DNA	Ácido 3,5 – dinitrosalicílico
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
DOF	Diario Oficial de la Federación
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua
FDA	Food Drug Administration
g	Gramos
GH13	Familia de glucósido hidrolasa 13
Glu	Ácido glutámico
GRAS	Generally Regarded As Safe
h	Horas
His	Histidina
HPLC	Cromatografía Líquida de alto rendimiento
ISO	International Organization for Standardization
kDa	Kilodalton
Ks	Constante de saturación de Monod
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar



mg	Miligramos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mut-	No utilización de metanol
Mut+	Utilización de metanol máxima
Mut ^s	Utilización de metanol lenta
n	Número de observaciones
ng	Nanogramos
Ni ²⁺	Níquel
NOM	Norma Oficial Mexicana
OECD	Organización para la cooperación y desarrollo económicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OPS	Organización Panamericana de la Salud
<i>P</i>	Probabilidad
PAOX1	Promotor alcohol oxidasa 1
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial de hidrógeno
pmol	Picomoles
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por min
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UACH	Universidad Autónoma de Chihuahua
v/v	Porcentaje volumen a volumen
YPD	Medio de extracto de levadura de peptona y dextrosa
α	Significancia estadística
μ g	Microgramos
μ L	Microlitros



II. RESUMEN

La isomaltulosa es un ejemplo reciente de un carbohidrato alternativo. Tiene un bajo dulzor, no produce caries y es bajo en calorías, por lo que se recomienda en caso de diabetes y sobrepeso. Debido a que este azúcar se encuentra escasamente en la naturaleza, producimos la enzima recombinante para convertir la sacarosa en isomaltulosa y comparamos los efectos de la isomaltulosa y la sacarosa en el metabolismo de la glucosa en ratas. La conversión de sacarosa a isomaltulosa se llevó a cabo y se midió por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). Este producto se suministró a ratas adultas en una única administración por vía orogástrica. Cada 60 min se midió la glucosa plasmática con la finalidad de conocer el comportamiento del alimento en el metabolismo de la glucosa del animal. Por otro lado, para determinar el índice glucémico del producto de la reacción, cada 15 min se midió la glucosa plasmática durante la primera hora y se realizó una última determinación de glucosa a los 120 min en ratas dosificadas con isomaltulosa y glucosa. La conversión de sacarosa a isomaltulosa aparentemente fue completa según el análisis de los cromatogramas. El principal hallazgo fue que las concentraciones de glucosa en plasma aumentaron significativamente después de la administración de sacarosa en comparación a la isomaltulosa obtenida de forma recombinante con valores cercanos al 20% menos en ambos casos, asimismo el suministro de glucosa se mantuvo de manera más prolongada cuando se comparó al azúcar isomerizado con su contraparte estructural. En este modelo, la isomaltulosa presenta niveles elevados de índice glucémico condición que puede dificultar el control de la glucosa en sangre, sin embargo, este tipo de pruebas en humanos son necesarias para determinar si la sustitución de la sacarosa por isomaltulosa u otros carbohidratos dulces podría ser terapéuticamente útil en pacientes con resistencia a la insulina o diabetes mellitus tipo 2. La isomaltulosa obtenida por vía recombinante tiene efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa posprandial en comparación con la alimentación con sacarosa en ratas, mostrando un comportamiento similar al de su análogo comercial, logrando en ambos casos prolongar la curva glucémica.



ABSTRACT

Isomaltulose is a recent example of an alternative carbohydrate. It has a low sweetness, does not produce caries, and is low in calories, which is recommended for diabetes and overweight. Because this sugar is poorly found in nature, we produce the recombinant enzyme to convert sucrose to isomaltulose. We compared the effects of isomaltulose and sucrose on glucose metabolism in rats. The conversion of sucrose to isomaltulose was measured by HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). This product was provided to adult rats in only administration by orogastric via. Every 60 minutes, the plasma glucose was measured to know the food behavior in the animal glucose metabolism.

On the other hand, to determine the glycemic index, every 15 min, the plasma glucose was measured during the first h and the last glucose determination at 120 min in rats with isomaltulose and glucose dosed. The conversion from sucrose to isomaltulose was complete according to chromatogram analysis. The main finding was that plasma glucose concentrations were significantly increased after sucrose administration compared to isomaltulose obtained recombinant with relative values of 20% below both cases, likewise, the glucose supply was kept constant when compared to the isomerized sugar with its structural counterpart. In this model, the isomaltulose presents high levels of the glycemic index. Isomaltulose obtained recombinant way has beneficial effects on postprandial glucose metabolism compared to sucrose feeding in rats. The glycemic index shown by the isomaltulose is high, according to reports. Nevertheless, these proofs in humans are necessary to determine whether substituting isomaltulose for sucrose or other sweet carbohydrates might be therapeutically helpful in patients with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. The isomaltulose obtained by the recombinant way has beneficial effects on glucose metabolism compared to the sucrose feeding in rats showing similar behavior, extending the glycemic curve in both cases.



III. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con datos publicados por la Organización Mundial de la Salud, más del 50% de las personas adultas en las naciones miembro padecen de obesidad y sobrepeso (World Health Organization, 2021).

Algunas de estas demografías cuentan con valores cercanos al 70% dentro de las cuales se encuentra la población mexicana, que, a nivel nacional, en 2021, el porcentaje de adultos de 20 años y más con sobrepeso y obesidad fue del 72.4%, por lo que se encuentra entre los primeros lugares (Shama-Levy *et al.*, 2022).

Esta condición también tiene una afectación a nivel económico, se estima que el sobrepeso representa el 8.9% del gasto en salud; y esta condición reduce la producción del mercado de trabajo en una cantidad equivalente a 2.4 millones de trabajadores de tiempo completo por año reduciendo el PIB en México en un 5.3% (OECD, 2019).

México es el mayor consumidor de productos ultraprocesados en América Latina y el cuarto a nivel mundial (OPS/OMS, 2015). En estos alimentos No Recomendables resalta el consumo, independientemente del grupo de edad, los de alto contenido de carbohidratos como las bebidas no-lácteas endulzadas; botanas, dulces y postres; cereales dulces y las bebidas lácteas endulzadas (Secretaría de Salud, 2019). En el año 2020 la Secretaría de Salud implementó el etiquetado de alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados donde se advierte al consumidor de los nutrimentos e ingredientes que representan una amenaza para la salud donde se incluyen a los azúcares (DOF, 2020).

El conocimiento de las características de los grupos de alimentos, conteo de hidratos de carbono en el plan de alimentación y manejo de alimentos sustitutos de alto índice glicémico por los de bajo índice permite un control adecuado de la glucemia (Evert *et al.*, 2014; Riccardi *et al.*, 2008).

Los alimentos con un alto índice glucémico promueven la oxidación postprandial de carbohidratos a expensas de la oxidación de grasas, por lo que se altera la división de combustible de forma que esto puede promover a la ganancia de grasa. Por otra parte alimentos con una baja respuesta glucémica, es decir un bajo índice glucémico, pueden facilitar el control de la masa corporal promoviendo la saciedad, minimizando la secreción postprandial de insulina y manteniendo la sensibilidad a la insulina (Livesey *et al.*, 2019).

La isomaltulosa, conocida comercialmente como Palatinose™, es un tipo de un carbohidrato de lenta digestión, pero completamente asimilable con un bajo índice glucémico. Cuenta con características únicas en el espectro de azúcares alternativos a la sacarosa como el hecho que no escapa a la digestión en el intestino delgado y por lo tanto se encuentra completamente disponible además que la liberación de glucosa es de manera sostenida (Maresch *et al.*, 2017).

Es posible encontrar trazas de isomaltulosa en la miel y en la caña de azúcar y su síntesis mediante química convencional es compleja por lo actualmente se produce comercialmente usando la enzima sacarosa isomerasa expresada de forma recombinante en diversos microorganismos. Esta proteína emplea como sustrato a la sacarosa y convierte la mayor parte de esta en isomaltulosa y en proporciones menores trehalulosa, glucosa y fructosa (Liu *et al.*, 2021).

Derivado de las características citadas, Castillo (2017) realizó la transformación exitosa del sistema de expresión *P. pastoris* SMD 1163 con el vector que contiene el gen que codifica para la enzima sacarosa isomerasa. Sardiña (2019) optimizó las condiciones para la expresión de la enzima sacarosa isomerasa recombinante en *Pichia pastoris* SMD 1163.

La realización de estudios preclínicos *in vivo* abre las puertas a la posibilidad futura de probar los beneficios de nuevos productos en humanos. Los mecanismos homeostáticos de la glucosa se encuentran bien conservados entre especies por lo que queda mucho por dilucidar a través de la gran variedad de modelos animales disponibles en la actualidad (Aileen, 2020). El modelo de rata Wistar (*Rattus norvegicus*) tiene la virtud de tener una gran similitud con el ser humano además de tener ventajas relevantes como su tamaño, vida corta, facilidad de manipulación y alta tasa de reproducción.

Tomando en cuenta los aspectos anteriormente señalados, en el presente trabajo se busca obtener el mayor porcentaje de conversión de sacarosa a isomaltulosa utilizando a la enzima sacarosa isomerasa obtenida de forma recombinante para después probar el producto en ratas Wistar con la intención de analizar los efectos benéficos reportados de este edulcorante en el metabolismo de la glucosa.

IV. ANTECEDENTES

4.1 Isomaltulosa

La isomaltulosa es un ejemplo reciente de un ingrediente carbohidrato alternativo. Cuenta con una marcada aplicación comercial como prospecto en la industria de alimentos porque cuenta con una buena estabilidad ácida, muy baja higroscopicidad y alta seguridad (Shyam *et al.*, 2018; Walter & Marhöfer, 2016). Como edulcorante alternativo tiene baja dulzura (aproximadamente el 50% de dulzor en relación con la sacarosa), no produce caries, es bajo en calorías, lo cual es recomendable para la diabetes y la obesidad (de Groot *et al.*, 2020; Rubio-Arrea *et al.*, 2017). También es un tipo de azúcar reductor, el cual puede ser usado como precursor en la producción de nuevos azúcares (Lina *et al.*, 2002)

La isomaltulosa ha sido aprobada como un sustituto seguro de la sacarosa y ha atraído la atención de un amplio sector del mundo, con una tasa de crecimiento de más del 10%. Ha sido utilizada como sustituto alternativo y aprobado como alimento para específicos usos en el sector salud debido a sus propiedades dentales en Japón desde 1985. En los Estados Unidos, la isomaltulosa está aprobada como “Compuesto considerado Generalmente Como Seguro” (GRAS, por sus siglas en inglés, Generally Regarded As Safe), por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, Food and Drug Administration) (GRN No. 184) y es usado en un amplio rango de suplementos dietarios y alimentos. En el continente europeo, fue autorizado por la Comisión de Comunidades Europeas como un nuevo alimento o ingrediente alimenticio (Notificado bajo el documento número C (2005) 2776). En México, se encuentra aprobada en el Acuerdo que determina los aditivos y coadyuvantes que pueden ser utilizados en los productos y sus disposiciones sanitarias publicadas en el Diario Oficial de la Federación del 16 de julio del 2021.

En este sentido, cumple en gran medida con los requisitos de un edulcorante saludable de bajo índice glucémico (Grenby, 1997) debido a que se escinde completamente en el intestino delgado, de manera que el proceso es menos rápido en comparación con la sacarosa.

Por lo tanto, provoca una respuesta atenuada de la glucosa en sangre y la insulina, una propiedad que puede ser particularmente favorable para los diabéticos (Grembecka, 2015; Kawai *et al.*, 1985).



El conjunto de propiedades señaladas con anterioridades hace a la isomaltulosa única dentro del espectro de edulcorantes alternativos comercializados en la actualidad.

La isomaltulosa es un disacárido reductor. Su nombre sistemático es 6-O- α -d-gluco-piranosil-d-fructofuranosa. Es un constituyente natural de la miel (Siddiqui & Furgala, 1967), se presenta en niveles de hasta el 1% y también se ha encontrado en el extracto de caña de azúcar (Takazoe, 1985), sin embargo, son cantidades demasiado pequeñas para ser extraídas. Por otro lado, su síntesis a través de la química convencional es complicada. Es por ello, que para la isomerización de la sacarosa a isomaltulosa se ha proyectado como una reacción enzimática comercialmente atractiva la catalizada por la sacarosa isomerasa.

4.2 Sacarosa isomerasa

Protaminobacter rubrum productora sacarosa isomerasa, fue la primera en estudiarse y aislarse durante los años 50. En décadas más recientes, muchas enzimas microbianas se han logrado aislar y caracterizar (Mu *et al.*, 2014), incluidas las formas nativas de enzimas como *Erwinia rhapontici* NX-5 (Ren, 2011), *Erwinia sp.* (Kawaguti, 2012), *Serratia plymuthica* ATCC15928 (Véronese, 199), y la forma recombinante de las enzimas de: *E. rhapontici* DSM 4484 (GenBank: AAK28735.1) (Börnke, 2001), *E. rhapontici* NX-5 (ADJ56407.2) (Ren, 2011), *Enterobacter sp.* FMB-1 (ACF42098.1) (Cha, 2009) y *Pantoea dispersa* UQ68J (AAP57083.1), de las cuales la isomaltulosa catalizada alcanza una cantidad del 60 al 90% de todos los productos.

La sacarosa isomerasa, también conocida como isomaltulosa sintasa, cataliza la reordenación enzimática del enlace α -1,2 entre la glucosa y la fructosa, a un enlace α -1,6 (que produce isomaltulosa) o un enlace α -1,4 (que produce trehalulosa). Además, la enzima hidroliza la sacarosa para producir glucosa y fructosa como productos finales, no obstante la isomaltulosa es el producto principal (Mu *et al.*, 2012) (Figura 1).

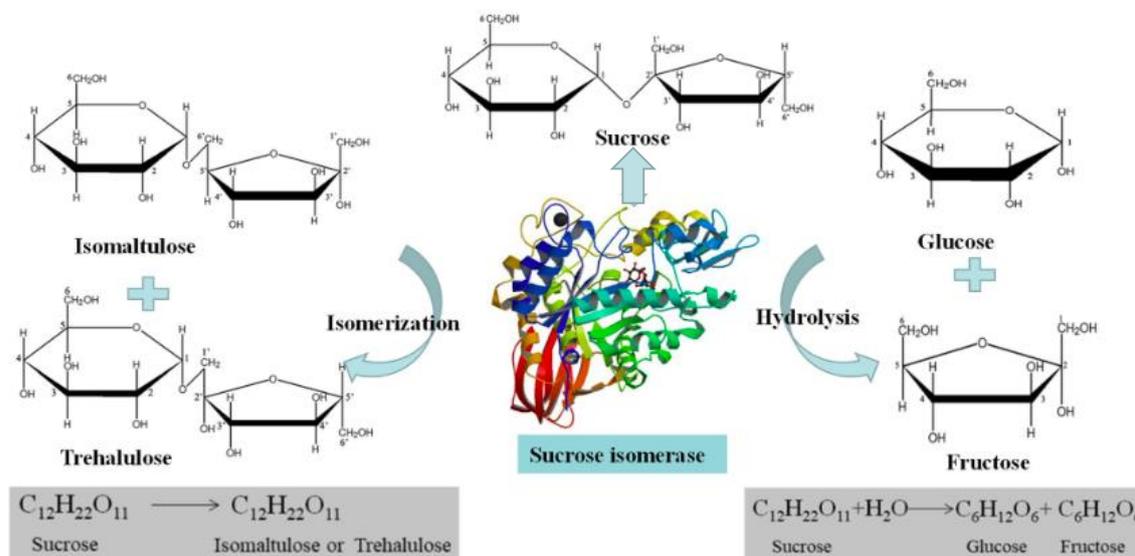


Figura 1. Reacción de hidrolisis e isomerización de la sacarosa en la reacción catalizada por la sacarosa isomerasa (Liu *et al.*, 2021)

En el Protein Data Bank (PDB), la estructura cristalográfica de la sacarosa isomerasa se encuentra resuelta proveniente de varias fuentes mediante la técnica

de difracción de rayos X, donde destacan las formas nativas de *Klebsiella sp.* LX3, *P. mesoacidophila* MX-45, *P. rubrum* CBS574.77 y *E. rhapontici* NX-5 (Tabla I).

Tabla I. Información de las estructuras cristalografía de la isoformas representativas de Sacarosa Isomerasa

Origen microbiano	Sacarosa isomerasa	PBD ID	Interacción química	Resolución (Å)	Referencias
<i>Klebsiella sp.</i> LX3	Pall	1M53	-	2.2	(Zhang <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. mesoacidophila</i> MX-45	MutB	1ZJA	Ca ²⁺ y Tris	1.6	(Ravaud <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. rubrum</i> CBS574.77	SmuA	3GBD	Etilenglicol y citrato anionico	1.95	(Ravaud <i>et al.</i> , 2007)
<i>E. rhapontici</i>	NX-5	4HOW	Citrato trisodico, acetato de amonio y polietilenglicol	1.70	(Xu <i>et al.</i> , 2013)

Esta enzima consiste en una molécula de una sola subunidad, la cual pertenece a la familia de las glucosidasas 13 (GH13). De manera parecida a las enzimas de esta superfamilia su estructura terciaria, independientemente del origen de esta, es altamente homologa y está compuesta de tres dominios: el N-terminal, C-terminal y un subdominio. El dominio N-terminal es una estructura supersecundaria de 8 barriles (α/β) los cuales conforman la parte más importante de la enzima al tratarse del centro catalítico enzimático (Figura 2). Estudios de la secuencia multiaminocídica de varias isoformas han revelado que el dominio N-terminal contiene 5 aminoácidos altamente conservados los cuales se localizan en el centro catalítico: Asp²⁴¹, Glu²⁹⁵, Asp³⁶⁹, His¹⁴⁵ e His³⁶⁸. El subdominio es una estructura rica en bucle corto, que participa en la unión del sustrato (sacarosa) (Ravaud *et al.*, 2007). El dominio C-terminal consta de dos β -plegadas antiparalelas los cuales participan en la estabilidad estructural (Duan *et al.*, 2016). Al contrario de la familia de enzimas GH13, la sacarosa isomerasa cuenta exclusivamente con una secuencia RLDRD con cinco aminoácidos (Arg, Leu, Asp, Arg y Asp) próximos del sitio activo, la cual juega un rol significativo en la isomerización de la sacarosa porque puede afectar finalmente la especificidad y la proporción de los productos (Mu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2002, 2003).

El mecanismo de la reacción esta basado en el reordenamiento intramolecular de la sacarosa que simultáneamente produce dos diferentes productos de la



isomerización, isomaltulosa y trehalulosa (Ravaud *et al.*, 2009). Después de la ruptura del enlace glucosídico (α_1/β_1) de la sacarosa, el resto de la glucosa permanece unida fuertemente al sitio activo de la enzima mientras que el grupo fructosilo queda unido debilmente. Esto permite que el resto de la molécula de fructosa gire y cambie su posición libremente por lo que se logran formar dos isómeros diferentes de la sacarosa por reordenamiento intramolecular.

De acuerdo con estudios del sitio catalítico de la sacarosa isomerasa (Ravaud *et al.*, 2007), se especula que la enzima actúa usando un mecanismo de doble desplazamiento de dos pasos. En este proceso la formación y degradación de un intermediario covalente glucosil-enzima fue completado a través del estado de transición de iones carboxilo de Glu al sitio activo de la enzima. Para completar la hidrólisis de la sacarosa, Glu actúa como un catalizador ácido, protonando al oxígeno en el enlace glucósido del sustrato proporcionando un protón. Luego, el Asp del sitio activo ataca a los átomos de hidrógeno C1 por ataque nucleofílico, desprotonando a los átomos de hidrógeno C1 y dando como resultado la formación del intermediario enzimático β -glucosil. El tautomerismo del grupo fructosilo libre da pie a la formación del isómero de sacarosa (isomaltulosa o trehalulosa) (Zheng *et al.*, 2019).

4.3 Expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

Pichia pastoris representa al sistema biológico de producción de proteínas heterólogas más popular por su costo y sistema de expresión (Karbalaei *et al.*, 2020a). Los beneficios de aprovechar este sistema incluye el plegamiento apropiado (en retículo endoplasmático) y la secreción de proteínas recombinantes al medio externo del ambiente de la célula (Yang *et al.*, 2013).

Esta levadura fue asilada en un principio de exhudados de un castaño en Francia y nombrada por Guilliermond como *Zygosaccharomyces pastoris* (Zahrl *et al.*, 2017). Esta probado que *P. pastoris*, como una levadura metilotrófica que puede utilizar metanol como única fuente de carbono y energía (Ilgen *et al.*, 2005).

Una de sus características resulta ser la existencia de un promotor fuerte y estrechamente regulado para el gen alcohol oxidasa 1 (AOX1) (Cregg *et al.*, 2000). Dentro de las moléculas que reprimen al promotor del gen de la alcohol oxidasa 1 (PAOX1) se encuentran: la glucosa, el glicerol y el etanol. Al eliminar el gen AOX1, el crecimiento en el medio con metanol se ve reducido de manera drástica, este fenotipo se conoce como de utilización lenta de metanol (Mut^s). El fenotipo de uso máximo de metanol (Mut⁺) requiere altas tasas de alimentación de esta molécula en fermentaciones a gran escala. Otro fenotipo es el Mut⁻ que no tiene la capacidad para crecer en metanol en virtud que esta cepa presenta deleciones en los genes gen alcohol oxidasa 1 y gen alcohol oxidasa 2 (AOX2).

Es importante considerar una estrategia adecuada durante el cultivo en un biorreactor con *Pichia pastoris*, en el sentido de la obtención de niveles altos en la producción de la proteína heteróloga, entonces se deben tomar en cuenta diversos factores que inciden directamente en el metabolismo de la célula así como en la producción de las proteínas heterólogas (Li, 2007). Una estrategia de cultivo para este microorganismo consiste en tres etapas (Çelik *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2008; Li, 2007; Mu *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2008; Nosedá *et al.*, 2013). La primera de ellas consiste en un cultivo batch (discontinuo) utilizando una fuente de carbono y energía no fermentable pero capaz de reprimir el PAOX1, como puede ser el glicerol, lo que da como resultado la acumulación de biomasa. La segunda etapa se desarrolla en forma de cultivo con incremento (fed – batch), en este caso, el glicerol es alimentado al final de la etapa de crecimiento exponencial aumentando aún más la concentración celular. En la tercera etapa, nombrada fase de inducción,



se inicia añadiendo metanol al cultivo de forma lenta, lo que facilita la aclimatación del cultivo al metanol iniciando la síntesis de la proteína recombinante. Se ajusta la velocidad de adición de metanol hasta que se alcanza la tasa de crecimiento deseada (Cereginho *et al.*, 2002).

Otros factores de suma relevancia son el pH y la temperatura, la importancia de estos factores radica en el tipo de cepa y/o la proteína recombinante expresada (Sinha *et al.*, 2003). El pH que se utiliza con mayor frecuencia es el rango de 3 a 7 (Hohenblum *et al.*, 2004). Así mismo el pH más utilizado se fija alrededor de 5.5 con la intención de reducir los efectos de la proteasa presentes en el medio (Kobayashi, 2000).

La temperatura óptima para el crecimiento es de 30 °C. A los 32 °C la expresión de proteínas se detiene y el crecimiento disminuye drásticamente. Algunas referencias señalan que trabajar a bajas temperaturas mejora significativamente la producción de proteínas heterólogas secretadas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

4.4 Uso de modelos en animales en experimentos

Un modelo es un objeto de imitación, más o menos fiel o semejante a otro, una persona o cosa que es similar en imagen de otra. Por lo que se puede describir a un modelo animal como un “objeto animado de imitación”, una “imagen del hombre” o de cualquier otra especie con el fin de investigar circunstancias fisiológicas o patológicas diversas (Festing, 2004; Rand, 2008). De esta misma manera un organismo modelo es una especie animal que se estudia exhaustivamente en el laboratorio para poder entender un fenómeno biológico de forma puntual con el fin de que los descubrimientos en la especie ayuden a explicar cómo funciona el mismo proceso pero en otro organismo (Festing, 2004).

El Comité Nacional de Investigación de Modelos Animales para Investigación de Estados Unidos en Anging otorga la definición de “modelo animal de laboratorio” como “un modelo animal en el que la normalidad biológica y de conducta puede ser analizada, o en la cual se puede examinar el desarrollo de patologías espontáneas o inducidas y en los cuales el fenómeno en uno o más características se parecen al humano o a otros animales” (Navarro-Hernández *et al.*, 2012)

A simple vista los seres humanos y los animales podrían parecer desemejantes, sin embargo, a nivel de detalles fisiológicos y anatómicos son notablemente similares. Todos los animales, tienen los mismos órganos (cerebro, pulmones, corazón, etc.) y sistemas (respiratorio, cardiovascular, nervioso, etc.). Estos realizan las mismas funciones en la misma orientación que el humano. De ahí que cerca del 90% de los medicamentos para uso veterinario sean iguales o muy similares para el tratamiento de pacientes humanos.

A Erasistrato, en Alejandría en el siglo tercero a.C., se le atribuye el primer registro del uso de experimentación en animales vivos con un estudio de humores corporales. A principios del siglo IXX, la experimentación en animales emergió como un método destacado en la ciencia; lo cual significó el surgimiento de la fisiología y las neurociencias experimentales de la misma forma en la que se conocen en la actualidad (Loew, 1982). Hoy en día se reconocen las grandes contribuciones de los experimentos con animales del pasado, para mejor comprensión de las enfermedades y los tratamientos que existen. De dichas contribuciones se destacable el impacto de la investigación realizada con animales en enfermedades como la poliomielitis, trasplante de órganos y la enfermedad de



Parkinson, donde fueron inicialmente probadas y perfeccionadas técnicas y métodos de tratamiento. Casi en su totalidad las formas convencionales de tratamientos médicos (fármacos, tratamientos quirúrgicos y vacunas) se desarrollan con la ayuda de los animales involucrados en la investigación, aunado a que no es ético e ilegal experimentar con humanos y que los modelos informáticos, los cultivos celulares y las sustancias artificiales no tienen la capacidad de simular al tejido, músculo, sangre, huesos y órganos operando en conjunto del sistema vivo (Lemon & Dunnet, 2005; Pound et al., 2004).

Es indispensable que los investigadores usuarios de animales, tengan conocimiento de los fundamentos éticos que involucran a la investigación y el manejo estos. Este conocimiento además permitirá llevar al cumplimiento adecuado de los objetivos planteados. El uso de animales vivos no es un derecho sino un privilegio, con el cual se obtienen todos los beneficios previamente mencionados en cuanto a la generación de conocimiento que estas técnicas representan (Navarro-Hernández *et al.*, 2012).

En México se consideran las acciones enfocadas al cuidado, manejo y utilización de animales con fines de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza con el propósito de cuidar y evitar graves daños en el bienestar de ellos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Secretaría de Agricultura, 1999).

4.5 Experimentación en modelos murinos

Los modelos mamíferos tienen un uso extenso en virtud de su similitud con el ser humano. Modelos murinos como las ratas, ratones, cobayos, hámsteres son los preferidos por su tamaño, vida corta, facilidad de manejo y alta tasa de reproducción. Proveen de los principales modelos para el estudio de los procesos metabólicos en el humano. Es imposible dar reglas específicas para la selección del modelo animal, debido a la amplia gama de consideraciones que deben tomarse en cuenta al efectuar la selección en sentido de cada la dirección de cada proyecto y sus objetivos sin embargo en la Tabla II en enlistan algunas reglas generales.

Tabla II. Reglas generales para la selección del modelo animal (Davidson *et al.*, 1987)

Idoneidad de la similitud entre el modelo y la especie diana

Capacidad de transferir la información

Uniformidad genética del organismo

Conocimiento general de sus características biológicas

Costo y disponibilidad

Aplicación general de los resultados a obtener

Facilidad de adaptación a la manipulación

Consecuencias ecológicas del uso del modelo

Implicaciones éticas

Disponibilidad de alojamiento adecuado

Tamaño del animal

Cantidad de animales que se requieren

Período de vida

Sexo

Cantidad de datos que se necesitan

Disponibilidad de equipo para la obtención de datos

Edad de los animales

Necesidades de reproducción si se requiere progenie

Conocimiento del comportamiento normal de la especie

Conocimiento específico de las principales enfermedades de la especie

Contar con personal capacitado para el manejo y cuidado de las(s) especies

Dentro de los modelos animales, el ratón representa al mamífero más conocido, con un genoma caracterizado y consecuentemente más utilizado. Dentro de la investigación representa un modelo ideal porque su genética se conoce perfectamente, su tamaño facilita su manejo, es de simple y barato mantenimiento y tiene un corto periodo de gestación, sus camadas son grandes y alcanza la madurez reproductiva muy pronto por lo que se obtienen varias generaciones en plazos cortos de tiempo. Es una especie con muchas cepas con y sin consanguinidad de forma que existe un amplio número de modelos a partir de esta exceedencia (Davidson *et al.*, 1987).

La rata es de igual forma ampliamente empleada en estudios de laboratorio en los cuales el ratón no puede ser estudiado. Las ratas han sido el animales de elección muchos estudios nutricionales, a pesar de su habito natural de coprofagia. El inicio de su estudio se remonta al siglo 16, sin embargo, el inicio del desarrollo de las ratas de laboratorio en su calidad de modelo experimental se dio en 1906 por el Instituto Wistar desarrollando el modelo de rata Wistar (*Rattus norvegicus*). Estas tienen su origen en algunas regiones de Asia, esta especie se encontraba comunmente en el siglo XVIII en Europa (The Wistar Institute, 2017).

Existen diferencias notables en los roedores entre los de tipo silvestre y los de laboratorio. En el caso de las ratas de laboratorio, por ejemplo, tienen pequeñas glandulas suprenales y prepuciales, alcanzan la madurez sexual en edad más temprana, carecen de estacionalidad en el ciclo reproductivo, tienen mejor fecundidad y vida útil más corta, en comparación a las de tipo salvaje en libertad (Bullock & Bunton, 2000).

Es de suma relevancia considerar varios aspectos del ciclo de vida de la rata, incluyendo la fase de edad en la que se encuentra donde resalta que las ratas tienen una infancia breve y acelerada en comparación al ser humano. Tienen un desarrollo rapido durante la infancia y empiezan a madurar sexualmente cerca de las 6 semanas de edad alcanzando la madures social en un rango de los 5 a 5 meses de dedad, mientras que los humanos se desarrollan de manera más lenta y no llegan a la pubertad hasta una edad aproximada de 11 o 12 años (Sengupta, 2013).

El único vínculo entre las madres mamíferas y sus infantes que crean y mantienen mientras se da el amantamiento se da por terminado de manera irrevocable en el

destete. Este proceso significa el desarrollo de una reorganización en el comportamiento de la ingesta donde los infantes subsisten exclusivamente de leche materna y los adultos de forma independiente seleccionan e ingestan alimentos sólidos. Este proceso se presenta de manera especial en las ratas, representando la primera fase en la vida de las ratas, en el que se introduce de manera gradual al infante a la dieta solida con el apartamiento de la leche materna. *Rattus norvegicus* comienza a ingerir alimento solido a la edad de 18 d, disminuyendo el tiempo dedicado a la lactancia alrededor del día 20 aumenta el consumo de alimentos sólidos, para el día 34, las crías ya no maman y el destete total. El promedio de destete en humanos es de 180 d mientras que este proceso dura alrededor de 3 semanas.

El peso corporal suele ser utilizado como indicador de la edad del animal, sin embargo, este parámetro carece de precisión respecto a las semanas de existencia. Se ha reportado que las ratas macho con un peso entre 250 g y 274 g tenían una edad discrepante en 3 semanas, desde la semana 49 (etapa de perioadolescencia) a la semana 70 (período como adulto joven). Aunado a esto las ratas macho de la misma edad presentan variaciones en el peso de hasta 100 g en el peso corporal (Figura 2).

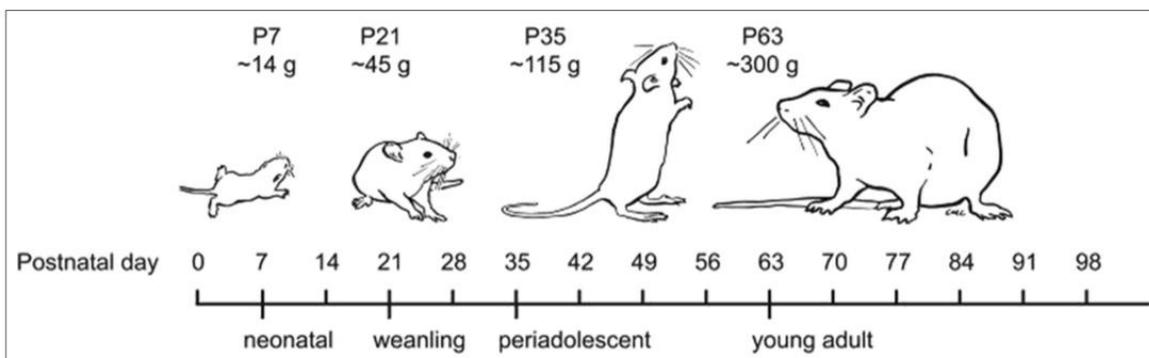


Figura 2. Correlación del peso corporal con diferentes fases de los días posteriores al alumbramiento (Sengupta, 2013)

El peso corporal, por lo tanto, solo es un aproximado de la edad corporal (Tabla III) (Sengupta, 2013).

Tabla III. Características fisiológicas generales y reproductivas de las ratas Wistar
(Sengupta, 2013)

Datos fisiológicos comunes	
Temperatura corporal	37°C
Datos respiratorios	75-115 respiraciones/min
Ritmo cardiaco	260-400 latidos/min
Consumo diario de agua	10-12 mL/100 g de peso corporal
Consumo diario de alimento	10 g/100 g de peso corporal
Tamaño de la camada	6-12
Peso al nacer	5 g
Edad de destete	21 días
Madurez sexual	7 semanas (~49 d)
Duración de la crianza	12-16 meses
Peso del adulto macho	450-550 g
Peso del adulto hembra	250-300 g
Lapso de vida	2.5 – 3.5 años
Parametros de reproducción	
Ratas macho	
Edad al apareamiento	8-10 semanas
Peso en el apareamiento	250-300 g
Ratas hembra	
Edad al apareamiento	8-10 semanas
Peso en el apareamiento	180-225 g
Duración del periodo de celo	4-5 d
Duración de celo	10-20 h
Tiempo de ovulación	8-11 h después del comienzo de celo
Menopausia	15-18 meses
Gestación	
Tiempo de copulación	Cercano al punto medio previo al ciclo oscuro
Tiempo en el que el espermatozoide es detectado en la vagina	1 d

Continuación

Tiempo de implantación	Después del día 5
Duración de la gestación	21-23 días

El conjunto de características señaladas indican que es indispensable entender que no se trata de una forma humana en miniatura debido a que se presentan diferencias en la anatomía, fisiología y el desarrollo que son fenómenos que deben tomarse en cuenta al momento de interpretar los resultados de cualquier investigación, además del factor de la edad que resulta crucial (Tabla III), en especial cuando se quieren hacer análisis de correlación con el humano.

4.5 Índice glucémico

El índice glucémico (IG) es la propiedad de los carbohidratos digeribles en diferentes alimentos de aumentar específicamente la glucosa en la sangre en un alimento dado. La Organización Internacional de Normalización, ISO por sus siglas en inglés (International Organization for Standardization), señala que de forma particular, esta propiedad hace referencia al incremento del área bajo la curva de la respuesta de glucosa después del consumo de una porción de carbohidratos de una prueba de alimento expresado como el porcentaje de la respuesta promedio a la misma cantidad de carbohidrato de un alimento de referencia tomado en el mismo sujeto en una ocasión diferente. (ISO, 2010). Este valor representa una característica del alimento en sí, el índice o porcentaje representa la calidad de alimentos con carbohidratos. Los alimentos que tienen carbohidratos que son digeridos, absorbidos y metabolizados rápidamente son clasificados en alimentos con alto IG y aquellos que se digieren, absorben y metabolizan lentamente son considerados de bajo IG. La ISO otorga los valores para esta clasificación que se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV. Parámetros de referencia sugeridos por la Organización Internacional de Normalización para la clasificación de los alimentos por su índice glucémico (ISO, 2010)

Clasificación	Valor de IG
Alto	≥ 70
Medio	56-69
Bajo	≤ 55

El concepto de IG por sí mismo sigue siendo considerablemente malinterpretado e incluso descartado por las limitantes que se pueden encontrar en la aplicación de este método como el poder evaluar la respuesta glucémica postprandial para las comidas de la vida real que consisten en combinaciones arbitrarias de alimentos y cantidades variables consumidas en diferentes momentos del día y en diferente proximidad a la actividad física y otras comidas (Zeevi *et al.*, 2015). Estudios que investigaron el efecto de las dietas con bajo índice glucémico en el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2, pérdida de peso y factores de riesgo cardiovasculares encontraron resultados variados, razones por las que muchos profesionales de la salud lo consideran como complejo e irrelevante para la práctica clínica (Greenwood *et al.*, 2013; Kristo *et al.*, 2013; Schwingshackl & Hoffmann, 2013).

Por otro lado, con el paso del tiempo, diferentes organizaciones han mostrado su apoyo calificado al uso de esta propiedad como la OMS (Mohan *et al.*, 2016), Federación Internacional de Diabetes (Greenwood *et al.*, 2013), Asociación Americana de Diabetes (Evert *et al.*, 2019), Diabetes UK (Diabetes UK, 2021) y el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, 2015).

4.6 Antecedente particular

El grupo de investigación del Laboratorio de Biotecnología I de la Universidad Autónoma de Chihuahua I realizó exitosamente la transformación de *P. pastoris* SMD 1163 con un vector que contiene un gen de la enzima sacarosa isomerasa (Castillo, 2017).

Posteriormente siguiendo la misma línea de investigación se establecieron las condiciones para la expresión de sacarosa isomerasa recombinante en *P. pastoris* SMD 1163 con el vector pSINX5-L202E (Ver Figura 3). La proteína codificada por dicho gen guarda un 100% de identidad con la secuencia aminocídica de la sacarosa isomerasa de *Erwinia rhapontici* (Sardiña, 2019). Esa isoforma será la utilizada como objeto de estudio en el presente trabajo.

En la Figura 3 se observan los componentes del vector pSINX5-L202E (5293 bp), enseguida se enunciarán los mismos conforme se da su aparición en sentido horario. Promotor AOX1: Es el promotor inducible por metanol, con la presencia de esta sustancia en el medio de cultivo ocurre la expresión del gen diana. Señal de secreción del factor α : Se encarga de dirigir la proteína heteróloga al sobrenadante



del cultivo. palINX5-L202E: Gen que codifica para la enzima sacarosa isomerasa. Sus secuencia aminoácidica fue optimizada para incrementar la estabilidad térmica de la enzima reemplazando un ácido glutámico por una leucina en la posición 250 utilizando como base la secuencia de *Erwinia rhapontici*. 6xHis: Secuencia de hexhistidinas ubicadas en el extremo N-terminal de la proteína que permite su unión específica a una matriz o fase estacionaria que contenga grupos quelantes de Ni²⁺ formando un complejo entre los componentes de la fase estacionaria y el grupo imidazol de los residuos de la cola de histidinas. Terminador AOX1: Es el terminador de la transcripción del gen diana. TEF1: Factor de elongación de traducción, es el responsable del eficiente transporte de RNAs de transferencia al ribosoma, permite la producción proteínas en las que se reprime la expresión de un gran número de genes implicados en el uso de fuentes de carbono menos favorecidas. Promotor EM7. Este promotor del fago T7 permite la expresión del gen de resistencia a antibiótico (bleomicina). BleoR. Codifica una proteína de unión a antibioticos la cual confiere resistencia a la bleomicina, fleomicina y zeocina. CYC1 terminator. Terminador de la transcripción para el gen de resistencia a antibiotico. Ori. Origen de replicación para *E. coli*. Marcados con líneas se muestran los sitios para enzimas de restricción.

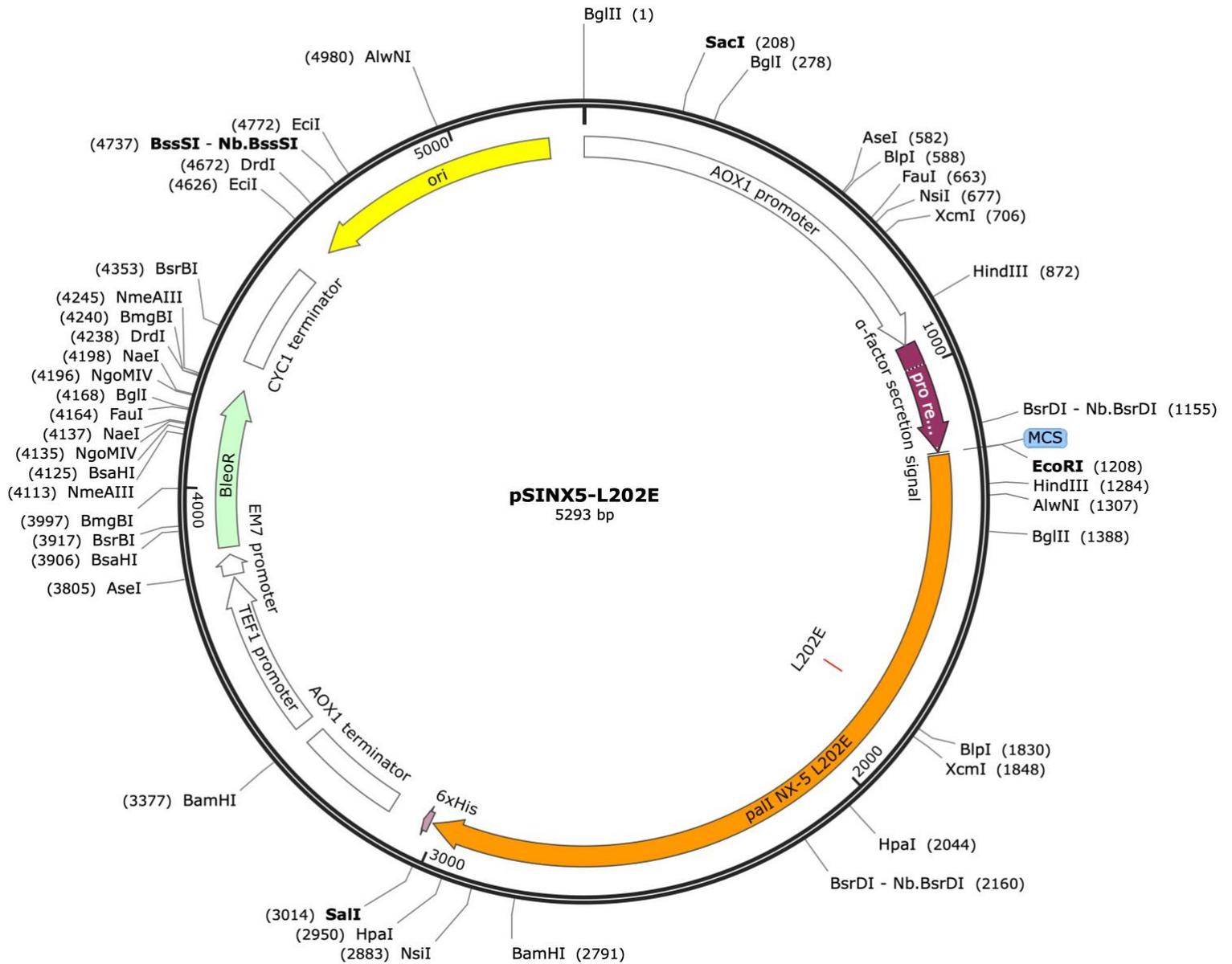


Figura 3. Plásmido pSINX5-L202E (5293 bp). Contiene el gen que codifica para la enzima sacarosa isomerasa responsable de la reacción para obtener isomaltulosa a partir de sacarosa (Sardiña, 2019)



V. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo de datos de la OMS (2021), más del 50% de los adultos en los países miembro padecen obesidad y sobrepeso, condición que está estrechamente relacionada con el consumo de alimentos con un alto contenido de carbohidratos con un alto índice glucémico como bebidas endulzadas, botanas, dulces y postres. La sustitución de alimentos de alto índice glucémico por los de bajo índice glucémico mejora el control de la glucosa en sangre, regula el peso corporal y promueve el control del apetito siendo la isomaltulosa un ejemplo claro de un sustituto potencial además que a pesar de tener aproximadamente 50% del dulzor relativo de la sacarosa es menos lábil bajo condiciones extremas de pH mostrando ser estable durante más de 30 min cuando es incubada a pH 1.0 y 95 °C mientras que su antecesor, la sacarosa, se hidroliza casi por completo bajo las mismas condiciones. El conjunto de propiedades señaladas con anterioridad hace a la isomaltulosa única dentro del espectro de edulcorantes alternativos comercializados en la actualidad. Para iniciar el proceso de registro de propiedad intelectual y derechos de inventor, es necesario demostrar primeramente que en modelos murinos el efecto es prolongar la curva glucémica cuando se compara con su antecesor, la sacarosa.



VI. HIPÓTESIS

La isomaltulosa obtenida de forma recombinante prolonga la curva glucémica cuando se compara con su antecesor, la sacarosa, en ratas Wistar.



VII. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Evaluar el índice glucémico en ratas tratadas con isomaltulosa de origen recombinante.

7.2 Objetivos Particulares

1. Realizar la conversión de sacarosa a isomaltulosa de origen recombinante en un porcentaje mayor al 90%.
2. Determinar el efecto en los niveles glucémicos de la isomaltulosa (obtenida por la enzima sacarosa isomerasa) en ratas Wistar.
3. Estudiar el índice glucémico de la isomaltulosa (obtenida de forma recombinante) en ratas Wistar.



VIII. MATERIALES

8.1 Material biológico

- *Pichia pastoris* SMD 1163. Genotipo: deficiente en proteinasa A y B, transformada con el vector pSINX5-L202E.

8.2 Material y equipo de laboratorio

- Asa bacteriológica
- Autoclave Felisa
- Balanza analítica OHAUS
- Baño María VWR Scientific
- Cajas Petri estériles
- Cámara de electroforesis horizontal SIGMA®
- Campana de flujo laminar
- Centrifuga Eppendorf
- Congelador -20 °C Scientemp
- Congelador -80 °C VWR Scientific Products
- Espacio para el espectro de insulina
- Fotodocumentador KODAK® DC290
- Frascos de vidrio Pyrex®
- Fuente de poder SIGMA®
- Incubadora VWR Scientific
- Jeringa para Insulina 1 mL
- Matraces Erlenmeyer 50, 100, 250 y 500 mL
- Microondas SHARP
- Micropipetas Eppendorf 10, 100 y 1000 µL
- Parrilla de calentamiento Thermo Scientific®
- Potenciómetro Daigger
- Probetas 100, 250, 500 y 1000 mL
- Refrigerador 4 °C Kelvinator
- Refrigerador 4 °C TOR REY
- ReliOn™ Premier Classic Blood Glucose Monitoring System
- Shaker e incubadora INNOVA 43



- Sonda para alimentación de plástico transparente, estéril, desechable, con un orificio en el extremo proximal y otro en los primeros 2 cm infantil, cal 8 fr, long 38.5 cm

8.3 Reactivos y sustancias

- Agua destilada estéril
- Agar Bacteriológico
- Agua inyectable
- Ampicilina (100 µg/µL) SIGMA –ALDARICH®
- Buffer de carga para SDS-PAGE
- Buffer de corrida para SDS-PAGE
- Buffer de fosfatos
- Buffers de citratos 50 mM y 100 mM
- Cloruro de calcio 50 mM y 100 mM
- Invertasa SIGMA® catalogo: SLBG7298V
- Isomaltulosa Numadex DB 500 gr.
- Kanamicina (60 µg/µL) SIGMA –ALDARICH®
- Kit de extracción de proteína de levadura Y-PERTM Thermo Scientific
- Marcador de peso molecular Kaleidoscope Prestained Standards BIO RAD
- Medios de cultivo LB, YPD Y BMMY
- Metanol absoluto SIGMA –ALDARICH®
- NaOH, 1% SDS (2)
- Reactivo de Biuret
- Sacarosa (SIGMA – ALDARICH)
- SDS al 10%
- Solución 2: 0.2 M NaOH, 1% SDS
- Solución de acrilamida al 30%
- Solución de PBS
- Solución para tinción y destinción
- Solución salina al 0.9%



- Soluciones de albumina (5, 10, 15 y 20 mg/mL) SIGMA – ALDARICH®
- Zeocina (100 µg/µL) SIGMA –ALDARICH®

IX. MÉTODOS

9.1 Estrategia para el cultivo de *Pichia pastoris* SMD 1163 transformada con el vector pSINX5-L202E y la expresión de sacarosa isomerasa palINX5-L202E

La estrategia que se siguió para cultivar *Pichia pastoris* SMD 1163 transformada con el vector pSINX5-L202E con la intención de expresar a la proteína sacarosa isomerasa recombinante fue la establecida por Jiang *et al.* (2008) para la inducción de la expresión de la lactoferrina humana recombinante en *P. pastoris* KM71. En dicha metodología las levaduras ya transformadas se inoculan en medio YPD con antibiótico (ampicilina 100 µg/µL, kanamicina 60 µg/µL, y zeocina 100 µg/µL), se dejan incubando en agitación vigorosa durante 24 h a 30 °C a 250 rpm. Posteriormente, se centrifugan a 5000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min, se descarta el sobrenadante y la pastilla se resuspende en medio BMMY para una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) inicial de 0.1 a 0.2, cada 24 h por 72 h se adiciona metanol al 0.5% (v/v concentración final). Durante dicho período los cultivos se mantienen a 30 °C a 250 rpm.

9.2 Identificación de la proteína sacarosa isomerasa a través de un gel de poliacrilamida por la técnica de SDS-PAGE (Laemiil, 1970)

Se pusieron dos vidrios BIORAD® para electroforesis de proteínas en un porta geles dejando una separación de 1 mm entre cada uno, previamente lavados con etanol al 70%, situando el más grande atrás y el chico adelante. Una vez sellados, se comprobó que no existiera fuga alguna con agua destilada, se retiró el agua dejando que se secase. El gel de poliacrilamida al 12% se hizo con proporción a la Tabla IV.

Tabla IV. Preparación de gel de poliacrilamida al 12% para realizar la técnica SDS-PAGE

Reactivos	Cantidades	
	Gel separador	Gel concentrador
Agua	1.6 mL	2.7 mL
Acrilamida al 30%	2 mL	670 μ L
1.5 M Tris HCl pH 8.8	1.3 mL	-
1.5 M Tris HCl pH 6.8	-	500 μ L
SDS 10%	50 μ L	40 μ L
APS 10%	50 μ L	40 μ L
TEMED	2 μ L	4 μ L

Primero se preparó el gel separador colocándolo en la parte inferior de los vidrios para luego adicionar agua con la intención de una polimerización más veloz. Una vez polimerizado, se le retiró el agua; luego se realizó el gel concentrador colocándosele un peine de 10 pozos entre los vidrios. Ya que polimerizó, se ubicó en una cámara para electroforesis BIORAD® llena con buffer de corrida 1X, se quitó el peine y los pozos del gel fueron lavados con el buffer de corrida.

Para la preparación de las muestras: se colocaron 10 a 20 μ g de proteínas totales y se añadió buffer de carga 5X, se calentaron las muestras a baño María (100 °C) y posteriormente se cargaron en el gel. Durante media hora se realizó la corrida a 100 V y una hora y media a 80 V. Se retiró el gel de la cámara, se tiñó con 50 mL de solución de tinción a 40 min en agitación suave, luego se retiró la solución, se realizaron varios lavados, se agregó la solución de destinción y se dejó por 10 h.

9.3 Cinética de producción de isomaltulosa - trehalulosa

El sistema reaccionante para el desarrollo de la cinética de producción de isomaltulosa – trehalulosa se basó en 1 L de solución de sacarosa 3 M (55 °Brix) disuelta en buffer de citratos 50 mM pH 5.0 a una temperatura de 30 °C en agitación a 60 rpm y la aplicación semicontinua de la solución de proteínas totales para una masa agregada de 95 mg. La reacción fue detenida una vez que se alcanzó la conversión al 90%.

9.4 Determinación de la pureza de la isomaltulosa recombinante por HPLC (Cromatografía líquida de alto rendimiento)

Los contenidos de sacarosa, isomaltulosa, trehalulosa, glucosa y fructosa de la mezcla de reacción fueron determinados por medio de la técnica HPLC (High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés). Se utilizó el equipo Agilent 1100 y la columna Zorbax NH2 analytical 4.6 x 250 mm 5 μ de Agilent® en el Laboratorio de Química Analítica III de la FCQ-UACH. Las condiciones de la corrida fueron: volumen de inyección: 20 μ L, flujo: 0.8 mL/min, temperatura: 25°C, fase móvil: acetonitrilo: agua (71:29). La concentración de productos fue calculada, a partir de la comparación del área de sus respectivos picos con los de los estándares.

9.5 Animales y alojamiento

Un total de 24 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) hembras y machos (Bioterio de la FCQ-UACH) de seis semanas de edad fueron alojadas en jaulas de Plexiglás (450 x 280 x 130 mm) con pisos de rejilla de acero inoxidable en el suelo con temperatura controlada (22 \pm 2°C) en la habitación de pruebas con ciclos de 12/12 horas de luz y oscuridad. Las ratas tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento comercial (BDL-7100; ABENE, Estado de México, México; 46.5% de carbohidratos, 23% de proteína, 4.5% de grasa y 0.6% de fibra; 3.2 kcal/g de contenido metabolizable de energía) antes del inicio de los experimentos.

Todos los procedimientos con animales fueron en estricto seguimiento a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1999. El protocolo fue aprobado por el CICUAL (Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio) de la FCQ-UACH.

Las ratas fueron privadas de alimento en sus propias jaulas 16 h antes del inicio de los experimentos para prevenir la coprofagia, pero con acceso libre al agua.

9.6. Estudio del índice glucémico

9.6.1 Para el estándar de glucosa

A un grupo de 10 ratas se les administró por sonda orogástrica 25 g de glucosa anhidra disuelta en agua de acuerdo con lo establecido por el protocolo ISO que permite utilizar esta cantidad de carbohidratos (ISO, 2010). Dos horas después, se

inmovilizó al murino y se le tomó muestra de 1 μ L de sangre a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min de la cola mutilando la punta de esta con un equipo de disección y se midió de forma cuantitativa la concentración de glucosa en sangre total en el equipo ReliOn™ Premier Classic Blood Glucose Monitoring System.

9.6.2 Para la isomaltulosa obtenida de forma recombinante

Al mismo colectivo de ratas una vez transcurrido el tiempo de ayuno de igual manera que en la glucosa, se les aplicó de forma similar una dosis de 25 g de la isomaltulosa obtenida de forma recombinante disuelta en agua. Una vez que pasaron dos horas se realizó la extracción de sangre para la determinación de glucosa en sangre total de la misma forma que en el estándar de glucosa.

9.6.3 Determinación aritmética del índice glucémico

Para establecer el área bajo la curva de glucemia durante dos horas que se produce por el consumo de la isomaltulosa de origen recombinante comparada con el incremento producido al consumir el estándar de glucosa, que sirvió como referencia, se realiza el siguiente cálculo matemático:

$$IG_{\text{ISOMALTULOSA OBTENIDA DE FORMA RECOMBINANTE}} = \frac{\text{Área bajo la curva de glucemia} \\ 2 \text{ horas después de consumir Isomaltulosa}_{\text{obtenida de forma recombinante}}}{\text{Área bajo la curva de glucemia} \\ 2 \text{ horas después de consumir 25 g de glucosa (Estándar)}} \times 100$$

9.7 Determinación de los niveles de glucosa en sangre

Pasado el periodo de ayuno, se obtuvo una muestra de sangre de la vena de la cola de la rata a los 0 min para entonces administrarles por vía oral isomaltulosa obtenida de forma recombinante, isomaltulosa comercial, sacarosa y agua como control negativo en una dosis de 2 g/kg en un volumen de 10 mL/kg. Se inmovilizaron y se obtuvieron muestras de sangre a los 20, 40, 60, 90, 120, 180 y 240 min. Se determinó entonces la glucosa en sangre usando el equipo ReliOn™ Premier Classic Blood Glucose Monitoring System.

9.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron representados como medias y las desviaciones estándar de la concentración de glucosa en los animales usados. Para el análisis estadístico fue realizado por un diseño completamente al azar y para probar diferencias

significativas entre las medias del cambio en el comportamiento de la glucosa en la sangre para cada tratamiento se elaboró una comparación por Tukey.

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Estrategia para el cultivo de *Pichia pastoris* SMD 1163 transformada con el vector pSINX5-L202E y la expresión de sacarosa isomerasa palINX5-L202E

Siguiendo la metodología descrita en la sección 9.1 de Jiang *et al.* (2008) sustentada en dos momentos principalmente, en el que el primero de ellos se enfoca a obtener la cantidad suficiente de biomasa para dar inicio a la inducción de la expresión de proteína recombinante de ahí la importancia del estado fisiológico de las células obtenidas en esta primera parte. Derivado de esto, el primer paso de la estrategia manejada en esta sección consiste en supervisar el tiempo propuesto para la primera fase del cultivo.

En la figura 4 se muestra la cinética de crecimiento de *P. pastoris* SMD 1163 en medio YPD a 30°C y 250 rpm. Se partió de una DO₆₀₀ de 0.2. Se observa que permanece en fase de adaptación por un período aproximado de 1.5 h.

La velocidad específica máxima de crecimiento a la que se desarrolló fue de 0.247 h⁻¹. La alta densidad celular del cultivo en el momento de la inoculación creó una restricción en su desarrollo. Este efecto limitante que se observa en altas densidades celulares es el resultado de limitaciones de transferencia de masa, potencialmente la transferencia y disponibilidad de oxígeno molecular. Se hace dicha deducción tomando en cuenta que la concentración de glucosa, que fue la fuente de energía y carbono, al final de la etapa logarítmica del cultivo era de 16 g/L, valor que es muy superior a la K_s glucosa (25 mg/L) de *Saccharomyces cerevisiae* genotipo silvestre, por lo que se puede aceptar que la cantidad de glucosa fue suficiente con un 16% de conversión en biomasa y reacción de mantenimiento celular. Existen modificaciones importantes en el estado fisiológico del cultivo cuando el fin de la fase exponencial se ha dado generados por la escasez de un sustrato. Realizando dicho análisis se puede afirmar que siguiendo las condiciones del ensayo establecido por Jiang *et al.* (2008) y optimizadas por Sardiña (2019) son adecuadas para *P. pastoris* 1163 debiendo ser el tiempo de 7 a 11 h en función a la DO comprendido durante la inoculación, quedando establecido una DO de 0.05,

con una temperatura de cultivo de 30 °C y una agitación a 250 rpm por un período de 11 h.

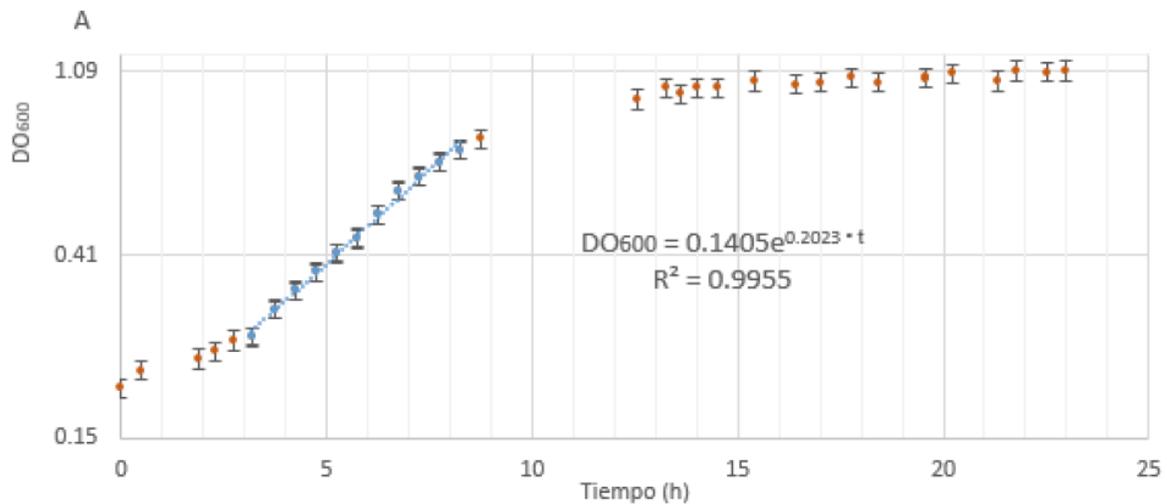


Figura 4. Cinética de crecimiento de *Pichia pastoris* SMD 1163 transformada con el vector pSINX5-L202E en medio YPD a 30°C y 250 rpm. Se muestra el modelo de tipo exponencial que describe el crecimiento celular en esta fase.

10.2 Identificación de la enzima sacarosa isomerasa a través de un gel de poliacrilamida por la técnica de SDS-PAGE (Laemiil, 1970)

Antes de llevar a cabo la reacción enzimática, con el fin de identificar la presencia de la enzima sacarosa isomerasa en el extracto de proteínas totales de *P. pastoris* SMD 1163, se realizó un gel de poliacrilamida a través de la técnica SDS-PAGE. Al comparar los resultados mostrados en la Figura 5, se observó una banda, que hace referencia a la isoforma de trabajo, en valores relativamente cercanos a los 77 kDa. Luego de comparar este valor se encontró que es similar a la predicha y comparable a la de su contraparte nativa *Erwinia rhapontici* de ~70 kDa (Xu *et al.*, 2013). También fue posible observar otros dos fragmentos que se lograron separar en el gel de poliacrilamida de 104.7 y 81.13 kDa mismos que pueden explicarse en la capacidad que tiene *P. pastoris* en llevar a cabo glicosilaciones como una de las variadas capacidades en cuanto a modificaciones postraduccionales con las que cuenta (Karbalaei *et al.*, 2020; Radoman *et al.*, 2021) y relacionado a los sitios potenciales de glicosilación en las variantes de la enzima sacarosa isomerasa pall NX5 (Sardiña-Peña *et al.*, 2022). En dicho sentido es conocido el efecto que tienen

dichas modificaciones en el peso molecular de una molécula dando como resultado un aumento en este (Zou *et al.*, 2013).

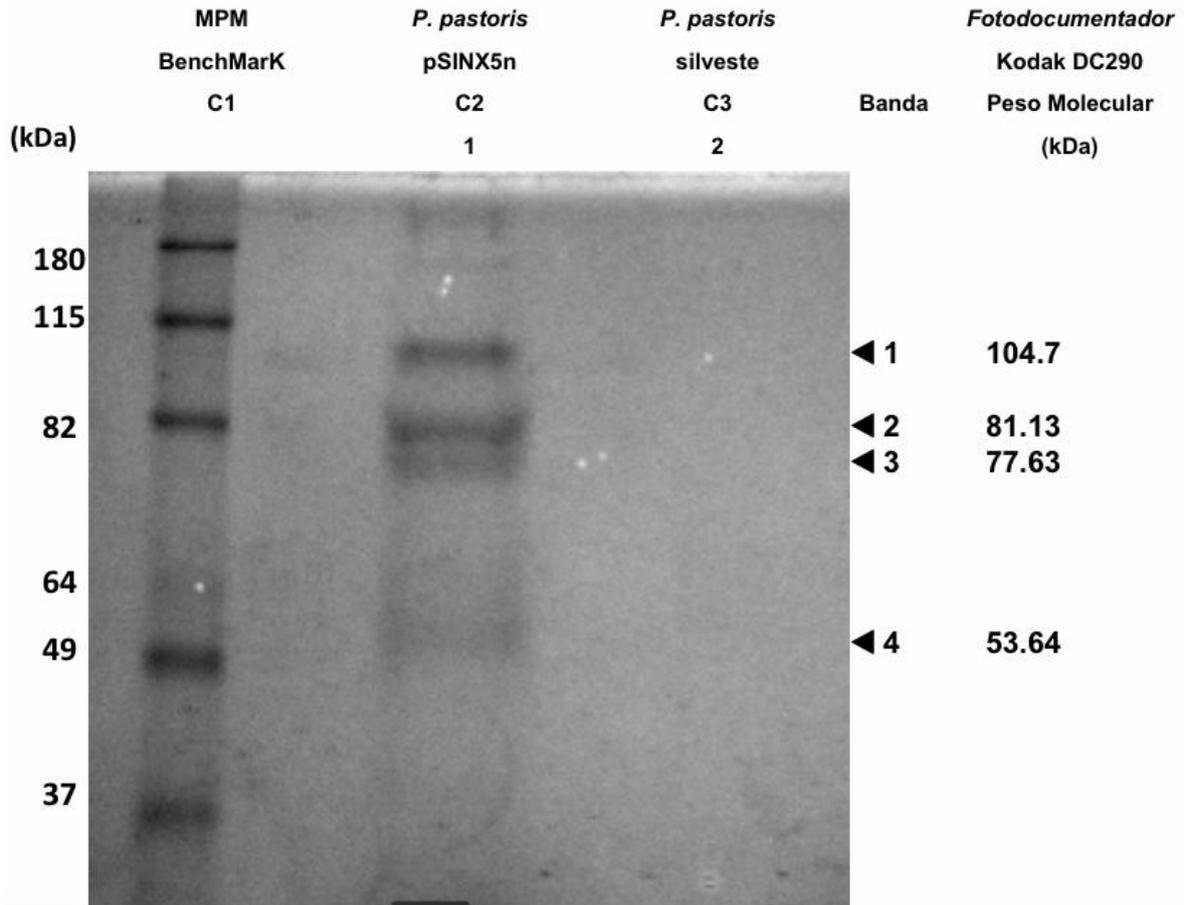


Figura 5. Perfil de proteína inducida en *Pichia pastoris* SMD 1163. Carril 1) Marcador de peso molecular BenchMark. 2) Isoforma de trabajo *Pichia pastoris* SMD 1163 transformada con el vector pSINX5-L202E. 3) *Pichia pastoris* SMD silvestre

10.3 Determinación de la pureza de la isomaltulosa recombinante por HPLC (Cromatografía líquida de alto rendimiento)

Para determinar la separación y el tiempo de retención de los analitos esperados, isomaltulosa, trehalulosa, glucosa y sacarosa, producto de la cinética enzimática de la sacarosa isomerasa de acuerdo con lo reportado en la literatura, se realizó la curva de calibración con soluciones estándar de cada uno. La detección se hizo por medio de detector de índice de refracción. El resultado se muestra en la Figura 6. Las curvas de calibración se muestran en las Figuras 6, 7, 8 y 9.

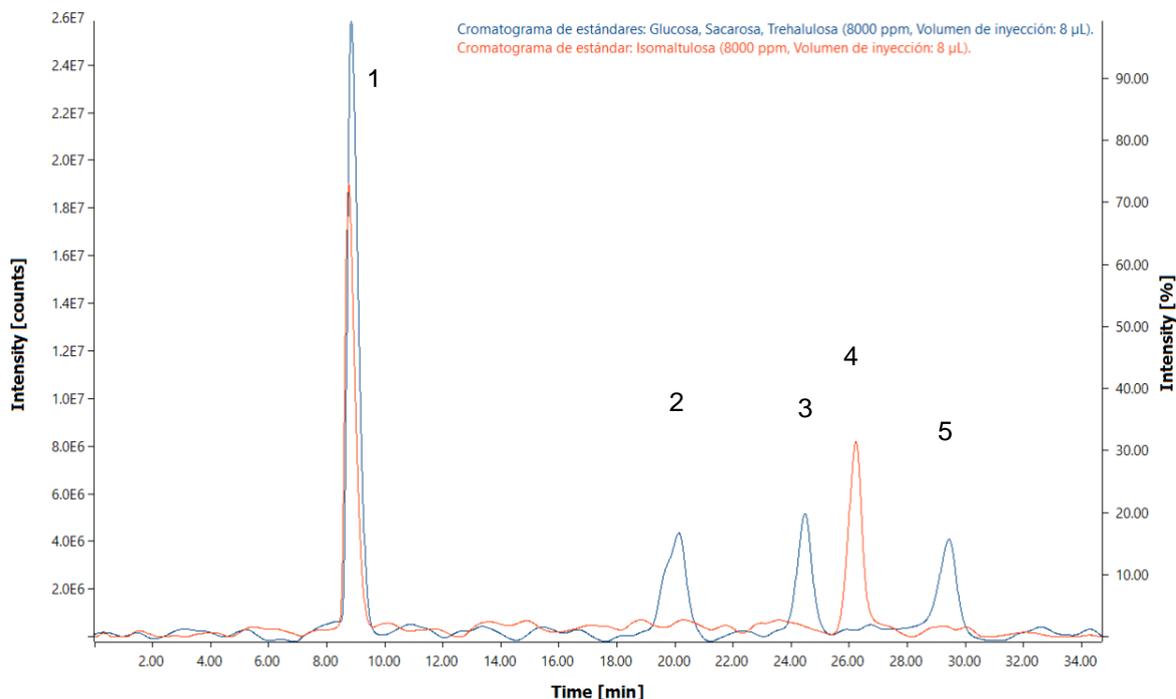


Figura 6. Cromatograma de la comparación de los estándares de Glucosa, Sacarosa, Isomaltulosa y Trehalulosa. 1) Pico de inyección. 2) Glucosa. 3) Sacarosa. 4) Isomaltulosa. 5) Trehalulosa

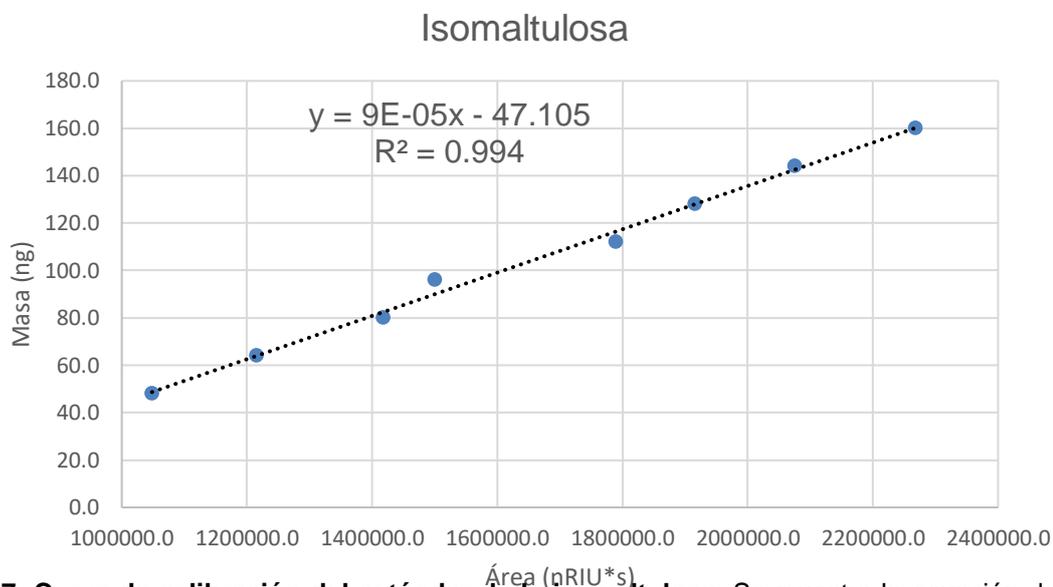


Figura 7. Curva de calibración del estándar de la isomaltulosa. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.

Sacarosa

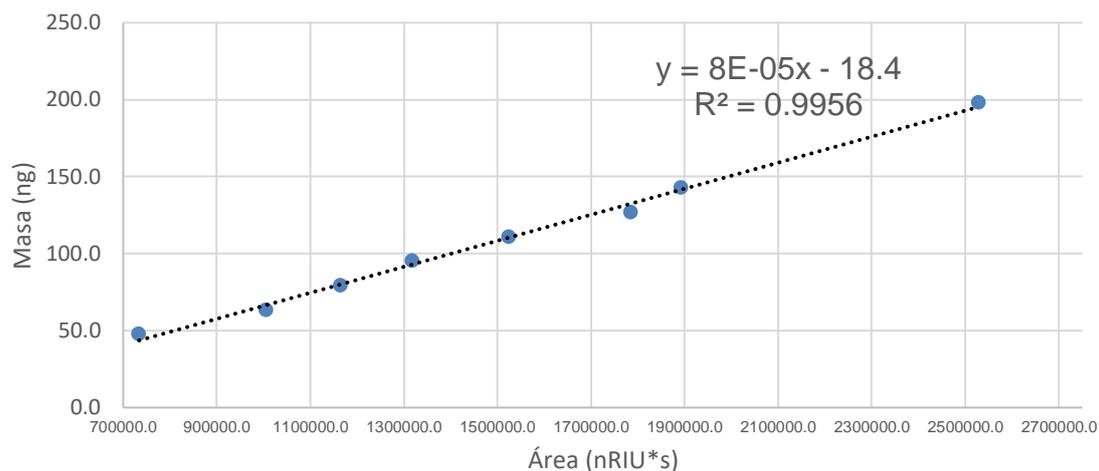


Figura 8. Curva de calibración del estándar de la sacarosa. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación

Glucosa

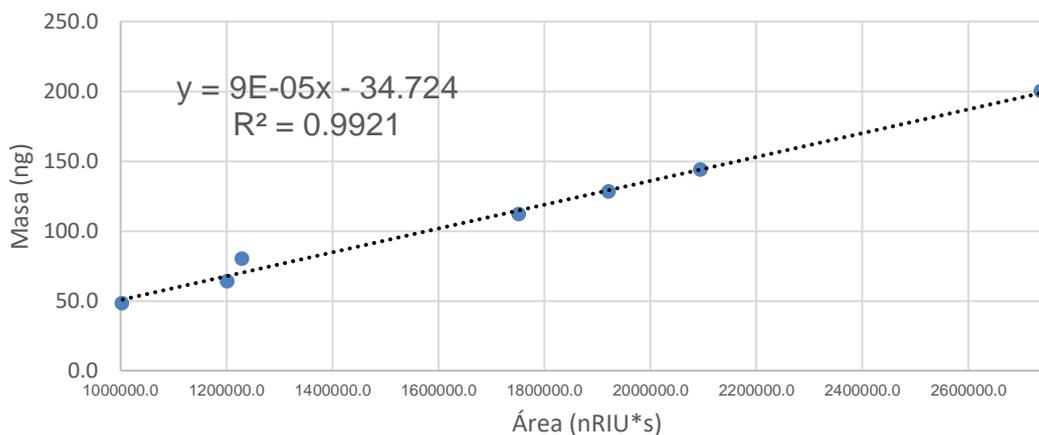


Figura 9. Curva de calibración del estándar de la glucosa. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.

Trehalulosa

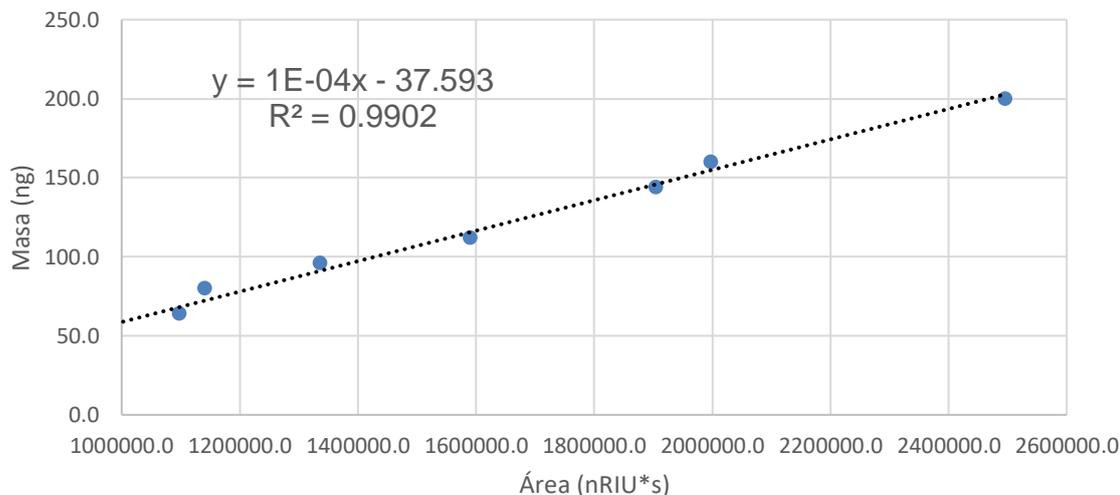


Figura 10. Curva de calibración del estándar de la trehalulosa. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.

La fase móvil es no polar, generalmente se usan hidrocarburos, diclorometano, acetato de etilo u otro disolvente inmiscible en agua por lo que resultó útil el acetonitrilo para resolver a los componentes polares que se retienen más (Pitsch & Weghuber, 2019). La retención se reduce conforme aumenta la polaridad de la fase móvil. Cuando hay una fase móvil más polar, los análisis saldrán más rápido. Para el caso de la isomaltulosa, esta es más polar que la sacarosa (Hutchinson et al., 2012).

Una vez realizado el análisis de los estándares de los isómeros estudiados y sus monosacáridos estructurales con sus respectivos tiempos de retención se procesaron las muestras, producto de la cinética enzimática de la sacarosa isomerasa, para aumentar la resolución de los cromatogramas se realizaron diluciones de dichas muestras. Los resultados se muestran en la Figura 11.

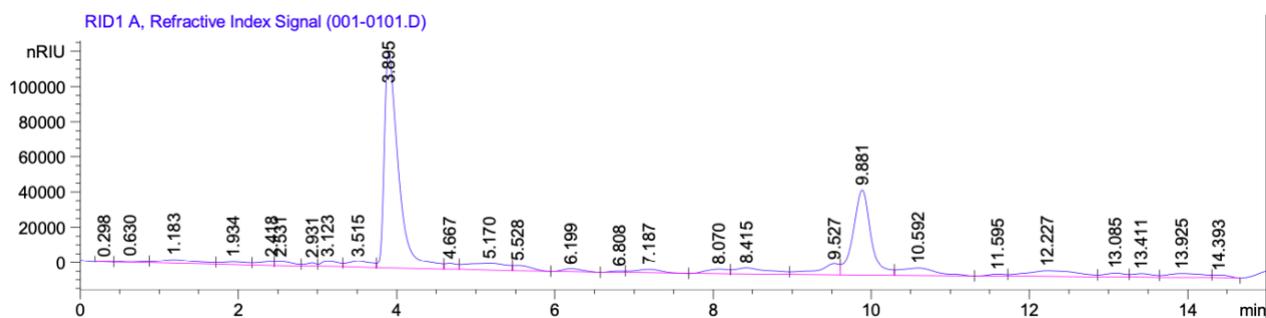


Figura 11. Cromatograma de los productos de la reacción para la producción de isomaltulosa-trehalulosa con la enzima SINX5-L202E . Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.

Los datos sobre los tiempos de retención y concentración de los productos de la reacción se encuentran en la Tabla V.

Tabla V. Tiempos de retención y concentración de los productos de la reacción llevada a cabo con la enzima SINX5-L202E

Análito	Retención (min)	Porcentaje de conversión aparente (%)	Masa (ng)	Moles (pmol)
Isomaltulosa	9.981	~100	42.724	121.9608
Sacarosa	No detectable	No detectable	0	0
Trehalulosa	No detectable	No detectable	0	0

El cromatograma de los productos de reacción (Figura 11) muestra un unico pico de identidad que de acuerdo a los estándares estudiados previamente estudiados pertenece al de la isomaltulosa, lo que sugiere que pasado el tiempo de reacción, la enzima logró llevar a cabo casi por completo el proceso de isomerización al

sustrato utilizado y que al realizar las diluciones, con la intención de mejorar el aspecto del cromatograma, la retención del resto de analitos permanecieron por debajo del límite de detección. Este resultado muestra un porcentaje de conversión superior al antecedente de Castillo (2017) de 41.80% resultado que en la estrategia para la conversión de sacarosa a isomaltulosa se optó por prolongar el tiempo de reacción y la concentración en la aplicación semicontinua de enzima.

10.4 Animales y alojamiento

Las características físicas del grupo de ratas en estudio se muestran en la tabla VI. Se usó de forma aleatoria la selección de ratas sin priorizar su sexo en virtud que la variable de respuesta es la misma tanto para hembras como para machos por lo que tener un grupo en igual número de cada uno no se tomó en cuenta.

Tabla VI. Características físicas de las ratas en estudio

Parámetros	Resultado
Edad (Semanas)	6
Peso (g)	154 ±22
Talla – Cuerpo y cola (cm)	40 ±7

10.5 Estudio del índice glucémico

La isomaltulosa obtenida de forma recombinante presentó un índice glucémico bajo en la población analizada con un valor de 74.37%.

Este coeficiente úbica al producto de la reacción entre los clasificados por Atkinson *et al.* (2021) con un alto índice glucémico, sin embargo, es necesario considerar que la metodología empleada puede tener ciertas imprecisiones cuando se trata de mezcla de diferentes tipos de carbohidratos a diferencia del cálculo de los valores de índice glucémico en ingredientes por separado de acuerdo al estudio sobre la importancia de estos coeficientes hechos por Augustin *et al.* (2015).

10.6 Glucosa en sangre

Los niveles de glucosa basal para los grupos tratados con la isomaltulosa de origen recombinante, la sacarosa, la isomaltulosa comercial y el agua fueron de 105 (7.34 DE), 101.33 (16.653 DE), 76.5 (0.7071 DE) y 69. 8 (6.14 DE) mg/dL respectivamente.

La Figura 12 muestra en el transcurso del tiempo los cambios en los niveles de glucosa después de una administración oral de la isomaltulosa de origen recombinante, sacarosa, y isomaltulosa comercial y agua como control negativo.

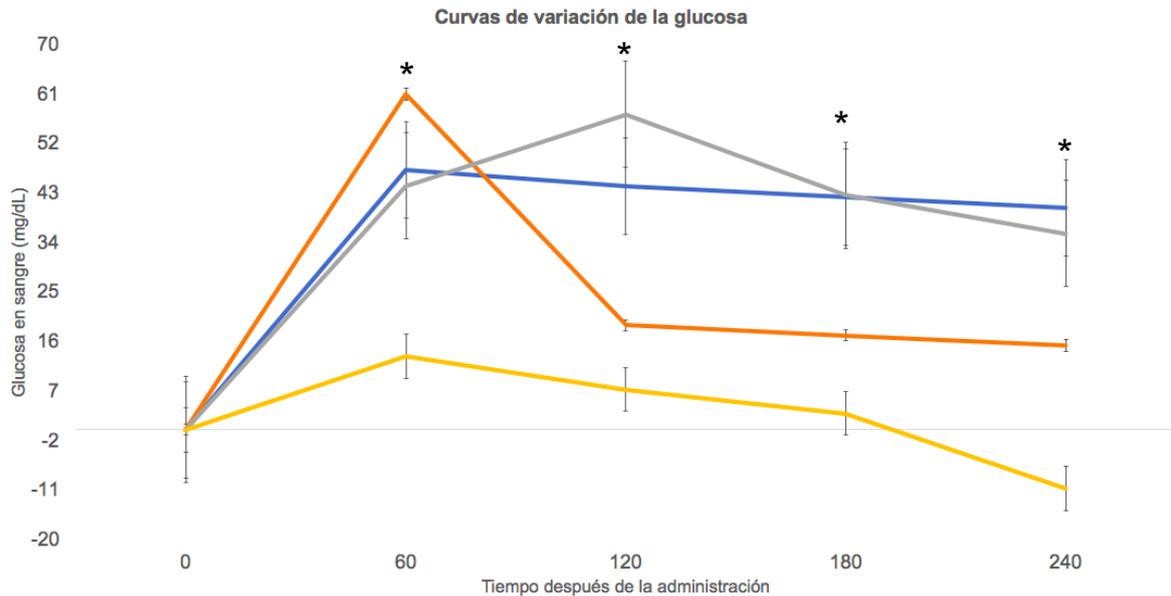


Figura 12. Evaluación temporal de la glucosa en sangre. Se muestra la respuesta después de una administración simple a las ratas de los cuatro tratamientos: isomaltulosa obtenida de forma recombinante —, sacarosa —, isomaltulosa comercial — y agua como control negativo —. Los valores de isomaltulosa que fueron significativamente diferentes a la sacarosa: ** $P < 0.01$.

En las Tablas VII, VIII, IX y X se muestran las comparaciones de las variaciones de la glucosa en sangre en parejas de los tratamientos utilizando el método de Tukey para cada intervalo de tiempo.

Cuando se comparó con el grupo de la sacarosa, la isomaltulosa de origen recombinante y la comercial fueron menores durante los primeros 60 min después de la administración, comportamiento similar a estudios realizados con anterioridad en ratas (Häberer *et al.*, 2009).

Tabla VII. Comparación de las variaciones de la glucosa en sangre entre tratamientos en el intervalo de los primeros 60 min con un 99% de confianza. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
Sacarosa	5	61	A
Isomaltulosa de origen recombinante	5	46	B
Isomaltulosa comercial	5	44	B
Agua	5	12	C

Los niveles de glucosa en sangre de los grupos de isomaltulosa se mantuvieron por encima de la sacarosa en el lapso de los 60 a los 120 min. Dicho comportamiento se mostro similar en el resto de intervalos de tiempo observados.

Tabla VIII. Comparación de las variaciones de la glucosa en sangre entre tratamientos en el intervalo de los 60 a los 120 min con un 99% de confianza. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
Isomaltulosa de origen recombinante	5	58	A
Isomaltulosa comercial	5	57	A
Sacarosa	5	19	B
Agua	5	7	C

La isomaltulosa de origen recombinante y la comercial permanecieron sin cambios significativos entre si durante los primeros 180 min de observación donde a partir de dicha medición mostraron un comportamiento donde la de origen comercial descendió los niveles de suministro de glucosa a la sangre hasta el final del experimento. Este fenómeno se explica por el grado de pureza la que cuenta la comercial, encontrandose libre de trazas de los isómeros de la sacarosa y los monómeros producto de la hidrólisis.

Tabla IX. Comparación de las variaciones de la glucosa en sangre entre tratamientos en el intervalo de los 120 a los 180 min con un 99% de confianza. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
Isomaltulosa de origen recombinante	5	55	A
Isomaltulosa comercial	5	43	B
Sacarosa	5	17	C
Agua	5	3	D

El grupo utilizado como control al cual solo se le administró agua permaneció sin cambios llamativos a lo largo de los 240 min que se estudiaron sus niveles de glucosa.

Tabla X. Comparación de las variaciones de la glucosa en sangre entre tratamientos en el intervalo de los 180 a los 240 min con un 99% de confianza. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
Isomaltulosa de origen recombinante	5	54	A
Isomaltulosa comercial	5	36	B
Sacarosa	5	16	C
Agua	5	-11	D

XI. CONCLUSIONES

Utilizando las condiciones de incubación para la expresión de la enzima sacarosa isomerasa recombinante en *P. pastoris* SMD 1163 utilizando el vector pSINX5-L202E se lograron identificar bandas en geles de poliacrilamida con pesos muy cercanos a los de la contra parte nativa de la proteína. De manera consecuente se estudió la actividad enzimática de la misma de manera directa por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), determinando los tiempos de retención tanto de la isomaltulosa y la sacarosa, así como sus monosacáridos estructurales logrando su separación y la identificación de estos analizando los cromatogramas resultantes. Este producto fue administrado por vía orogastrica en una sola dosis (2g/kg) a las ratas Wistar alojadas y proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ-UACH). Se adaptó en ratas el protocolo establecido por la Organización de Estándares Internacionales (ISO 26622:2010) para humanos, obteniendo altos valores en el índice glucémico en comparación a la glucosa utilizada como alimento de referencia en virtud que el estudio de alimentos combinados puede provocar impresiones en la determinación de este valor, lo que hace necesario estudiar el índice glucémico con la previa separación de las trazas que quedan como remanentes a la reacción de conversión con la enzima sacarosa isomerasa y así obtener un resultado más exacto de acuerdo a los últimos consensos encontrados en la literatura respecto a la importancia de la clasificación de alimentos.

También se comparó su efecto contra la sacarosa e isomaltulosa comercial utilizando agua simple como control negativo. El análisis de varianza de un solo factor demuestra que los tratamientos son diferentes entre sí teniendo un efecto en los niveles de glucosa en sangre y que se confirma la hipótesis donde la isomaltulosa de origen recombinante prolonga estos niveles en comparación al comportamiento que muestra su antecesor, la sacarosa, con un 99% de confianza.



XII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

1. Realizar un proyecto de investigación para determinar el efecto de la isomaltulosa (obtenida por la enzima sacarosa isomerasa) en el comportamiento de la insulina en modelos murinos.
2. Realizar un estudio clínico en humanos para determinar los efectos en el comportamiento del metabolismo de la glucosa de la isomaltulosa obtenida por la enzima sacarosa isomerasa.



XIII. REFERENCIAS

- Aileen. (2020). *Animal Models of Diabetes Methods and Protocols*. <http://www.springer.com/series/7651>
- Bullock, G., & Bunton, T. (2000). *The handbook of experimental animals The laboratory rat* (American Press, Ed.).
- Castillo, M. (2017). *Conversión enzimática de sacarosa en isomaltulosa mediante la expresión de sacarosa isomerasa en Pichia pastoris*. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Çelik, E., Çalik, P., & Oliver, S. G. (2009). Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast*, 26(9), 473–484. <https://doi.org/10.1002/yea.1679>
- Cereginho, G., Cereginho, J., Ilgen, G., & Cregg, J. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 329–332.
- Cregg, J. M., Cereginho, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). *Recombinant Protein Expression 23 Molecular Biotechnology Review 23 Recombinant Protein Expression in Pichia pastoris*. www.kgi.edu/html/
- Davidson, M. K., Lindsey, J. R., & Davis, J. K. (1987). Requirements and selection of an animal model. In *Israel Journal of Medical Sciences* (Vol. 23, pp. 551–555).
- de Groot, E., Schweitzer, L., & Theis, S. (2020). Efficacy of isomaltulose compared to sucrose in modulating endothelial function in overweight adults. *Nutrients*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/nu12010141>
- Diabetes UK. (2021, June 24). *Glycaemic Index and Diabetes*. London: The British Diabetic Association.
- DOF. (2020). *Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI-/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria*.
- Duan, X., Cheng, S., Ai, Y., & Wu, J. (2016). Enhancing the thermostability of *Serratia plymuthica* sucrose isomerase using B-factor-directed mutagenesis. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149208>
- Evert, A. B., Boucher, J. L., Cypress, M., Dunbar, S. A., Franz, M. J., Mayer-Davis, E. J., Neumiller, J. J., Nwankwo, R., Verdi, C. L., Urbanski, P., & Yancy, W. S. (2014). Nutrition therapy recommendations for the management of adults with

- diabetes. In *Diabetes Care* (Vol. 37, Issue SUPPL.1). American Diabetes Association Inc. <https://doi.org/10.2337/dc14-S120>
- Evert, A. B., Dennison, M., Gardner, C. D., Timothy Garvey, W., Karen Lau, K. H., MacLeod, J., Mitri, J., Pereira, R. F., Rawlings, K., Robinson, S., Saslow, L., Uelmen, S., Urbanski, P. B., & Yancy, W. S. (2019). Nutrition therapy for adults with diabetes or prediabetes: A consensus report. In *Diabetes Care* (Vol. 42, Issue 5, pp. 731–754). American Diabetes Association Inc. <https://doi.org/10.2337/dci19-0014>
- Festing, M. F. W. (2004). The choice of animal model and reduction. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 32(SUPPL. 2), 59–64. <https://doi.org/10.1177/026119290403202s12>
- Greenwood, D. C., Threapleton, D. E., Evans, C. E. L., Cleghorn, C. L., Nykjaer, C., Woodhead, C., & Burley, V. J. (2013). Glycemic index, glycemic load, carbohydrates, and type 2 diabetes: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care*, 36(12), 4166–4171. <https://doi.org/10.2337/dc13-0325>
- Grembecka, M. (2015). Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. In *European Food Research and Technology* (Vol. 241, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2437-7>
- Grenby, T. H. (1997). Dental aspects of the use of sweeteners. In *Pure & Appl. Chem* (Vol. 69, Issue 4).
- Häberer, D., Thibault, L., Langhans, W., & Geary, N. (2009). Beneficial effects on glucose metabolism of chronic feeding of isomaltulose versus sucrose in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 54(1), 75–82. <https://doi.org/10.1159/000207358>
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N., & Mattanovich, D. (2004). Effects of Gene Dosage, Promoters, and Substrates on Unfolded Protein Stress of Recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(4), 367–375. <https://doi.org/10.1002/bit.10904>
- Hutchinson, J. P., Remenyi, T., Nesterenko, P., Farrell, W., Groeber, E., Szucs, R., Dicoski, G., & Haddad, P. R. (2012). Investigation of polar organic solvents compatible with Corona Charged Aerosol Detection and their use for the determination of sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 750, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.04.002>
- Ilggen, C., Lin-Cereghinho, J., & Cregg, J. M. (2005). *Pichia pastoris*, Production of recombinant proteins. In *Novel microbial and eukaryotic expression systems* (pp. 143–162). Colorado State University, CO: John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>



- IMSS. (2015). *GPC Dietoterapia y alimentos paciente con diabetes mellitus*. <http://imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc>
- ISO. (2010). *Food products Determination of the glycaemic index (GI) and recommendation for food classification 26642:2010*.
- Jiang, T., Chen, L., Jia, S., Chen, L., & Ma, Y. (2008). High-level expression and production of human lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Dairy Science and Technology*, 88(2), 173–181. <https://doi.org/10.1051/dst:2007019>
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020a). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 235, Issue 9, pp. 5867–5881). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020b). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 235, Issue 9, pp. 5867–5881). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Kawai, K., Okuda, Y., & Yamashita, K. (1985). *Changes in Blood Glucose and Insulin after an Oral Palatinose Administration in Normal Subjects* (Vol. 32, Issue 6).
- Kobayashi, K. (2000). High-Level Expression of Recombinant Human Serum Albumin from the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris* with Minimal Protease Production and Activation. In *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING* (Vol. 89, Issue 1).
- Kristo, A. S., Matthan, N. R., & Lichtenstein, A. H. (2013). Effect of diets differing in glycemic index and glycemic load on cardiovascular risk factors: Review of randomized controlled-feeding trials. In *Nutrients* (Vol. 5, Issue 4, pp. 1071–1080). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu5041071>
- Lemon, R., & Dunnet, S. (2005). Surveying the literature from animal experiments. *Br Med J*, 390, 977–978. www.acmedsci.ac.uk/p_neurofunc.pdf
- Li P, A. A. G. X. G. I. K. S. V. V. D. N. R. (2007). *User Manual EasySelect™ Pichia Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in Pichia pastoris*. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf
- Lina, B. A. R., Jonker, D., & Koziarowski, G. (2002). *Isomaltulose (Palatinose 1): a review of biological and toxicological studies*. www.elsevier.com/locate/foodchemtox



- Liu, L., Bilal, M., Luo, H., Zhao, Y., & Duan, X. (2021). Studies on Biological Production of Isomaltulose Using Sucrose Isomerase: Current Status and Future Perspectives. *Catalysis Letters*, 151(7), 1868–1881. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03439-x>
- Livesey, G., Taylor, R., Livesey, H. F., Buyken, A. E., Jenkins, D. J. A., Augustin, L. S. A., Sievenpiper, J. L., Barclay, A. W., Liu, S., Wolever, T. M. S., Willett, W. C., Brighenti, F., Salvadó, J. S., Björck, I., Rizkalla, S. W., Riccardi, G., la Vecchia, C., Ceriello, A., Trichopoulou, A., ... Miller, J. C. B. (2019). Dietary glycemic index and load and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and updated meta-analyses of prospective cohort studies. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11061280>
- Loew, F. M. (1982). Developments in the history of the use of animals in medical research. *Scientific Perspectives on Animal Welfare / Edited by W. Jean Dodds, F. Barbara Orlans*. <https://doi.org/10.3/JQUERY-UI.JS>
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. In *Yeast* (Vol. 22, Issue 4, pp. 249–270). <https://doi.org/10.1002/yea.1208>
- Maresch, C. C., Petry, S. F., Theis, S., Bosity-Westphal, A., & Linn, T. (2017). Low glycemic index prototype isomaltulose— Update of clinical trials. In *Nutrients* (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu9040381>
- Mohan, V., Ruchi, V., Gayathri, R., Bai, R., Sudha, V., Anjana, M., & Pradeepa, R. (2016). Slowing the diabetes epidemic in the World Health Organization South-East Asia Region: the role of diet and physical activity. In *WHO South-East Asia Journal of Public Health* (Vol. 5, Issue 1). <http://www.who-seajph.org>
- Mu, W., Li, W., Wang, X., Zhang, T., & Jiang, B. (2014). Current studies on sucrose isomerase and biological isomaltulose production using sucrose isomerase. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 98, Issue 15, pp. 6569–6582). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5816-2>
- Mu, W., Wang, X., Xue, Q., Jiang, B., Zhang, T., & Miao, M. (2012). Characterization of a thermostable glucose isomerase with an acidic pH optimum from *Acidothermus cellulolyticus*. *Food Research International*, 47(2), 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.006>
- Mu, X., Kong, N., Chen, W., Zhang, T., Shen, M., & Yan, W. (2008). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human basic fibroblast growth factor in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 59(2), 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.02.009>
- Navarro-Hernández, J. A., Ramírez-Ojeda, R. A., & Villagrán-Vélez, C. (2012). *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales* (1st ed., Vol. 1). Samsara Editorial.



- Nosedá, D. G., Recúpero, M. N., Blasco, M., Ortiz, G. E., & Galvagno, M. A. (2013). Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter. *Protein Expression and Purification*, 92(2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.018>
- OECD. (2019). *The Heavy Burden of Obesity: The Economics of Prevention*, OECD Health Policy Studies. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/67450d67-en>
- OPS/OMS. (2015). *Alimentos y bebidas ultraprocesados en América Latina-tendencias, efecto sobre la obesidad e implicaciones para las políticas públicas*.
- Pitsch, J., & Weghuber, J. (2019). Hydrophilic interaction chromatography coupled with charged aerosol detection for simultaneous quantitation of carbohydrates, polyols and ions in food and beverages. *Molecules*, 24(23). <https://doi.org/10.3390/molecules24234333>
- Pound, P., Ebrahim, S., Sandercock, P., Bracken, M., & Roberts, I. (2004). *Systematic reviews of animal research*. www.s-a-b-r-e.org
- Radoman, B., Grünwald-Gruber, C., Schmelzer, B., Zavec, D., Gasser, B., Altmann, F., & Mattanovich, D. (2021). The Degree and Length of O-Glycosylation of Recombinant Proteins Produced in *Pichia pastoris* Depends on the Nature of the Protein and the Process Type. *Biotechnology Journal*, 16(3). <https://doi.org/10.1002/biot.202000266>
- Rand SM. (2008, July 31). *Selection of Animal Models*. *Research Animal Methods*. University of Arizona. <https://uac.arizona.edu/VSC443/animalmodels/animalmodels>
- Ravaud, S., Robert, X., Watzlawick, H., Haser, R., Mattes, R., & Aghajari, N. (2007). Trehalulose synthase native and carbohydrate complexed structures provide insights into sucrose isomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 28126–28136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704515200>
- Ravaud, S., Robert, X., Watzlawick, H., Haser, R., Mattes, R., & Aghajari, N. (2009). Structural determinants of product specificity of sucrose isomerases. *FEBS Letters*, 583(12), 1964–1968. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.002>
- Ravaud, S., Watzlawick, H., Haser, R., Mattes, R., & Aghajari, N. (2005). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the trehalulose synthase MutB from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 61(1), 100–103. <https://doi.org/10.1107/S1744309104030623>



- Riccardi, G., Rivellese, A. A., & Giacco, R. (2008). *Role of glycemic index and glycemic load in the healthy state, in prediabetes, and in diabetes 1-5*. <https://academic.oup.com/ajcn/article/87/1/269S/4633416>
- Rubio-Arreaz, S., Ferrer, C., Capella, J. V., Ortolá, M. D., & Castelló, M. L. (2017). Development of Lemon Marmalade Formulated with New Sweeteners (Isomaltulose and Tagatose): Effect on Antioxidant, Rheological and Optical Properties. *Journal of Food Process Engineering*, 40(2). <https://doi.org/10.1111/jfpe.12371>
- Sardiña, J. (2019). *Inmovilización de sacarosa isomerasa recombinante para la conversión a isomaltulosa* [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Sardiña-Peña, A. J., Espinoza-Sánchez, E. A., Flores-Holguín, N. R., Iglesias-Figueroa, B. F., & Rascon-Cruz, Q. (2022). *Thermostability improvement of sucrose isomerase Pall NX-5: a comprehensive strategy*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2066415/v1>
- Schwingshackl, L., & Hoffmann, G. (2013). Long-term effects of low glycemic index/load vs. high glycemic index/load diets on parameters of obesity and obesity-associated risks: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(8), 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2013.04.008>
- Secretaría de Agricultura, D. R. P. y A. (1999). *Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*.
- Secretaría de Salud, I. N. de S. P. y I. N. de E. y Geografía. (2019). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 Presentación de resultados*.
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. In *International Journal of Preventive Medicine* (Vol. 4, Issue 6). www.ijpm.ir
- Shama-Levy T, Romero-Martinez M, Barrientos-Gutiérrez T, Cuevas-Nasu L, Bautista-Arredondo S, Colchero MA, Gaona-Pineda EB, Lazcano-Ponce E, Martínez-Barnetche J, Alpuche-Arana C, & Rivera-Dommarco J. (2022). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales*. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Shyam, S., Ramadas, A., & Chang, S. K. (2018). Isomaltulose: Recent evidence for health benefits. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 48, pp. 173–178). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.002>
- Siddiqui, I. R., & Furgala, B. (1967). Isolation and characterization of oligosaccharides from honey. part i. disaccharides. *Journal of Apicultural Research*, 6(3), 139–145. <https://doi.org/10.1080/00218839.1967.11100174>



- Sinha, J., Plantz, B. A., Zhang, W., Gouthro, M., Schlegel, V., Liu, C. P., & Meagher, M. M. (2003). Improved production of recombinant ovine interferon- τ by Mut⁺ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile. *Biotechnology Progress*, 19(3), 794–802. <https://doi.org/10.1021/bp025744q>
- Takazoe, I. (1985). New trends on sweeteners in Japan. *International Dental Journal*, 35(1), 58–65.
- The Wistar Institute. (2017). *About Wistar*. <https://wistar.org/about-wistar>
- Walter, T., & Marhöfer, S. (2016). (12) United States Patent (45) Date of Patent: (54) (75) (73) (*) (21) (22) (86) (87) (65) (30) (51) (52) (58) ISOMALTULOSE IN FONDANTS S 371 (c)(1), (2), (4) Date: PCT/EP2011ADO6325. www.caloriecontrol.org.
- World Health Organization. (2021). *The role of midwives and nurses in protecting, promoting and supporting breastfeeding: advocacy brief*.
- Xu, Z., Li, S., Li, J., Li, Y., Feng, X., Wang, R., Xu, H., & Zhou, J. (2013). The structural basis of *Erwinia rhapontici* isomaltulose synthase. *PLoS ONE*, 8, 9.
- Yang, S., Kuang, Y., Li, H., Liu, Y., Hui, X., Li, P., Jiang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Xu, A., Li, S., Liu, P., & Wu, D. (2013). Enhanced Production of Recombinant Secretory Proteins in *Pichia pastoris* by Optimizing Kex2 P1' site. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075347>
- Zahrl, R. J., Peña, D. A., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2017). Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. In *FEMS Yeast Research* (Vol. 17, Issue 7). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox068>
- Zeevi, D., Korem, T., Zmora, N., Israeli, D., Rothschild, D., Weinberger, A., Ben-Yacov, O., Lador, D., Avnit-Sagi, T., Lotan-Pompan, M., Suez, J., Mahdi, J. A., Matot, E., Malka, G., Kosower, N., Rein, M., Zilberman-Schapira, G., Dohnalová, L., Pevsner-Fischer, M., ... Segal, E. (2015). Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell*, 163(5), 1079–1094. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.001>
- Zhang, D., Li, N., Lok, S. M., Zhang, L. H., & Swaminathan, K. (2003). Isomaltulose synthase (Pall) of *Klebsiella* sp. LX3: Crystal structure and implication of mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35428–35434. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302616200>
- Zhang, D., Li, X., & Zhang, L. H. (2002). Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: Gene cloning and characterization and engineering of thermostability. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2676–2682. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2676-2682.2002>



- Zheng, Y., Wang, Z., Ji, X., & Sheng, J. (2019). Display of a sucrose isomerase on the cell surface of *Yarrowia lipolytica* for synthesis of isomaltulose from sugar cane by-products. *3 Biotech*, 9(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1713-9>
- Zou, S., Huang, S., Kaleem, I., & Li, C. (2013). N-glycosylation enhances functional and structural stability of recombinant β -glucuronidase expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 164(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.12.015>

XIV. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones

Preparación de medios de cultivo

Medio	Componentes	Concentración (g/L)
YPD	Extracto de levadura	10
	Peptona	20
	Glucosa	20
BMMY	Extracto de levadura	10
	Peptona	20
	YNB	13.4
Antibióticos	Ampicilina	100
	Kanamicina	60
	Zeocina	100

Preparación de buffers

Medio	Componentes	Concentración (g/L)
Fosfatos 1 M pH 6	KH_2PO_4	174.18
	K_2HPO_4	132.08
Citratos 50 mM	Ácido cítrico	9.6
	Citrato de sodio	12.82
Antibióticos	Ácido cítrico	19.22
	Citrato de sodio	25.80

SDS-PAGE

Solución	Componentes	Cantidad
Acrilamida al 30 %	Acrilamida	15 g en 50 mL
	Bisacrilamida	0.4 g en 50 mL
Tris 1.5 M pH 8.9	Tris	18.7 g en 100 mL
Tris 1 M pH 6.8	Tris	12.11 g en 100 mL
SDS al 10%	SDS	2.5 g en mL
Buffer de corrida	Tris	3.03 g en 1000 mL
	Glicina	14.04 g en 1000 mL
	SDS	1 g en 1000 mL
Buffer de carga	Azul de bromofenol	4 mg en 600 μ L de Tris 1 M pH 6.8
	Glicerol	2.5 mL
	SDS	3 mL al 10%
	Agua	1.4 mL
APS	Persulfato de amonio	0.1 g en mL de agua
	β - mercaptoetanol	1:3
Gel separador	Agua	1.6 mL
	Acrilamida al 30 %	2 mL
	Tris 1.5 M pH 8.9	1.30 mL
	SDS al 10%	50 μ L
	APS	50 μ L
	TEMED	2 μ L
Gel concentrador	Agua	2.7 mL
	Acrilamida al 30%	670 μ L
	Tris 1 M pH 6.8	500 μ L
	SDS al 10%	40 μ L
	APS	40 μ L
	TEMED	4 μ L
Solución para teñir	Azul de comassie	0.25 g en 125 mL de metanol
	Ácido acético	25 mL
	Agua	100 mL
Solución para desteñir	Metanol	125 mL
	Ácido acético	25 mL
	Agua	100 mL



Anexo 2. Oficio de aprobación para el protocolo con uso de animales en la investigación científica



BIOTERIO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO CICUAL No. 003/2022
Chihuahua, Chih., 26 de septiembre del 2022

DR. QUINTÍN RASCÓN CRUZ
PRESENTE:

En atención a su protocolo para el uso de los animales en la Investigación científica, en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas, le notificamos que su protocolo que lleva por título “Evaluación del índice glucémico en ratas tratadas con isomaltulosa de origen recombinante” con el estudiante de maestría C. Jesús Noé Aranda De La Rosa ha sido autorizado bajo los siguientes aspectos:

- A) Las personas que tendrán acceso al Bioterio para la realización de su proyecto con un horario de Lunes a Viernes de 8:00 a 16:00 h, son:
C. Jesús Noé Aranda De La Rosa (Estudiante de maestría FCQ-UACH)
Dr. Miguel Ángel Flores Villalobos (Docente e Investigador FCQ-UACH)
- B) El experimento comenzará durante la primera semana de octubre. La fecha de terminación será cuando se complete en su totalidad el protocolo propuesto, el cual tiene previsto durar alrededor de 1 semana. Si fuese necesario más tiempo de alojamiento, esto tendrá que ser notificado y justificado con oficio.
- C) El número total de animales que se le asignarán para este proyecto será de 24 ratas, sexo indistinto, con una edad aproximada de 6 semanas y un peso de 185 g, de especie *Rattus norvegicus*, cepa wistar.
- D) El protocolo autorizado es el siguiente: Evaluar el comportamiento glicémico e insulinémico en las ratas posterior a la administración de sacarosa, isomaltulosa, isomaltulosa de origen recombinante y agua. **Tratamiento:** las ratas serán tratadas mediante sonda orogástrica utilizando cuatro tratamientos (agua, isomaltulosa obtenida de forma recombinante, isomaltulosa comercial y sacarosa) en una sola administración, por un minuto aproximadamente, con cuatro ratas para cada grupo. **Toma sanguínea:** Se tomará una muestra de sangre cada 20 min por dos horas, en un solo día, realizando un corte en la punta de la cola y removiendo el coágulo durante cada toma. En cada extracción se pretende obtener un volumen de sangre total ~100 µL para la prueba ELISA (50-100 µL) y la glucometría (1 µL). Al finalizar el protocolo, los animales serán sacrificados

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>

**BIOTERIO**
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

humanitariamente siguiendo las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999. Finalmente se dispondrá el cadáver según la norma oficial NOM-087-ECOL-SSA1-2002”.

- E) En el momento de que el animal presente algún tipo de sufrimiento deberá interrumpir el experimento, sacrificar al animal y presentar inmediatamente un informe.
- F) Al finalizar deberá entregar una conclusión y expectativas (si se tiene planeado continuar o modificar) de su protocolo, para que en el Bioterio se tenga registro si fue exitoso el tratamiento y poder decidir y argumentar en siguientes experimentos que sean sometidos.
- A) Cualquier otra especificación que se haya omitido se realizará de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

Sin más por el momento y quedando de mutuo acuerdo

ATENTAMENTE

“Por la ciencia para bien del hombre”

Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
(CICUAL)



Dr. Francisco Javier Zavala Díaz de la Serna
Representante de Licenciatura



Dr. Diego Eloy Carballo Carballo
Administrativo de Bioterio



M.C. y M.V.Z. Martín Renato Hernández
Castaños
Responsable de Sanidad Animal



Dr. Jaime Raúl Adame Gallegos
Representante de Investigación



Dr. Pedro Javier Martínez Ramos
Representante de Institución

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>