



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Ingeniería en Nanotecnología

Extracción, purificación, caracterización bioquímica e inmovilización de la enzima sarcosina oxidasa nativa de *Pseudomonas sp* para el futuro desarrollo de dispositivos médicos.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Ingeniería en Nanotecnología

Presenta:

González Olvera Paola

Dirigido por:

Vanessa Vallejo Becerra



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Ingeniería en Nanotecnología

Extracción, purificación, caracterización bioquímica e inmovilización de la enzima sarcosina oxidasa nativa de *Pseudomonas sp* para el futuro desarrollo de dispositivos médicos.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Ingeniería en Nanotecnología

Presenta:

González Olvera Paola

Dirigido por:

Vanessa Vallejo Becerra

SINODALES

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Presidente

Firma

Dra. Alejandra Álvarez López

Sinodal

Firma

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Sinodal

Firma

Dr. Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Sinodal

Firma

Centro Universitario

Querétaro, QRO

México.

Octubre 2021

Dirección General de Bibliotecas UAQ

A mis padres...

Resumen

El monitoreo de biomarcadores específicos es importante debido a que estas moléculas pueden hacer referencia a la presencia de enfermedades, por lo que encontrar métodos de detección se ha convertido en la clave para el cuidado de la salud. El cáncer de próstata (CaP) es una enfermedad que empieza a crecer en la glándula prostática y que en sus etapas iniciales no presenta síntomas específicos. Más del 65% de todos los cánceres de próstata se diagnostican en hombres de más de 65 años. Se ha encontrado que el CaP está ligado con la presencia del biomarcador sarcosina, lo cual ha generado expectativas para su implementación en sistemas de detección en etapas tempranas, debido a la especificidad que tienen algunos biocatalizadores o enzimas a la sarcosina como lo es la sarcosina oxidasa (SOx). Esta enzima puede ser utilizada como bioreceptor en aplicaciones en biosensores, donde la inmovilización de esta biomolécula a diferentes soportes es uno de los puntos clave para el buen desempeño del biosensor. En este trabajo se definen los procesos de inducción de la producción, extracción, purificación e inmovilización de una sarcosina oxidasa producida a partir de *Pseudomonas aeruginosa* para el estudio de sus características bioquímicas para su potencial uso en el desarrollo de electrodos enzimáticos para biosensores electroquímicos. Se utilizaron medios de cultivo enriquecidos con la finalidad de optimizar las condiciones de cultivo y permitiendo obtener una mejor calidad y cantidad de la sarcosina oxidasa. Se logró la extracción de la enzima, llevándola a dos grados de pureza, se realizaron ensayos de la actividad enzimática de sarcosina oxidasa tanto en enzima libre como enzima inmovilizada sobre nanotubos de carbono multipared (MWCNT) con un método de identificación espectrofotométrico indirecto basado en la reacción enzimática de transformar la sarcosina en glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno, cuantificando el formaldehído al seguir el incremento de la absorbancia a 410 nm. La inmovilización proporcionó estabilidad, favoreciendo la actividad ante cambios de pH y temperatura, y se observó una mejora en los parámetros cinéticos.

Palabras clave: sarcosina, cáncer de próstata, biomarcador, enzima.

ABSTRACT

Recent research had found the presence of specific biomarkers in different types of Cancer, these are biomolecules produced as a consequence of an active disease and which can be detected with proper procedures. The growing of Prostate Cancer is related with the presence of Sarcosine, a metabolite that has raised great expectations as a target analyte in biosensing for early Prostate Cancer detection due the selective interaction between Sarcosine and biocatalytic molecules such as the Sarcosine Oxidase (SOx) enzyme.

In this work the process of extraction, purification and immobilization of a native Sarcosine Oxidase from *Pseudomonas Aeruginosa* with the purpose of studying in a deep level its biochemical characteristics for a possible application in Sarcosine Detectors. Enriched culture media were applied varying the conditions of the culture, allowing the procedure to increase the quality and quantity of the enzyme of interest. The process of purification was studied only until the dialysis phase obtaining two purification degrees of the SOx.

Essays of the enzymatic activity were performed with the free and the immobilized enzyme under multi walled carbon nanotubes with the indirect spectrophotometer technique based in the activity that the enzyme exhibits when it transform Sarcosine to glycine, formaldehyde and hydroxide peroxide, quantifying the formaldehyde monitoring the increment of the absorbance in the solution at 410nm. The immobilization prevents the denaturalization of the Sarcosine and improves the activity when it faces pH and temperature changes, it also the affinity between the Sarcosine and the substrate.

Tabla de contenido

Contenido

Tabla de contenido	6
Lista de figuras	7
Lista de tablas	9
1.0.1 Biocatalizadores	10
1.0.2 Sarcosina oxidasa.	13
1.0.3 Biomarcadores	17
1.0.4 Sarcosina como biomarcador de cáncer de próstata.....	22
1.0.5 Cáncer de próstata	23
1.0.6 Métodos de detección actuales.	25
1.0.7 Inmovilización enzimática.....	27
1.0.8 Fuentes y extracción de sarcosina oxidasa	29
1.1 Justificación	35
1.2 Objetivos	37
1.2.1 Objetivo general	37
1.2.2 Objetivos específicos	37
2. Metodología.....	38
2.0.1 Propagación de cepas.....	38
2.0.2 Cinética de crecimiento	38
2.0.3 Ensayo enzimático.....	39
2.0.4 Extracción y purificación de enzima.	40
2.0.5 Caracterización bioquímica y de actividad enzimática.....	41
2.0.6 Funcionalización de los nanotubos de carbono MWCNT.	42
2.0.7 Inmovilización de la enzima MAO-A en MWCNT.....	42
2.0.8 Estudio cinético de acoplamiento de la enzima MAO-A en los MWCNT	44
2.0.9 Caracterización de enzima inmovilizada	44
2.0.10 Determinación de los parámetros cinéticos.	45
3. Resultados y discusión.....	46
3.1.1 Propagación bacteriana.	46
3.1.2 Crecimiento bacteriano y producción enzimática.....	47
3.1.3 Purificación enzimática	50
3.1.4 Estudio de cinética de acoplamiento de la enzima SOx en los nanotubos de carbono multipared.....	55
3.1.5 Evaluación actividad enzimática libre e inmovilizada.	57
3.1.6 Ensayo de inhibición de enzima.....	67
4 Trabajo futuro.	71
5. Conclusión.....	73
6. Bibliografía	75
ANEXOS	82

Lista de figuras

Figura 1. Base nitrogenada flavina en su forma oxidada y reducida (Bioquímica de Laguna, s. f.)	14
Figura 2 (a) Densidad electrónica y pliegue proteico de MSOX. (b) Diagrama de cinta Stereoview de MSOX con los dominios distinguidos por color: azul, el dominio catalítico ; rojo, el dominio de unión a FAD. FAD se muestra en amarillo. (Trickey et al, 1999)	16
Figura 3. Potencial proteico de superficie y medio ambiente de FAD. (a) Un dibujo de la superficie molecular de MSOX nativo coloreado de acuerdo con el potencial electrostático (azul, positivo; rojo, negativo), que muestra la hendidura del sitio activo . (b) Un gráfico estéreo del entorno flavin. (Trickey et al, 1999).....	16
Figura 4. Efecto del pH sobre la actividad de diversos enzimas (Tena et al, s.f.).....	33
Figura 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, se muestra la respuesta de la actividad enzimática (velocidad de reacción) a la temperatura (Tena et al, s.f.).....	34
Figura 6. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. Curva de saturación hiperbólica por el sustrato.	35
Figura 7. Mecanismo de integración de proteínas con nanotubos de carbono empleando EDC en presencia de NHS. Modificado de Gao y Kyratzis, 2008.....	43
Figura 8. Colonias nativas de <i>Pseudomonas sp.</i> Febrero 2019	46
Figura 9. Colonias nativas de <i>pseudomonas sp.</i> Sep 2019	47
Figura 10. Cinética de crecimiento bacteriano	48
Figura 11. Cinética de producción enzimática	49
Figura 12. Actividad específica de sarcosina oxidasa.....	50
Figura 13. Sistema de diálisis mantenido en condiciones 4°C y agitación constante.	51
Figura 14. Muestra antes de diálisis (izquierda) y después de dializar (derecha)	52
Figura 15. Revelado SDS-PAGE con tinción azul de Coomassie. En carril 1 contiene marcador de peso molecular, carril 2: muestra de enzima sarcosina oxidasa (SOx) 1mg/ml, carril3: muestra de enzima comercial (SOx) 1U/ml (aproximadamente 0.15 µg depositados en el pozo), carril 4 muestra de extracto crudo (sobrenadante recuperado de medio de cultivo), carril 5, 6 y 7 contienen muestra de extracto dializado.	54
Figura 16. Revelado SDS-PAGE con tinción de plata. En banda 1 contiene marcador de peso molecular, banda 2: muestra de enzima sarcosina oxidasa (SOx) 1mg/ml, banda 3: muestra de enzima comercial (SOx) 1U/ml (aproximadamente 0.15 µg depositados en el pozo), banda 4 muestra de extracto crudo (sobrenadante recuperado de medio de cultivo), banda 5, 6 y 7 contienen muestra de extracto dializado. En el carril 10 se adiciono una muestra del cultivo de bacteria.	55
Figura 17. Representación gráfica de la cinética de acoplamiento de la enzima SOx en los MWCNT, mediante unión covalente mediada por EDC.	56
Figura 18. Comparación del efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidasa comercial y purificada.	58
Figura 19. Comparación de efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidas comercial y purificada inmovilizadas en nanotubos de carbono.	59
Figura 20. Comparación de efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidas purificada libre e inmovilizada en nanotubos de carbono.....	60
Figura 21. Comparación del efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidasa comercial y purificada.	62
Figura 22. Comparación de efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidas comercial y purificada	

inmovilizadas en nanotubos de carbono.	62
Figura 23. Comparación de efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidas purificada libre e inmovilizada en nanotubos de carbono.....	63
Figura 24. Parámetros cinéticos de sarcosina oxidasa pH 8.3, 37°C en diferentes condiciones.	67
Figura 25. Comparación de actividad enzimática en presencia de diferentes componentes de la orina.	70

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Lista de tablas

Tabla 1. Principales causas de mortalidad de hombres a escala nacional, 2017.	24
Tabla 2. Precios del Antígeno Prostático Específico (PSA).....	27
Tabla 3. Cuadro de purificación enzimática sarcosina oxidasa.....	52
Tabla 4. Constante de Michaelis (Km) para sarcosina oxidasa de diferentes organismos y condiciones.	63
Tabla 5. Parámetros cinéticos de sarcosina oxidasa pH 8.3, 37°C en diferentes condiciones.....	65
Tabla 6. Componentes de orina	67

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1. Introducción

Los avances en genómica, proteómica y patología molecular han generado interés en biomarcadores candidatos con potencial valor clínico. Su uso para la estadificación del cáncer y la personalización de terapias en el momento del diagnóstico es uno de los principales objetivos (Henry & Hayes, 2012). Una alternativa creciente, es el uso de biocatalizadores para la detección de biomarcadores.

1.0.1 Biocatalizadores

Nuevos procesos están siendo desarrollados para manufacturar productos de alto valor usando enzimas como biocatalizadores. Las enzimas son usadas también con propósitos de análisis y diagnóstico médico. La fuerza impulsora en el desarrollo de la tecnología enzimática, tanto en academia como en industria han sido y seguirán siendo:

- ✓ el desarrollo de nuevos y mejores productos, procesos y servicios para suplir necesidades, y/o
- ✓ el mejoramiento de procesos de producción de productos existentes de nuevos materiales.

El objetivo de estos esfuerzos es el desarrollo de productos innovadores y procesos que no son solo competitivos sino también tienen criterio de sustentabilidad. (Buxman, 2015)

Los biocatalizadores son moléculas de origen proteico ~~proteínas~~ (enzimas) En la actualidad, se conoce que las enzimas son necesarias en todos los sistemas vivos para catalizar todas las reacciones químicas vitales para mantener la vida, de forma rápida, selectiva y eficiente. Todavía más relevante, ha sido demostrado que las enzimas pueden en efecto ser usadas como catalizadores fuera del sistema celular vivo, existen varios procesos en los cuales ellas son aplicadas como biocatalizadores han sido patentados. (Buxman, 2015).

Algunas patentes recientes describen diferentes procedimientos hidrolíticos estereoselectivos que aprovechan la capacidad enzimática de discriminar entre enantiómeros. Por ejemplo, una patente de Zhejiang Changming Pharmaceutical Co., Ltd., concedida en 2018, describe la preparación del fármaco antiepiléptico levetiracetam (Keppra®, Elepsia®) a partir de metil 2-bromo (cloro) racémico. butanoato, utilizando Novozym 435, una preparación comercial de lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en Lewatit VP OC 1600, una resina polimérica acrílica macroporosa. (de María et al, 2019)

Se ha informado de la identificación de nuevas enzimas en el área de síntesis de biocombustible. Por ejemplo, una monoacilglicerol lipasa específica de la planta *Arabidopsis thaliana*, clonada y expresada en *E. coli*, ha encontrado aplicaciones para la síntesis de biocombustibles y otros biomateriales –patente 101730078B1 KR- (Chung et al, 2017). En un ámbito diferente, otro ejemplo es la producción de biodiesel mediante el uso de una lipasa recombinante de *Candida rugosa* expresada en *P. pastoris*, que permite el desarrollo de cultivos de alta densidad, reduciendo los costos de producción de la lipasa –patente 9970035B2, U.S.-. Además de sistemas de inmovilización que pueden conducir a mejores derivados enzimáticos para la producción de biodiesel (Guan- Chuin et al, 2018).

En el área biomédica, se han patentado sensores para la detección de analitos ligados a enfermedades basados en la acción enzimática; el producto comercial es de i-Stat Corporation (Kanata, Ontario, Canadá). Una patente estadounidense cubre este producto (patente de EE.UU. 5.554.339) Describe un sensor de base amperométrica fabricado sobre un sustrato de silicio plano por medio de fotolitografía en combinación con la deposición en plasma de sustancias metálicas. Las sustancias metálicas incluyen el metal iridio (utilizado como electrodo de trabajo) y el metal plateado (que sirve como electrodo de referencia junto con la plata cloridizada resultante). Se inmovilizan tres enzimas (creatinina amidohidrolasa creatinamidinohidrolasa y sarcosina oxidasa) sobre los electrodos como una estructura superpuesta. (*Justia Patents Search*, 2006)

Las enzimas tienen excelentes propiedades que las vuelven muy atractivas, por ejemplo, pueden ser usadas como biocatalizadores ya sea de forma aislada o como sistemas de enzimas en organismos vivos para catalizar reacciones químicas a nivel industrial de forma sostenible. En los últimos 50 años ha habido un rápido incremento en el conocimiento de enzimas así como en su biosíntesis y biología molecular, lo cual ha permitido un uso racional como biocatalizadores en muchos procesos, además su modificación y optimización para nuevos esquemas de síntesis y la solución para problemas analíticos (como en el área clínica). Los biocatalizadores son macromoléculas con estructuras altamente sofisticadas, esenciales para su función y notablemente para su regio-, quimio- y enantioselectividad. (Buxman, 2015)

Las enzimas son biocatalizadores que pueden aumentar la velocidad de una reacción en varios órdenes de magnitud. No influyen en el equilibrio, porque aceleran tanto la reacción hacia adelante como hacia atrás (Buchholz et al, 2012).

Mecanismo enzimático

El químico alemán Emil Fischer había sugerido en 1894 que la especificidad de enzimas era el resultado de un sitio de unión en la enzima, en el que encajaba el sustrato como una llave en una cerradura (hipótesis de cerradura y llave). Linus Pauling propuso en 1948 que las enzimas actúan estabilizando el estado de transición del sustrato. Delaware Koshland se dio cuenta en 1959 de que el sitio de unión del sustrato no estaba preformado, pero que durante la unión del sustrato a la enzima, esta cambia su conformación para adaptarse a la molécula del sustrato (hipótesis de ajuste inducido). Así, podría explicar, por ejemplo, que en algunos enzimas con dos sustratos, el segundo sustrato se une solo después del primero (Buchholz et al, 2012).

La existencia real del complejo enzima-sustrato fue demostrada por B. Chance en 1943 cuando midió los cambios en el espectro de absorción del grupo hæme en peroxidasa después de la unión de peróxido de hidrógeno (Buchholz et al, 2012).

Los biocatalizadores han sido ampliamente aceptados en diversos sectores debido a su facilidad de producción, especificidad de sustratos y química verde (Datta et al 2013). Aunque las enzimas son catalizadores biológicos naturales que llevan a cabo los procesos bioquímicos y desarrollan sus

funciones en un medio compatible con la vida, como agua y membranas lipídicas, estos catalizadores también se pueden utilizar para acelerar reacciones químicas fuera de su ámbito biológico debido a que son altamente selectivas, funcionan adecuadamente en condiciones de reacción suaves y, por su naturaleza proteica, son amigables con el ambiente. Sus propiedades se pueden ajustar mediante la selección adecuada del medio de reacción, por inmovilización en soportes sólidos y por técnicas de diseño de proteínas y evolución dirigida. La inclusión de procesos catalizados por enzimas en las industrias química y farmacéutica está avanzando, beneficiándose no sólo en el costo de los productos, sino en la generación de procesos más limpios y amigables con el ambiente. (Montiel Bustos, 2014).

Las enzimas son, de forma natural, un recurso renovable. Se pueden producir en distintos organismos y esta producción, a su vez, requiere únicamente materiales renovables. Presentan una alta especificidad por sus sustratos. Esto les permite no sólo seleccionar a la molécula correcta entre otras de distinta naturaleza, sino también entre moléculas de idéntica naturaleza, como son los enantiómeros. Estos son sustancias con idénticas composiciones y estructuras, pero que se comportan como imágenes especulares que no se pueden superponer (Montiel Bustos, 2014).

El empleo de catalizadores selectivos permite la separación y reutilización de materiales distintos al sustrato de la reacción, incluidos en las materias primas. Las enzimas se pueden usar durante varios ciclos de un proceso, siempre que se cuente con los métodos adecuados para recuperarlas. Estos procesos generalmente requieren la inmovilización de la enzima en un soporte sólido de fácil separación (Montiel Bustos, 2014). La alta selectividad y la sensibilidad de los métodos enzimáticos permite el empleo de estas moléculas en la fabricación de biosensores que facilitan el monitoreo de los procesos químicos en tiempo real (Montiel Bustos, 2014).

1.0.2 Sarcosina oxidasa.

La sarcosina oxidasa (SOX) es una flavoenzima que cataliza la desmetilación oxidativa de la sarcosina a glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Aunque la

determinación directa de la sarcosina puede ser difícil, esta reacción enzimática puede realizar una cuantificación indirecta. (Yamkamon et al., 2108) SOX contiene flavina unida covalentemente y cataliza reacciones de oxidación similares con sustratos de amina. Los estudios con varios análogos de sarcosina sugieren fuertemente que SOX se une a los aminoácidos en su forma zwitteriónica y que el grupo carboxilato es esencial para la unión. Los grupos amino y metilo en la sarcosina no son esenciales pero contribuyen a la afinidad de unión. (Wagner & Schuman, 1997). La flavina (7,8-dimetil-isoaloxazina) es una base nitrogenada cuya cadena principal es una sustancia heterocíclica nitrogenada de tres anillos y dos grupos oxo, conocida como isoaloxazina. Los nucleótidos de flavina intervienen en muchas reacciones metabólicas de oxido-reducción por transferencia de hidrógeno (deshidrogenación). Esto es posible gracias a su capacidad de reducirse captando hidrógeno en sus nitrógenos 1 y 5 (reacción de adición) (Burton et al., 2012).

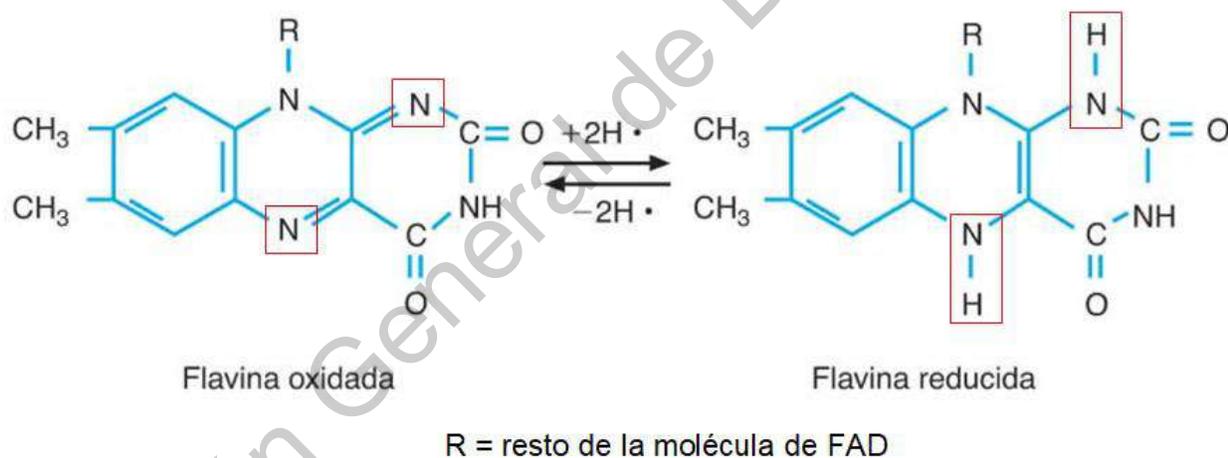


Figura 1. Base nitrogenada flavina en su forma oxidada y reducida (Bioquímica de Laguna, s. f.)

La utilización de la sarcosina oxidasa altamente específica elimina interferencias causadas por la presencia de alanina, metabolito muy similar en características a la sarcosina que puede ocasionar falsos positivos o negativos en técnicas de identificación con cromatografía avanzada o espectroscopia de masas, además de que el costo es más barato comparado con dichas técnicas y la identificación de la sarcosina en orina o sangre se puede realizar sin que el medio o matriz afecte en los resultados (Burton et al., 2012).

Las sarcosina oxidasas monoméricas (MSOX) se encuentran entre los miembros más simples de una familia recientemente reconocida de enzimas procariotas y eucarióticas que contienen flavina unida covalentemente y catalizan reacciones de oxidación similares con varios aminoácidos secundarios o terciarios. M Eschenbrenner y MSJ; P Khanna y MSJ. Otras enzimas de esta familia incluyen sarcosina oxidasas heterotetraméricas (TSOX), N-metilriptófano oxidasa (MTOX) y pipecolato oxidasa (PIPOX). La dimetilglicina deshidrogenasa (DMGDH) y la sarcosina deshidrogenasa (SDH) pueden ser familiares más lejanos. Excepto TSOX, todos son enzimas monoméricas. MSOX comparte ~40% de identidad de secuencia con MTOX y ~30% de identidad con PIPOX, MSOX y TSOX se inducen en varios microorganismos del suelo al crecer con sarcosina como fuente de carbono y energía (Trickey et al, 1999).

La naturaleza del entorno del anillo de flavina en MSOX es sumamente básica, algo inusual entre las flavoproteínas que puede causar un cambio positivo en el potencial redox de flavina. Aunque todavía no se ha medido directamente, es probable que el potencial redox de la flavina en MSOX sea alto porque se puede reducir con tioles, una característica observada con flavinas de alto potencial en estudios modelo. En la Figura 2.a se muestra la densidad electrónica y pliegue proteico de MSOX., Figura 2.b distingue los dominios de sarcosina oxidasa por color: azul, el dominio catalítico; rojo, el dominio de unión a FAD. FAD se muestra en amarillo. La Figura 3.a indica en la superficie molecular de MSOX nativo su potencial electrostático coloreado (azul, positivo; rojo, negativo), que muestra la hendidura del sitio activo. En Figura 3.b se representa el entorno flavin. (Trickey et al, 1999)

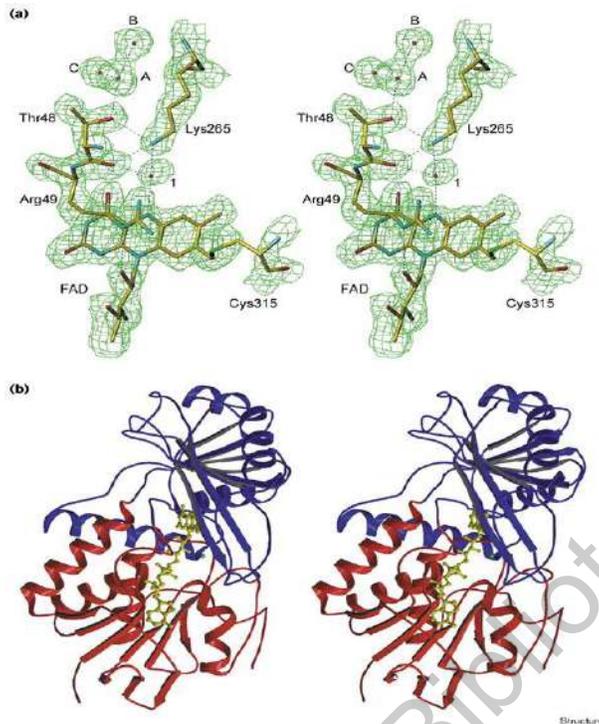


Figura 2 (a) Densidad electrónica y pliegue proteico de MSOX. (b) Diagrama de cinta Stereoview de MSOX con los dominios distinguidos por color: azul, el dominio catalítico ; rojo, el dominio de unión a FAD. FAD se muestra en amarillo. (Trickey et al, 1999)

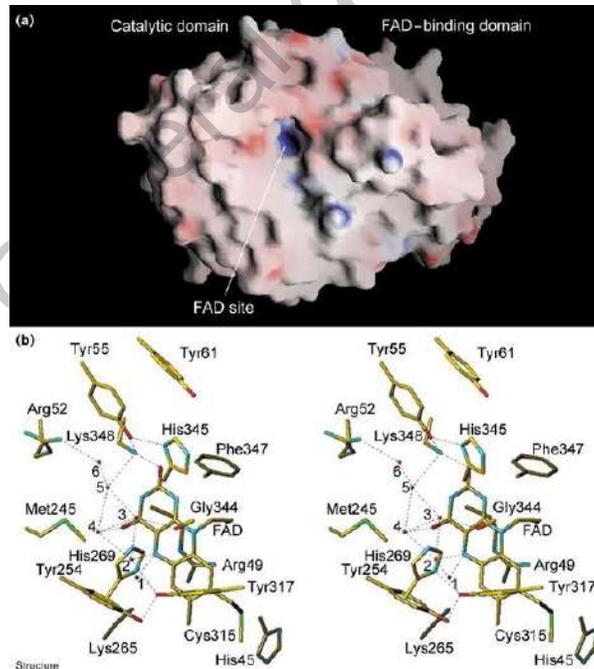


Figura 3. Potencial proteico de superficie y medio ambiente de FAD. (a) Un dibujo de la superficie molecular de MSOX nativo coloreado de acuerdo con el potencial electrostático (azul, positivo; rojo, negativo), que muestra la hendidura del sitio activo . (b) Un gráfico estéreo del entorno flavin. (Trickey et al, 1999)

Estructuras unidas a inhibidores

El ácido (metililo) acético (MTA) y el ácido pirrol-2-carboxílico (PCA) son inhibidores competitivos de MSOX ($K_d = 2,6$ mM y 1,3 mM, respectivamente). Ambos inhibidores también forman especies de transferencia de carga con MSOX, presumiblemente debido a la proximidad del azufre rico en electrones de MTA o el anillo pirrol conjugado de PCA al anillo flavina aceptor de electrones (Trickey et al, 1999).

1.0.3 Biomarcadores

De acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer, un biomarcador es “una molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros fluidos corporales o tejidos que es un signo de un proceso normal o anormal, o de una afección o enfermedad” (NCI) como el cáncer (Henry & Hayes, 2012).

Al poder ser detectados en la circulación (sangre total, suero o plasma), excreciones o secreciones (heces, orina, esputo o secreción del pezón), por lo tanto, pueden ser evaluados fácilmente de forma no invasiva y en serie. Pueden usarse para la evaluación del paciente en múltiples entornos clínicos, incluida la estimación del riesgo de enfermedad, la detección de cánceres primarios ocultos, la distinción entre los hallazgos benignos y los malignos o un tipo de malignidad de otro, la determinación del pronóstico y la predicción para los pacientes diagnosticados con cáncer así como monitorear el estado de la enfermedad, ya sea para detectar la recurrencia o determinar la respuesta o la progresión a la terapia. (Ludwig & Weinstein, 2005)

Los biomarcadores del cáncer cubren una amplia gama de entidades bioquímicas, como ácidos nucleicos, proteínas, azúcares y metabolitos pequeños, parámetros citogenéticos y citocinéticos, así como células tumorales completas que se encuentran en el fluido corporal. Se pueden usar para la evaluación de riesgos, diagnóstico, pronóstico, predicción de la eficacia y toxicidad del tratamiento y recurrencia (Wu et al, 2015). En general, los biomarcadores de proteínas se han detectado utilizando inmunoensayos convencionales. Los métodos de detección de inmunoensayos convencionales para biomarcadores de cáncer son el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), fluorescencia,

quimioluminiscencia electroforéticos e inmuniensayos espectrometricos de masas. Sin embargo, los inmunoensayos convencionales son complicados, requieren mucho tiempo, son tediosos, caros, requieren mucha mano de obra y son inadecuados para las aplicaciones de puntos de atención. Por lo tanto, existe una necesidad real de métodos simples, rápidos, sensibles y económicos para la medición de proteínas para aplicaciones de puntos de atención e investigación (Begard et al, 2015).

Los biomarcadores suelen diferenciar a un paciente afectado de una persona sin la enfermedad. Las alteraciones pueden deberse a varios factores, que incluyen mutaciones somáticas o de la línea germinal, cambios transcripcionales y modificaciones postraduccionales. Un biomarcador también puede ser una colección de alteraciones, como la expresión génica, las firmas proteómicas y metabolómicas. (Henry & Hayes, 2012).

Posibles usos clínicos de los biomarcadores

Los biomarcadores se pueden utilizar para la evaluación del paciente en múltiples entornos clínicos, incluida la estimación del riesgo de enfermedad, la detección de cánceres primarios ocultos, la distinción de hallazgos benignos de malignos o un tipo de malignidad de otro, la determinación del pronóstico y la predicción para pacientes a los que se les ha diagnosticado cáncer y monitorear el estado de la enfermedad, ya sea para detectar la recurrencia o determinar la respuesta o progresión a la terapia. Es importante destacar que algunos biomarcadores solo se usan en una configuración específica, mientras que otros pueden servir para más de un propósito. (Henry & Hayes, 2012).

La determinación del riesgo de un paciente de desarrollar una neoplasia maligna es útil si se ha demostrado que las estrategias de reducción del riesgo (como cambios en el estilo de vida, cirugía profiláctica o quimioprevención) o los exámenes de detección son eficaces. La aplicación de estas estrategias a los grupos de alto riesgo es mucho más eficaz que la aplicación al por mayor a toda la población. Se han identificado biomarcadores que pueden usarse para determinar el riesgo de que una persona desarrolle cáncer. Por ejemplo, una mujer con un fuerte

historial familiar de cáncer de ovario puede someterse a pruebas genéticas para determinar si es portadora de una mutación de la línea germinal, como BRCA1, que aumentará su riesgo de desarrollar cáncer de mama y / o de ovario (Easton et al., 1995). De ser así, podría optar por un cribado más intensivo, quimioprevención con tamoxifeno o mastectomía bilateral profiláctica y / o salpingooforectomía orbilateral para disminuir su riesgo de desarrollar una neoplasia maligna. (Henry & Hayes, 2012).

Los biomarcadores se pueden utilizar para detectar malignidad en pacientes que de otro modo serían sanos. Un biomarcador de uso común pero controvertido para la detección es el antígeno prostático específico (PSA). Tras su aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos en 1986, el aumento de la detección de hombres mayores de 50 años condujo a un aumento en el diagnóstico de cáncer de próstata, pero se plantearon preocupaciones sobre el sobret ratamiento. El análisis más reciente del Grupo de Trabajo de Servicios Preventivos de EE. UU. Encontró pruebas insuficientes para la detección de rutina con PSA (Henry & Hayes, 2012).

En un paciente con una anomalía, también se pueden utilizar biomarcadores para distinguir entre las diferentes posibilidades que se encuentran en el diagnóstico diferencial. Por ejemplo, si se encuentra que un paciente tiene un nódulo pulmonar en una tomografía computarizada de tórax, la evaluación histológica de la muestra de biopsia puede determinar si el tejido es cáncer, infección, inflamación u otro proceso benigno. Si se detecta cáncer, se puede utilizar una evaluación adicional con marcadores inmunohistoquímicos específicos para tratar de identificar el tejido de origen. En pacientes a los que se les ha diagnosticado un cáncer, los biomarcadores pueden ayudar a determinar el pronóstico o la probabilidad de recurrencia de la enfermedad independientemente del tratamiento. Tradicionalmente, las características clinicopatológicas de un tumor se han utilizado para determinar el pronóstico.

Recientemente, se están utilizando nuevas tecnologías para evaluar el pronóstico de tumores individuales. Por ejemplo, en el cáncer de mama, se han desarrollado una serie de firmas de expresión génica que se pueden utilizar para estimar el pronóstico de un paciente individual en

función de la evaluación del tumor. (Paik et al., 2004; van't Veer et al., 2005). En el contexto del cáncer de mama metastásico, se ha demostrado que las células tumorales circulantes son un pronóstico para la supervivencia general (Cristofanilli et al., 2004). Su utilidad para predecir la respuesta a la terapia paliativa aún no se ha establecido y es el foco de un ensayo grupal cooperativo en curso. (Henry & Hayes, 2012).

Los biomarcadores también se pueden utilizar como modificadores de la respuesta, o “factores predictivos”, para una terapia específica o para determinar qué terapia es probable que sea más efectiva. En el cáncer colorrectal, KRAS es un biomarcador predictivo, porque las mutaciones somáticas en KRAS se asocian con una respuesta deficiente a las terapias dirigidas contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Allegra et al., 2009).

En pacientes que han completado la terapia adyuvante, se pueden usar biomarcadores para detectar la recurrencia temprana de la enfermedad, antes de que los pacientes se vuelvan sintomáticos. Por ejemplo, el CEA (antígeno carcinoembrionario por sus siglas en inglés) se monitoriza en serie después del tratamiento adyuvante para el cáncer de colon con el objetivo de detectar metástasis hepáticas cuando aún son resecables y potencialmente curables (Locker et al., 2006).

Los biomarcadores también se pueden usar para monitorear la respuesta al tratamiento en el contexto metastásico. Los marcadores de tumores de proteínas solubles circulantes como CEA, PSA, CA125, los antígenos MUC-1 CA15-3 y CA27.29 y CA19-9 se recomiendan para controlar la respuesta a la terapia paliativa en metástasis colorrectal, prostático, ovárico y mamario. y cánceres de páncreas, respectivamente (Harris et al., 2007; Locker et al., 2006). No está claro el papel de la monitorización de estos antígenos para detectar recurrencias ocultas en pacientes que están libres de enfermedad después de la cirugía y durante o después de la terapia adyuvante. El PSA y el CA125 se controlan comúnmente en pacientes con cáncer de próstata y ovario que están libres de enfermedad, pero hay poca evidencia de que hacerlo mejora los resultados y, de hecho, los resultados de un ensayo aleatorizado prospectivo refutan cualquier beneficio en este último (Rustin et al, 2010).

Identificación de un biomarcador potencial

Los biomarcadores potenciales se pueden identificar a través de múltiples enfoques. El enfoque clásico ha sido identificar biomarcadores candidatos basándose en la biología del tumor y el entorno circundante, o el metabolismo del agente farmacéutico. Con la adquisición de nuevos conocimientos sobre tumores y el advenimiento de nuevas tecnologías, la identificación de biomarcadores se realiza con frecuencia utilizando un enfoque de "descubrimiento", utilizando técnicas como secuenciación de alto rendimiento, matrices de expresión génica y espectroscopia de masas para identificar rápidamente a individuos o grupos de biomarcadores que difieren entre cohortes. La gran cantidad de datos generados con estas técnicas significa que se debe prestar especial atención al diseño del estudio y al análisis de los datos, con el fin de minimizar la posibilidad de identificar asociaciones que posteriormente se determinen como falsos positivos. Los aspectos clave del desarrollo de biomarcadores que se discutirán en detalle incluyen un diseño de estudio cuidadoso para evitar sesgos, pruebas y validaciones integrales y un informe preciso de los resultados (Henry & Hayes, 2012).

Elección de un biomarcador candidato

Hay una serie de obstáculos que un biomarcador potencial debe superar antes de que pueda aplicarse en la clínica. En primer lugar, se analiza una cohorte de muestras para probar un nuevo biomarcador potencial específico o para intentar descubrir un nuevo biomarcador. Las pruebas posteriores implican el análisis de una cohorte de muestra independiente para validar los hallazgos originales que generaron la hipótesis, y la evaluación adicional para confirmar que el nuevo biomarcador proporcionará información adicional que es útil para la toma de decisiones clínicas. Estos conceptos se han denominado validez analítica, validez clínica, y utilidad clínica (Henry & Hayes, 2012).

Cada tipo de célula tiene una firma molecular única, denominados biomarcadores, que tienen características identificables tales como niveles o actividades (las habilidades de genes o

proteínas para realizar sus funciones) de un gran cantidad de genes, proteínas u otras características moleculares. Los biomarcadores son, por tanto, una medida objetiva o evaluación de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica; esto incluye todos los diagnósticos pruebas, tecnologías de imagen y cualquier otro objetivo del estado de salud de una persona.. Estos también pueden facilitar una definición molecular de enfermedades, proporcionar información sobre el curso de la enfermedad y predecir la respuesta a terapias (Bhatt et al, 2010) al monitorear cambios en su nivel o actividad.

1.0.4 Sarcosina como biomarcador de cáncer de próstata.

La sarcosina es un aminoácido no proteínogénico que se presenta como un producto intermedio en la síntesis y degradación del aminoácido glicina que se ha identificado como un metabolito que aumenta considerablemente durante la progresión del cáncer de próstata y el proceso metastásico. De acuerdo con la base de datos de Web of Knowledge, existe una incidencia cada vez mayor de sarcosina como palabra clave en motores de búsqueda, así como un número creciente de citas desde 2009. Este fenómeno confirma un interés creciente en la sarcosina como un marcador potencial de cáncer de próstata (Heger et al, 2013).

El hecho de que la sarcosina se presente en concentraciones insignificantes en fluidos de las personas (hasta $1.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$ en sangre e indetectable en orina) de personas sanas es crítico para su evaluación del marcador potencial de cáncer de próstata. Este fenómeno reduce el riesgo de resultados falsos positivos y falsos negativos (Heger et al, 2013).

La cuantificación precisa de una molécula tan pequeña como lo es la sarcosina en una matriz compleja requiere de métodos de detección igualmente complejos (ejemplo: cromatografía líquida acoplada con espectroscopia de masas), que precisan de personal calificado para la operación de los equipos como para la preparación de muestras y que repercuten en un costo significativo que lo hacen inalcanzables para un espectro amplio de población (Burton et al., 2012)

Diseñar un método de detección enzimático eficiente requiere de conocer a fondo las características bioquímicas de la enzima y de su papel catabólico, en ese sentido es esencial la obtención, purificación, inmovilización y caracterización bioquímica de la enzima que proporcione la información para poder diseñar un elemento sensor confiable que permita detectar los niveles de concentración del analito de interés sobre matrices complejas como fluidos corporales. (Narwal, 2018)

Gracias a la aplicación de sarcosina como marcador tumoral, se están buscando y desarrollando métodos analíticos de bajo costo para su determinación en muestras de orina, tejido y plasma sanguíneo. El descubrimiento de que la sarcosina no se produce en la orina de pacientes sanos en niveles detectables y la necesidad de eliminar resultados negativos es muy importante para desarrollar métodos analíticos de bajo costo, rápidos y confiables. (Heger et al, 2013).

1.0.5 Cáncer de próstata

A nivel mundial el cáncer de próstata es la segunda causa de muerte en hombres después del cáncer de pulmón, y en general el quinto cáncer más común. En el año 2018 se presentaron 18 millones de casos de cáncer de próstata en el mundo, de los cuales 190 mil casos se registraron en México. La Organización mundial de la salud (OMS) calcula que 1 de cada 6 hombres tendrá cáncer de próstata en algún momento en su vida el cual tiene una tasa de mortalidad de 13 defunciones por cada 100, 000 hombres. Globocan (Global Cancer Observatory) pronostica 25 mil casos nuevos cada año en México (Instituto Nacional de Cancerología, s. f.).

La prevención es vital para detectar enfermedades con el objeto de evitarlas o descubrirlas a tiempo y así impedir que se vuelvan crónicas y padecerlas por el resto de la vida o incluso sufrir una muerte prematura. Lo anterior forma parte de la cultura sobre el cuidado de la salud. De acuerdo con la Encuesta Intercensal 2015 del Instituto Nacional de Estadística y Geografía, (INEGI), en México había una población de 119.5 millones, de la cual 48.6% eran hombres y 51.4% mujeres.

(94.4 hombres por cada 100 mujeres). La esperanza de vida del género masculino es menor comparada con la femenina. En 2017 se estimó en 77.9 años para la mujeres y 72.9 en hombres, es decir, una diferencia de cinco años, según las Proyecciones del Consejo Nacional de Población (Conapo). PROFECO. (2019).

Si bien, para ambos sexos prevenir las enfermedades graves sigue siendo un reto muy importante, en la actualidad el acceso a la información en materia de salud a través de campañas de prevención o información disponible, ha permitido la detección precoz de enfermedades como el cáncer de próstata y mejorado el pronóstico y la supervivencia de muchos hombres. De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), en México el cáncer de próstata es el tipo de cáncer más mortífero entre los hombres (9.8 muertes por cada 100 mil hombres) PROFECO. (2019).

El mismo comportamiento se observa en América Latina que como región, registra 413,000 nuevos casos y 85,000 muertes cada año. Los países del Caribe, especialmente Barbados, Trinidad y Tobago y Jamaica tienen las tasas de cáncer de próstata más altas en la región. Según datos de Mortalidad de INEGI, en 2017 las defunciones en hombres en México alcanzaron la cifra de 394,322, las principales causas fueron las enfermedades del corazón, tumores malignos y diabetes mellitus. Dentro de los tumores malignos, el de próstata fue el que más decesos ocasionó (Ver Tabla 1) PROFECO. (2019).

Tabla 1. Principales causas de mortalidad de hombres a escala nacional, 2017.

Causa	Defunciones
Enfermedades del corazón (Excluye paro cardiaco)	75,256
Diabetes mellitus	41,088
Tumores malignos	
-de la próstata (6,676)	
-de la traquea, de los bronquios y del pulmón (4,337)	41,0888
-del estómago (3,377)	
Las demás causas	225,669

Total	394,322
--------------	---------

Fuente: Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Mortalidad

Del total de defunciones por tumor maligno de próstata (6,676), 89% se dieron en hombres de 65 años y más, según datos e INEGI.

De acuerdo con Consumer Eroski, revista española sobre temas de consumo, a partir de los 40 años el hombre puede tener problemas prostáticos; a los 50 años más de la mitad presentan síntomas y por encima de los 80 años afectan al 90%. Las enfermedades más frecuentes que pueden afectar a la próstata, de acuerdo con la Sociedad Mexicana de Urología Colegio de Profesionistas, A.C son prostatitis, prostatodinia, hiperplasia prostática (HPB) y cáncer de próstata. PROFECO. (2019).

Además, de acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) la probabilidad de desarrollar cáncer de la próstata se debe a factores modificables y no modificables como:

No modificables:

- Edad. Después de los 50 años aumenta la posibilidad de desarrollar cáncer de próstata. Los hombres que tienen 45 años de edad o más tienen un riesgo mayor. Dos de tres casos se detectan en mayores de 65 años.
- Historial familiar. Si tu padre o un hermano ha tenido cáncer de la próstata, el riesgo aumenta hasta 30%.

Modificables

- Alimentación. Comer alimentos altos en grasa con poco consumo de frutas y verduras puede aumentar el riesgo. Además, beber alcohol y fumar.
- Estilos de vida. Poca actividad física (sedentarismo) y la obesidad. PROFECO. (2019).

1.0.6 Métodos de detección actuales.

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la detección precoz sigue siendo

la piedra angular del control de diferentes enfermedades, y el cáncer de próstata también, toda vez que mejora el pronóstico y la supervivencia.

Existen dos métodos de detección temprana:

- El conocimiento de los primeros signos y síntomas de la enfermedad.
- La realización del tacto rectal y la prueba del antígeno prostático específico para detectar anomalías

De acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología, los métodos de detección de esta enfermedad en una etapa temprana son los siguientes:

- **Prueba Sanguínea de Antígeno Prostático (PSA):** Es una sustancia producida en la próstata tanto por las células normales como por las cancerosas. La probabilidad de tener cáncer de próstata aumenta a medida que el nivel de PSA sube.
- **Examen digital del recto:** El primer control lo proporciona la visita clínica con exploración rectal digital, que el médico realiza insertando un dedo en el recto para palpar la próstata y evaluar su consistencia, tamaño y posible presencia de nodulaciones sospechosas
- **Ecografía transrectal:** Mediante el uso de ondas sonoras generadas por una sonda colocada en el recto se crea una imagen de la próstata en blanco y negro.
- **Biopsia:** Se extrae una muestra del tejido para analizarse en laboratorio y determinar si contiene células cancerosas.
- **Estudios por imágenes:** Mediante el uso de sondas sonoras, rayos X, campos magnéticos o sustancias radioactivas se obtienen imágenes de la glándula y sus lateraciones.

Fuente (Instituto Nacional de Cancerología (INCan))

Lo recomendable es realizarse revisiones periódicas luego de la primera visita con el urólogo. Esto permitirá llevar un seguimiento constante y detectar cualquier problema o irregularidad mayor a tiempo. PROFECO. (2019).

Precios del antígeno prostático

Actualmente el marcador de detección de cáncer de próstata más utilizado es el antígeno específico de la próstata (PSA por sus siglas en inglés) es específico del órgano, pero no puede especificar la etapa y el tipo de enfermedad, por lo que su uso para la detección de

cáncer de próstata es insuficiente (Heger et al, 2013)

La Dirección General de Estudios sobre Consumo (DGEC) de Profeco recabó precios del 30 de mayo al 3 de junio de 2019 del antígeno prostático específico en siete laboratorios de la Ciudad de México como lo haría cualquier consumidor. Los resultados se encuentran registrados en la Tabla 2 PROFECO. (2019).

Tabla 2. Precios del Antígeno Prostático Específico (PSA)

Precios del Antígeno Prostático Específico (PSA)				
Laboratorio	Precio	Indicaciones		Entrega de resultados
		Ayuno	Abstinencia sexual	
Análisis clínicos PetroLAB	\$180	4h	2 días	1 día hábil
Laboratorio Xotepingo	\$255	8 a 10 h		1 día hábil
Laboratorio Azteca	\$177	8 h	3 días	1 día hábil
Olab Diagnóstico Médicos	\$242	8 h	3 días	1 día hábil
Laboratorio Médico Polanco	\$249	4 h	2 días	1 día hábil
Laboratorio Médico del Chopo	\$249	4 h		1 día hábil
Precio mínimo	\$177			
Precio máximo	\$255			
Precio promedio	\$225			
Dif (\$) mínimo y máximo	\$78			

1.0.7 Inmovilización enzimática.

Existen inconvenientes inherentes al uso de enzimas como elementos de reconocimiento, entre los que se encuentran:

- 1) la probabilidad de que la enzima difunda desde el transductor hacia el medio;
- 2) el mantenimiento de la estabilidad y actividad de la enzima en condiciones de almacenaje y de operación; y
- 3) el aseguramiento de que la enzima pueda ser reutilizable en ensayos posteriores (Sassolas et al., 2012).

Estas dificultades pueden resolverse gracias al uso de técnicas de inmovilización enzimática, definida como el confinamiento de estas biomoléculas en una matriz o soporte distinto al que se encuentran de forma nativa, haciéndolas insolubles. Una gran variedad de materiales insolubles puede ser utilizados como soportes o matrices para la inmovilización enzimática, siendo los más comunes los polímeros inertes y materiales inorgánicos (Datta et al., 2013).

El uso de la inmovilización ofrece distintas ventajas, entre ellas una transferencia más eficiente de la señal generada por la reacción catalítica (Putzbach Ronkainen, 2013). Otra ventaja que ofrece esta técnica es el favorecimiento de la reutilización de la enzima, ya que al estar confinada en una forma insoluble se permite que ésta conserve su actividad catalítica y que se mantenga disponible para la realización de varios ensayos, (dependiendo de la técnica de inmovilización utilizada), disminuyéndose la cantidad de enzima requerida y los costos de operación. Existen cinco técnicas principales para la inmovilización enzimática: adsorción, unión covalente, atrapamiento, afinidad y microencapsulación; de entre éstas la inmovilización por unión covalente y por atrapamiento son las estrategias más empleadas para la construcción de sensores (Datta et al., 2013).

Los desafíos del uso de enzimas inmovilizadas son: identificar nuevos materiales de matriz con características estructurales apropiadas, seleccionar una estrategia de inmovilización que mejora las propiedades enzimáticas y, además, para comprender interacciones enzima-matriz para mejorar la eficiencia catalítica (Shekher et al, 2011). Entre los disponibles métodos, la unión covalente ha

sido el método más utilizado debido a que permite la estabilización de la estructura terciaria de la enzima y una unión permanente al soporte. (Othman et al, 2016)

Recientemente, materiales nanoestructurados han sido utilizados como matrices de inmovilización para enzimas, entre dichos materiales, nano-estructuras de carbono son los candidatos más prometedores para inmovilización enzimática debido a ser químicamente inertes, biocompatibles y conductores de electricidad (Mundra et al, 2014). Los nanotubos de carbono multipared (MWCNT, por sus siglas en inglés, multiwalled carbón nanotubes) presentan excelentes propiedades, las cuales incluyen una estructura geométrica tubular única, magnífica conductividad eléctrica, notable resistencia mecánica y alta conductividad térmica, entre otros. Además, estudios recientes han demostrado que los nanotubos de carbono multipared puede mejorar eficazmente las transferencias directas de electrones entre electrodos y proteínas. (López et al, 2014)

Las propiedades de un nanomaterial, tales como su química de superficie, morfología y tamaño pueden influir la adsorción, conformación y actividad de enzimas inmovilizadas. Más aún, los nanomateriales pueden ser fácilmente funcionalizados y por tanto sus propiedades pueden ser alteradas (Boncel et al, 2014). El comportamiento de enzimas, cuando su inmovilización es destinada, no es fácil de predecir y algunas veces se puede presentar la desnaturalización de la enzima (Zhang et al, 2013), la adición de nanopartículas puede cambiar su superficie de exposición, porosidad y estabilidad, conllevando a alterar patrones de difusión y accesibilidad del sustrato a la enzima inmovilizada (Pang et al, 2015). Cualquiera que sea el nanomaterial empleado para inmovilización, dependiendo de su tamaño, forma, proporción de proteínas entre otras variables determinarán las características finales de la enzima inmovilizada y por lo tanto sus aplicaciones potenciales. (Shekher et al, 2011).

1.0.8 Fuentes y extracción de sarcosina oxidasa.

La sarcosina es un metabolito del suelo común e induce la expresión de SOX en varias bacterias al tener a ésta como única fuente de carbono y energía. (Wagner Schuman, 2000) *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias de ambientes similares pueden utilizar sarcosina (N-metilglicina) como fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento.

La sarcosina está presente en muchos ambientes habitados por *Pseudomonas*, y también se produce como un intermediario en el metabolismo de la colina, carnitina, creatina y glifosato. El catabolismo de la sarcosina bacteriana aeróbica se produce a través de la desmetilación oxidativa catalizada por una de las dos clases de sarcosina oxidasa. Las sarcosina oxidasas monoméricas son la forma más simple de estas enzimas y producen glicina, peróxido de hidrógeno y formaldehído a partir de la sarcosina o las heterotetraméricas sarcosina oxidasas (TSOx) que son más complejas y asimilan el grupo N -metilo de la sarcosina en la reserva de carbono C1 a través de un intermedio 5,10-metilentetrahidrofolato en lugar de liberarlo como formaldehído (Graham et al., 2015).

Es entonces, bajo las consideraciones anteriores, que se eligió *Pseudomonas aeruginosa* para la producción de sarcosina oxidasa, la enzima debe ser aislada y recuperada del medio de cultivo, por lo tanto se someterá a un proceso de purificación enzimática y a posteriores evaluaciones de los parámetros cinéticos de enzima, los cuales se describen a continuación.

1.0.8.1 Purificación enzimática.

Trabajar con sistemas que tienen como base enzimas puras es mejor que usar el extracto crudo. En biocatálisis, es común práctica de utilizar preparaciones crudas comerciales debido a que la purificación de una proteína es costosa y a menudo resulta en menos enzimas estables. Esto es aceptable siempre que no se desee que ocurran reacciones secundarias. Sin embargo, como parte de este trabajo, se ha tomado la purificación de la enzima como un objetivo con el interés de obtener mejores resultados en un futuro desarrollo de sistemas de detección de cáncer.

La purificación es un proceso que cuenta con varias etapas cuyo objetivo es lograr la concentración diferencial de la enzima de interés. Los factores a tener en cuenta en cada etapa del fraccionamiento son solubilidad, pH, grado de oxidación, polaridad y fuerza iónica de la solución, presencia de proteasas, temperatura y actividad de la molécula. (Paxton 1991)

Existen varias estrategias para precipitar las proteínas, como el cambio de pH, el incremento en la

temperatura, la adición de solventes, las moléculas cargadas, etc., pero, el método más comúnmente empleado es la precipitación por salado con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La solubilidad de una proteína es sensible a la concentración de una sal la concentración de sal se expresa en términos de fuerza iónica. La solubilidad de una proteína a baja fuerza iónica generalmente aumenta con la concentración de sal.

En la precipitación de proteínas con sulfato de amonio, las proteínas son solubles gracias a su interacción con el agua, al añadir el sulfato de amonio se unen al agua formando puentes de hidrogeno, la proteína se deshidrata y las biomoléculas interactúan hidrofólicamente entre ellas y forman el precipitado, la proteína menos soluble en solución se une a las sales presentes (sulfato de amonio). El objetivo principal es remover una cantidad importante de remanentes que pueden ser ácidos nucleicos, toxinas y otros compuestos.

Después de la precipitación, la proteína es resuspendida en el solvente y las trazas de agente precipitante se retiran por diferentes formas que pueden ser la diálisis, la ultrafiltración o bien el paso por una columna de exclusión molecular. (Allen 2004.)

En diálisis se utiliza una membrana semipermeable para separar componentes no deseados de la enzima de interés en solución mediante una difusión pasiva y selectiva. Una muestra y una solución buffer (llamado el dializante) son posicionadas en lados opuestos de la membrana. Las moléculas que son más grandes que el poro de la membrana son retenidas en el lado de la misma y moléculas pequeñas y sales del buffer pasan libremente a través de la membrana reduciendo la concentración de esas moléculas no deseadas en la muestra. (*Dialysis Methods for Protein Research | Thermo Fisher Scientific + NL*, s. f.)

Una tercer etapa consiste en purificar mediante cromatografía líquida, los procesos de separación de proteínas están dominados principalmente por la cromatografía de líquidos. La resolución de mezclas proteicas por esta técnica se basa en el principio de que bajo un conjunto dado de condiciones, los solutos disueltos en una fase móvil interactúan en grado diferente con la fase estacionaria contenida en la columna. El tipo de interacción depende de las propiedades físicas y químicas de la fase estacionaria.

La cromatografía de intercambio iónico separa las moléculas en base a su carga iónica neta. La

separación se lleva a cabo por la competencia entre proteínas con diferente carga superficial por grupos cargados opuestamente sobre un adsorbente o una matriz de intercambio iónico. Actualmente, es una de las técnicas de purificación de proteínas más usadas. La separación tiene fundamento en las interacciones hidrofóbicas reversibles entre los solutos que son controladas con el objetivo de favorecer la unión o elución de moléculas específicas logrando su separación. Una proteína que no tiene carga neta a un pH equivalente a su punto isoeléctrico (pI) no podrá interactuar con la matriz o fase estacionaria cargada. Sin embargo, a un pH por encima de su punto isoeléctrico una proteína podrá ligarse a una matriz cargada positivamente o intercambiador anionico mientras que a un pH por debajo de su pI, una proteína podrá unirse a una matriz cargada negativamente o intercambiador catiónico (Handbook Gea, 2006)

La caracterización de la enzima también es un proceso importante para conocer su comportamiento a través de cada paso de purificación, la electroforesis SDS-PAGE (por sus siglas en inglés: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) es una excelente herramienta usada para separar proteínas por tamaño. SDS es un detergente que desnaturaliza estructuras secundarias y terciarias sin enlaces disulfuro adicionalmente proporciona una carga negativa que se correlaciona con la longitud de proteína, permitiendo que el peso molecular pueda ser estimado. El sistema SDS-PAGE consiste en un gel discontinuo con un gel de empacamiento en la parte superior y un gel separador en la parte inferior, los geles varían en pH y concentración de poliacrilamida. Las proteínas pequeñas se moverán a través del gel de separación más rápido que proteínas más grandes (Brunelle & Green, 2014).

1.0.8.2 Determinación de parámetros cinéticos de enzimas.

Al trabajar con enzimas es importante el estudio de su actividad, la cual es una medida de la cantidad de enzima activa presente, dicha medida es dependiente de las condiciones de trabajo, estas condiciones son pH, temperatura y concentración de sustrato.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

La actividad de un enzima se ve afectada por el pH al cual se lleva a cabo la reacción. La curva actividad-pH puede ser diferente para cada tipo de enzima. En el caso más general la curva tiene forma de campana. En la Figura 4 se presentan curvas de diferentes proteínas que se comportan de forma distinta frente a cambios de pH.

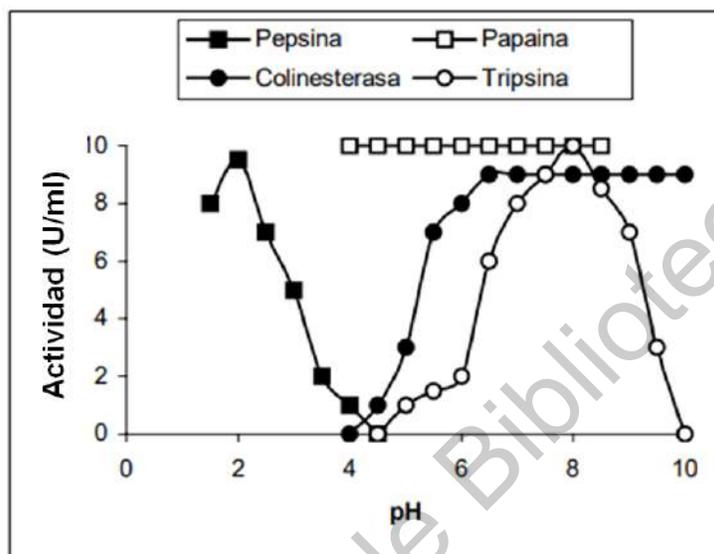


Figura 4. Efecto del pH sobre la actividad de diversos enzimas (Tena et al, s.f.).

El valor de pH al cual la actividad es máxima se denomina pH óptimo; dicho pH no tiene porqué coincidir con el pH intracelular. La relación entre el pH y la actividad depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del propio sustrato. Sustrato y enzima (centro activo) pueden contener grupos funcionales ácidos y básicos, siendo su grado de disociación dependiente del pH, lo que determinará, entre otros aspectos, la conformación de la proteína, la capacidad de unión del sustrato al centro activo del enzima (K_m) y la capacidad de transformación del sustrato (k_{cat}). Los estudios cinéticos a diferentes valores de pH nos proporcionan información sobre el mecanismo catalítico de las enzimas y la naturaleza de los aminoácidos más directamente implicados en la catálisis (Tena et al, s.f.).

Efecto de temperatura sobre la actividad enzimática.

La velocidad de una reacción (actividad) enzimática varía al aumentar la temperatura de acuerdo a

lo indicado en la Figura 5, donde se representa una típica curva de actividad enzimática/temperatura.

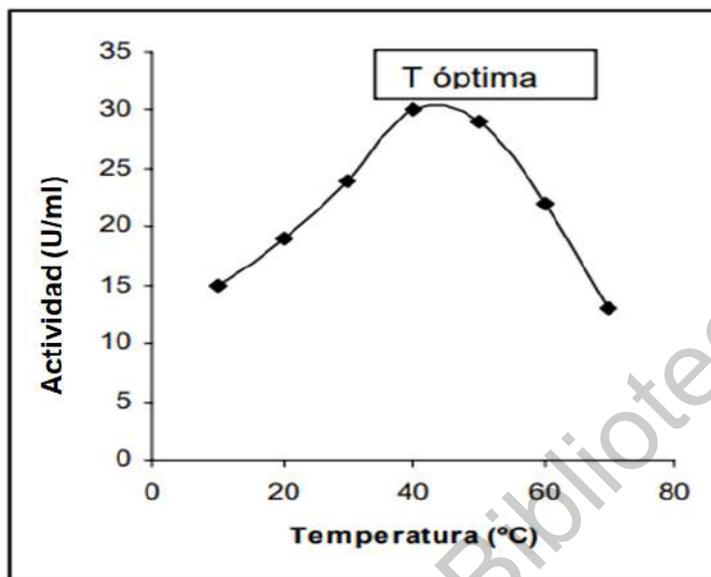


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, se muestra la respuesta de la actividad enzimática (velocidad de reacción) a la temperatura (Tena et al, s.f.).

Tal dependencia refleja un doble efecto de la temperatura: positivo a bajos valores, debido al incremento general que experimenta la velocidad de cualquier reacción química al hacerle la temperatura, y negativo a valores altos, debido a la desnaturalización térmica del enzima. Esto es, la velocidad de una reacción enzimática se incrementa al aumentar la temperatura dentro de un determinado rango, alcanzando un valor máximo a la denominada temperatura óptima. A valores superiores la actividad disminuye debido a que el enzima, como cualquier otra proteína, sufre procesos de desnaturalización y, por lo tanto, de inactivación (Tena et al, s.f.).

Efecto de concentración de sustrato sarcosina sobre la actividad enzimática.

Las enzimas, como todos los catalizadores positivos, aumentan drásticamente la velocidad de una reacción determinada. La cinética enzimática se ocupa principalmente de la medición y descripción matemática de esta velocidad de reacción y sus constantes asociadas. En la Figura 6 se representa el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada

enzimáticamente (Tena et al, s.f.).

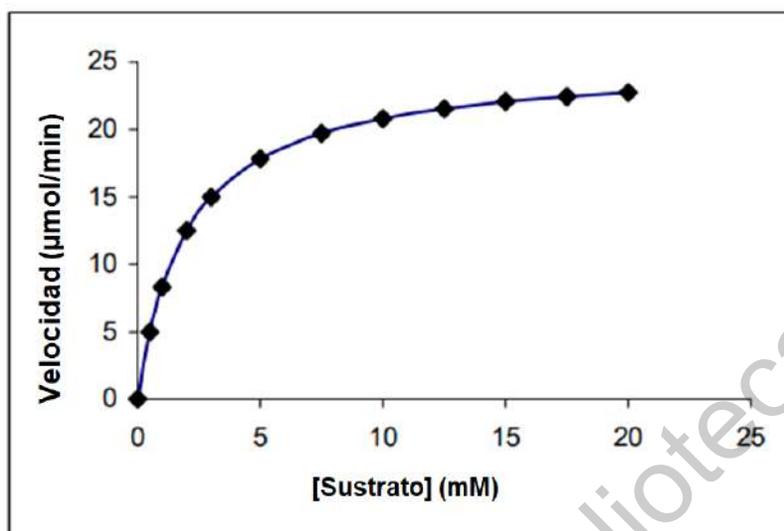


Figura 6. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. Curva de saturación hiperbólica por el sustrato.

Este comportamiento cinético, conocido como curva de saturación hiperbólica por el sustrato, constituye la norma seguida por la mayoría de los enzimas, las denominadas enzimas michaelianas. Como principal desviación, algunas enzimas muestran curvas sigmoideas, en vez de hiperbólicas, de saturación por el sustrato (caso de algunas enzimas cooperativas o alostéricas) (Tena et al, s.f.).

El anterior modelo cinético se ajusta a la ecuación:

$$v = V_{max} [S] / (K_m + [S])$$

donde K_m es la constante de Michaelis e indica la afinidad del enzima por su sustrato, y V_{max} es la velocidad máxima e indica la capacidad catalítica (Tena et al, s.f.).

1.1 Justificación

Actualmente no se cuenta con sistemas de detección que permitan un diagnóstico temprano y oportuno para combatir el cáncer de próstata, así mismo existe el requerimiento de que estos sistemas cumplan con la característica de alta especificidad que generen resultados

correctos, mayor sensibilidad a la cantidad de muestra usada y que el sistema no sea invasivo en el paciente.

Es así que, dentro de las ramas crecientes en esta área de interés, destaca el uso de enzimas, biocatalizadores altamente específicos y sensibles, en la detección de metabolitos que se reporta son expresados en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad, en especial, se considera la presencia de sarcosina en orina como un indicador del desarrollo de cáncer de próstata. .

En la presente tesis busca la extracción, purificación e inmovilización de la enzima sarcosina oxidasa nativa de *Pseudomona aeruginosa* con intención de crear sistemas de sensado a futuro. Implementar protocolos de trabajo que permitan la producción de esta enzima proveniente de una cepa nativa (sin edición genética) representa el pilar inicial en la generación de un método más barato y accesible, considerando el elevado costo de enzimas en el mercado, otorgando así factibilidad de ser utilizado en sistemas de detección eficaces y asequibles.

1.2 Planteamiento del Problema

Aunque se ha logrado establecer a la sarcosina como biomarcador en el desarrollo de cáncer de próstata, las investigaciones respecto a la degradación enzimática del potencial biomarcador se pueden considerar aún escasas dentro de un marco de estudio profundo respecto a los biocatalizadores que actúan en el proceso de reconocimiento de este. Establecer una metodología para la producción, extracción y purificación del biocatalizador sarcosina oxidasa proveniente de *Pseudomonas sp.* es uno de los primeros pasos a seguir para lograr métodos estandarizados de diagnóstico eficaces, ya que se pretende conocer y sentar protocolos de trabajo que faciliten la producción y uso de la enzima sarcosina oxidasa en la aplicación propuesta.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Inducir la producción, extraer, purificar y caracterizar bioquímicamente la sarcosina oxidasa de una cepa de *Pseudomonas sp.*,

1.2.2 Objetivos específicos.

- Establecer y optimizar condiciones de cultivo de las cepas *Pseudomonas sp.* Para inducir la producción de sarcosina oxidasa.
- Extraer la enzima sarcosina oxidasa con capacidad de degradación de sarcosina.
- Caracterizar bioquímicamente la enzima purificada.
- Inmovilizar la enzima extraída de forma covalente en un soporte conformado por nanotubos de carbono multipared.
- Caracterizar bioquímicamente la enzima inmovilizada.

2. Metodología

El trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de biotecnología de la Universidad Autónoma de Querétaro campus Aeropuerto, el cual se encuentra equipado completamente con este objetivo. Las cepas microbianas fueron obtenidas de la colección de cepas microbianas del CINVESTAV-Zacatenco.

2.0.1 Propagación de cepas.

Se requirió disponibilidad de cultivos frescos y nuevos para un correcto estudio en *Pseudomonas sp.* Inicialmente, con base en el protocolo de condiciones de crecimiento para *Pseudomonas sp.* nativas de LaBauveWargo, las cepas se propagaron en medios sólidos para su conservación, para ello se requirió la preparación de medio LB con agar para la propagación inicial en tubos de 10 ml con 5 ml de LB con agar. Las condiciones de trabajo fueron temperatura de incubación 37 C en un periodo de 16-24h. Posteriormente se realizó el cultivo en 35 ml de medio líquido LB en matraces de 125 ml siguiendo las condiciones previstas con una agitación de 200 rpm. Se generaron alícuotas de 1.5 ml en una relación 6:1 de glicerol 50% y cultivo, los cuales se resguardan a una temperatura de -4°C. Finalmente se inoculó en cajas Petri para una posterior manipulación de colonias individuales de *Pseudomonas sp.*

2.0.2 Cinética de crecimiento

Con el propósito de establecer las mejores condiciones para la producción de sarcosina oxidasa, se utilizaron medios de cultivo enriquecidos para optimizar las condiciones de cultivo que permitan obtener la mejor calidad y cantidad de la enzima de interés, recordando que la cepa es nativa

El procedimiento a seguir fue crecer cuatro colonias extraídas de una caja Petri cultivadas en cuatro diferentes medios líquido LB, el primer medio fue preparado solo con LB, los siguientes tres se suplementaron con sarcosina en una concentración de 10, 20 y 40 mM respetivamente, se realizó la

toma de alícuotas de 1 ml por triplicado cada hora durante las primeras 12 horas y las 12 horas posteriores en intervalos de dos, las muestras fueron analizadas espectrofotométricamente en un equipo UV-vis Mecasys Optizen Pop y el incremento del valor de la absorbancia se relaciona con la densidad de bacterias presentes en una longitud de onda de 600 nm.

Los métodos descritos fueron realizados con las precauciones necesarias utilizando el equipo de seguridad correspondiente y auxiliados de una campana de flujo laminar.

2.0.3 Ensayo enzimático.

Conociendo las condiciones óptimas para el trabajo con las bacterias se procedió a realizar un ensayo enzimático de la sarcosina oxidasa, para conocer la localización de esta. El método de identificación es de tipo espectrofotométrico basado en la actividad que tiene la enzima de transformar la sarcosina en glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno, utilizando al formaldehido como indicador de la reacción de desmetilación de la sarcosina catalizada por sarcosina oxidasa. Los reactivos a utilizar son: 60 mM glicilglicina buffer (pH 8.3 a 37°C), solución 300 mM solución de sarcosina en buffer glicilglicina, 500 mM ácido acético, 2 M solución acetato de amonio, isopropanol, acetilacetona, y la enzima sarcosina oxidasa presente en muestra. Se incubó 0.2 ml de buffer glicilglicina con 0.2 ml de sarcosina oxidasa en el tubo de reacción por 10 minutos a 37°C, se añadió 0.5 ml de ácido acético y 3 ml de reactivo color (66.5% isopropanol, 33.25% acetato de amonio y 0.25% acetilacetona) respetando este orden de adición, se dejó en baño María a 60°C por 30 minutos; el ácido acético se desioniza en iones acetato que inhiben la reacción. La medición de formaldehido se realizó en espectrofotómetro UV-vis Mecasys Optizen Pop en la longitud de onda 410 nm.

En el Anexo A se presenta el protocolo de ensayo enzimático a detalle, se señala la ecuación que permite determinar la actividad enzimática, expresada en unidades por mililitro (U/ml) a partir de la absorbancia, donde una UNIDAD forma 0.1 μ mol de formaldehído a partir de sarcosina por minuto en condiciones pH 8.3 y temperatura 37°C (Suzuki, 1981)... FALTA INFORMACIÓN, TIEMPO DE INCUBACIÓN, COMO DETIENES LA REACCIÓN, A CUANTO MIDES EN EL ESPECTRO, ES NECESARIO DEFINIR TU UNIDAD DE ACTIVIDAD A QUE

CORRESPONDE???

2.0.4 Extracción y purificación de enzima.

Una vez establecido que la localización de la enzima es extracelular, omitiendo de esta forma la lisis celular, se llevó a cabo su separación del medio bacteriano mediante centrifugación a 9000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, la enzima se mantiene en el sobrenadante, el cual se recuperó. El laboratorio cuenta con centrífuga de alta velocidad CRM Globe Centrifugant VI.

La purificación enzimática es uno de los procesos más complicados en el área de enzimología, y en ocasiones requiere de varios pasos sucesivos para lograr un alto porcentaje de purificación. .

En una primera etapa de separación por precipitación de sales, se saturó con sulfato de amonio el extracto crudo recuperado del medio de cultivo hasta una concentración de 60%, se dejó en reposo por 24 horas a 4°C y se recuperó el sobrenadante centrifugando a 6500 rpm durante 20 min.

Posterior a la precipitación proteica el precipitado recuperado mediante centrifugación fue resuspendido en buffer Tris-HCl 0.01 M pH8 y dializado en membrana semipermeable de celulosa D9402 Sigma-Aldrich de un tamaño de poro de 14,000 Dalton. En diálisis se separan componentes no deseados de macromoléculas de interés en solución mediante una difusión pasiva y selectiva. La muestra y una solución buffer (llamado el dializante) fueron posicionados en lados opuestos de la membrana. Las moléculas que son más grandes que el poro son retenidas en el lado de la membrana que contiene a la misma y las moléculas más pequeñas y sales del buffer pasan libremente a través de la membrana, reduciendo la concentración de dichas moléculas no deseadas en la muestra.

En el sistema de diálisis dispuesto se colocó un aproximado de 35ml de muestra en un litro de buffer dializante, el sistema se mantuvo en refrigeración a 4°C en agitación constante y se

requirieron de 6 cambios de buffer dializante, un cambio diario los primeros 3 días y después el cambio fue cada tercer día. Cambiar el buffer remueve las moléculas pequeñas que ya no están en la muestra permitiendo la difusión de más contaminantes en el dializante, de esta forma la concentración de los contaminantes en la muestra puede disminuir hasta niveles indetectables. (*Dialysis Methods for Protein Research* | Thermo Fisher Scientific - NL, s. f.)

2.0.5 Caracterización bioquímica y estabilidad enzimática.

Se evaluó el efecto de la temperatura, pH y concentración de sustrato sarcosina en la actividad de sarcosina oxidasa libre. El método empleado el indicado en el apartado 2.0.2 ensayo enzimático, que como se mencionó, es del tipo indirecto y espectrofotométrico basado en la desmetilación oxidativa de la sarcosina catalizada por la SOX y la producción de formaldehído, el cual absorbe a una longitud de onda de 410 nm.

Los ensayos para evaluar el efecto del pH se realizaron en un rango de pH de 6.5 a 9.5 con incrementos de 0.5 unidades. Los ensayos para evaluar el efecto de la temperatura se llevaron a cabo en un rango de 15°C a 55°C en intervalos de 10°C, por último la determinación de los parámetros cinéticos se llevó a cabo a distintas concentraciones de sarcosina en espacios de 100 mM.

El análisis cualitativo de las etapas de extracción de sarcosina oxidasa se realizó mediante la técnica electroforética SDS-PAGE, se empleó como marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards. Se utilizó un gel de poliacrilamida al 5% en buffer Tris 0.5 M pH 6.8 como gel concentrador y el gel separador fue preparado al 12% de concentración en buffer Tris 1.5 M pH 8.8. Cada muestra fue preparada para su caracterización añadiéndose buffer de carga 4X colocando una parte del buffer por 3 partes de muestra, se llevó a 100°C por 5 minutos en baño María para permitir la desnaturalización enzimática. En cada pocillo se colocó una cantidad de muestra de 20 µl y se llevó a cabo la electroforesis a 200 V por un periodo de 30 minutos. Se emplearon dos técnicas de tinción para el revelado de bandas, tinción de Coomassie y tinción de plata. El protocolo específico de cada tinción así como la preparación de cada reactivo usado en

electroforesis se indican en el Anexo B.

2.0.1 Funcionalización de soporte e inmovilización de enzima.

Se realizó la funcionalización previa de la superficie de los nanotubos, se empleó una modificación del método de unión covalente reportado por Kim et al. (2017), que emplea 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) como agente activador del soporte (B.C. Kim et al., 2017). En dicho método la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida reacciona con los grupos carboxilo de los nanotubos de carbono, para formar el intermediario reactivo O-acilourea, el cual reacciona con los grupos amino libres en la enzima produciéndose un enlace de tipo amida estable. Es necesario mencionar que el intermediario O-acilourea es inestable y susceptible, lo cual interfiere con la unión, sin embargo, la adición del compuesto N-hidroxi-succinimida lo estabiliza, convirtiéndolo en un éster más estable e incrementado la eficiencia de la unión (Gao Kyratzis, 2008).

2.0.6 Funcionalización de los nanotubos de carbono MWCNT.

Los nanotubos de carbono multipared (MWCNT) fueron donados por el centro de investigaciones en materiales avanzados (CIMAV S.A., México). Se preparó 50 ml de una solución compuesta de HNO₃ (70%, 37.5 ml) y H₂SO₄ (98%, 12.5 ml) en proporción 3:1 (v/v) y se suspendieron 40 mg de MWCNT para lograr una oxidación. La suspensión de nanotubos se mantuvo por 3 h a temperatura ambiente (25 °C) en el ultrasonido y se agitó durante toda la noche con ayuda de un plato caliente (~16 h). Posteriormente los MWCNT fueron recuperados mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 min y fueron sometidos a una serie de lavados con agua desionizada hasta alcanzar un pH neutro en la solución. Al final, los MWCNT fueron obtenidos mediante centrifugación a 3500 rpm durante 20 min y se secaron en un horno a 80 °C durante 5 h. (Rosca y col., 2005).

2.0.7 Inmovilización de la enzima MAO-A en MWCNT

Para la inmovilización se siguió el método de unión covalente reportado por Kim et al. (2017) modificado por Hernández (2017). En este método se requiere el agente activador 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) para el soporte, que forma el intermediario O-acilisourea al reaccionar con los grupos funcionales carboxilo de los MWCNT, este intermediario llega a ser inestable lo cual puede evitarse al añadir N-hidroxisuccinimida (Gao y Kyratzis, 2008) la cual incrementa la eficiencia de la unión con los grupos funcionales de la enzima MAO-A y produce un enlace tipo amida estable (B. C. Kim y col., 2017). (Figura 7).

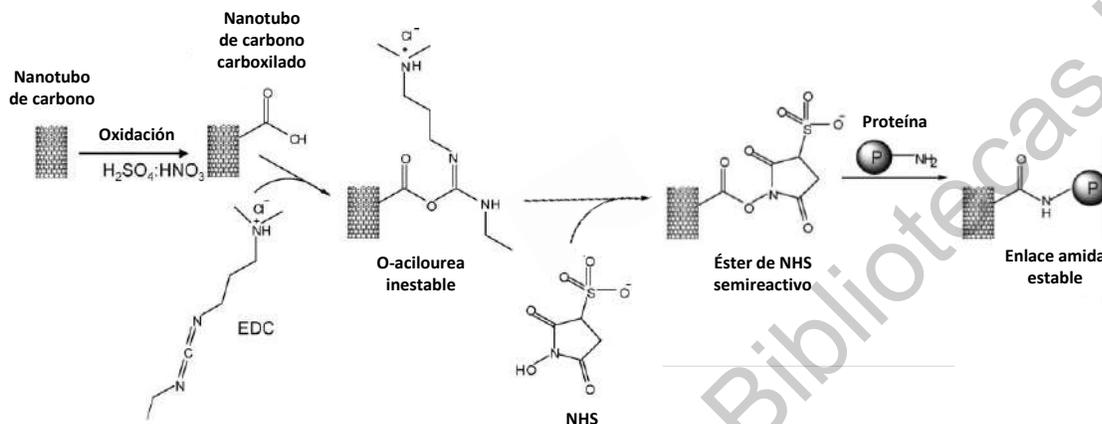


Figura 7. Mecanismo de integración de proteínas con nanotubos de carbono empleando EDC en presencia de NHS. Modificado de Gao y Kyratzis, 2008.

Se preparó una suspensión de 4 mg de MWCNT funcionalizados en 10 ml de agua desionizada y se mantuvo en el ultrasonido durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente se prepararon tres soluciones: a) 30 ml de solución amortiguadora de ácido-N-morfolino etanosulfónico (MES, 500mM, pH6.2 en agua desionizada); b) 5 ml de solución acuosa de N-hidroxisuccinimida (NHS, 500 mM en amortiguador MES) y c) 5ml de solución acuosa de 1-etil-3-(3- dimetilaminopropil) carbodimida (EDC, 70 mM en agua desionizada). A la solución de MWCNT se le agregó 1ml de solución MES, 2.3 ml de solución NHS y 1.2 ml de solución EDC. Para terminar los MWCNT fueron obtenidos mediante centrifugación y lavados 3 veces con solución MES para eliminar los residuos de EDC y NHS.

Para la inmovilización de la SOx se añadió 1 ml de solución de enzima (0.095 mg/ml; 1.05 U/ μ l) en amortiguador de fosfatos de potasio (KH₂PO₄, 10 mM y K₂HPO₄, 10 mM pH 6.5), a 1 ml de la suspensión de MWCNT (4 mg/ ml). Finalmente, la mezcla se mantuvo en agitación orbital a 500 rpm durante 40 min a 4° C, y se permitió que el acoplamiento de la enzima con MWCNT ocurriera

durante 15 h a 4 °C. Los MWCNT conjugados con la enzima SO_x (SO_x/MWCNT) fueron recuperados por centrifugación a 3500 rpm y se suspendieron en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos.

2.0.8 Estudio cinético de acoplamiento de la enzima MAO-A en los MWCNT

Para evaluar el rendimiento de la inmovilización de la enzima sarcosina oxidasa en nanotubos de carbono multipared por medio del método de EDC se llevó a cabo un ensayo de cinética de acoplamiento, que consistió en la cuantificación de la proteína total presente en el sobrenadante de la suspensión durante el procedimiento de inmovilización. Este ensayo permite evaluar parámetros relevantes en el procedimiento de inmovilización como: tiempo de acoplamiento y porcentaje de rendimiento, es decir, la cantidad de enzima acoplada en el soporte.

El ensayo de cinética de acoplamiento evalúa mediante espectrofotometría la cantidad de enzima que es acoplada al soporte; se cuantificó la proteína de cada uno de los sobrenadantes. Para este ensayo 1ml del complejo MAO-A/MWCNT (4 mg de MWCNT) se mantuvo a 4 °C durante 60 min y se obtuvieron muestras mediante centrifugación a 1500 rpm durante los 0, 3, 6, 15, 30, 45, y 60 min y se cuantificó la proteína total por el método de Lowry.

Posteriormente se construyó una curva de cinética donde se graficó la densidad óptica contra el tiempo donde se pudiera apreciar el acoplamiento de la enzima en el soporte y se determinó la cantidad de enzima inmovilizada expresada como microgramos de proteína (SO_x) por miligramos del soporte (MWCNT).

2.0.9 Caracterización de enzima inmovilizada

Para examinar el acoplamiento de la enzima SOX a los nanotubos de carbono se llevó a cabo un ensayo de cinética de acoplamiento. Este ensayo evaluó la cantidad de enzima que se acopla al soporte mediante un método espectrofotométrico. El ensayo consistió en mantener una de las mezclas de SOX/ MWCNT (1 mL) a 4 °C durante un periodo de 60 minutos, y se obtuvieron muestra del sobrenadante durante los minutos 0, 3, 6, 15, 30, 45 y 60 mediante centrifugación (1500 rpm).

Posteriormente se realizó la cuantificación de la proteína total de cada una de las muestras mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951) , para construir una curva de cinética en la que se graficó el cambio de densidad óptica versus el tiempo. Dicha curva permitirá apreciar el acoplamiento de la enzima al soporte, el cual es indicado por una reducción de la concentración de la enzima presente en los sobrenadantes conforme transcurre el tiempo. Además, se determinará la cantidad de enzima inmovilizada en los nanotubos de carbono, expresada como microgramos de proteína por miligramo del soporte.

2.0.10 Determinación de los parámetros cinéticos.

Teniéndose la enzima soportada en nanotubos de carbono multipared se efectuaron pruebas de actividad enzimática variando condiciones de pH y temperatura, pH en un rango de 6.5 a 9.5 con incrementos de 0.5 unidades y temperatura con intervalos de 10 °C en el rango de 15°C a 55°C. Además se realizó la evaluación del comportamiento de sarcosina oxidasa frente a cambios de concentración de sarcosina, en espacios de 100 mM de 0 a 1M como rango, Esta última evaluación permitió calcular los valores cinéticos de la enzima SOX (K_m y V_{max}). Los datos obtenidos fueron comparado con la actividad de sarcosina oxidasa en estado libre.

3. Resultados y discusión

3.1.1 Propagación bacteriana.

El trabajo con la cepa bacteriana de *Pseudomonas sp.*, el cual implicó la renovación de cultivo de la cepa para tener un buen mantenimiento de las colonias culminó con el pasar del tiempo en la adaptación de la cepa al medio de cultivo suplementado con sarcosina, suceso que tiene impacto en una mejor producción de enzima. Esta adaptación se caracterizó por el cambio en la morfología de la cepa, en la Figura 8 se observan en el medio de cultivo sólido colonias pequeñas y blancas, en la Figura 9 las colonias son más grandes y de una tonalidad anaranjada. Hampel et al. (2013) expone la caracterización de reguladores de transcripción para analizar la respuesta de *Pseudomonas sp.* a las condiciones cambiantes demostrando que la bacteria tiene esta capacidad adaptativa enmarcando así el acierto en usar a este organismo como fuente y productor de la enzima sarcosina oxidasa.



Figura 8. Colonias nativas de *Pseudomonas sp.* Febrero 2019

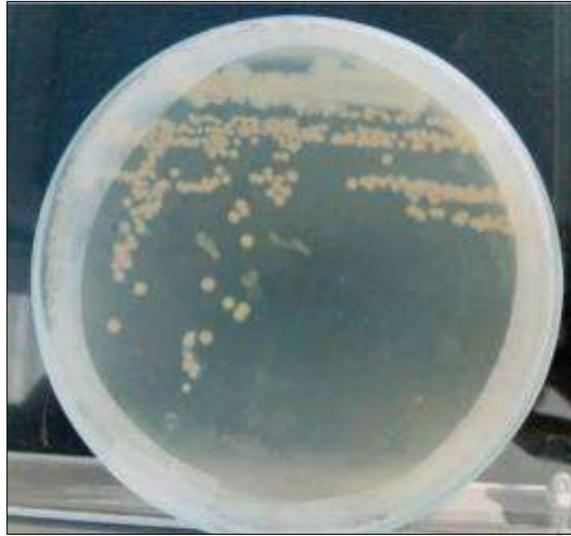


Figura 9. Colonias nativas de *pseudomonas sp.* Sep 2019

3.1.2 Crecimiento bacteriano y producción enzimática.

La Figura 10, un gráfico de la cinética de crecimiento bacteriano, muestra que usar medios suplementados (medio LB + 10mM, 20 mM y 40mM sarcosina) no tiene impacto en el comportamiento de crecimiento de *Pseudomonas sp.* en comparación con su crecimiento en medio LB sin suplementar indicando que la bacteria puede tomar al sustrato sarcosina como fuente de carbono primario. Sin embargo, sí existe un cambio significativo en la producción de enzima: en medio sin suplementar no se detecta producción alguna mientras que en los medios suplementados hay una notable cantidad de enzima secretada por la bacteria (Figura 11). Es pertinente resaltar que la concentración de sarcosina que manifiesta una mayor producción de sarcosina oxidasa es 20mM.

Con la concentración de 40mM la disminución de producción enzimática, esta baja de producción de sarcosina oxidasa que se tiene una vez que se aumenta la concentración de sarcosina, puede tener su explicación en una inhibición de expresión génica por producto: la catálisis enzimática de sarcosina genera tres productos, formaldehido, peróxido de hidrogeno y glicina. La glicina tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano que ha sido bastante conocido desde hace tiempo, altas concentraciones de glicina ocasionan la lisis celular debido a que induce una alteración en la composición del peptidoglucano en membrana celular (Hishinuma et al, 1969). Fitzsimmons et al, 2012, realizaron un estudio donde evidencian que *Pseudomonas aeruginosa* tiene reguladores

transcripcionales que permite a la bacteria mantener concentraciones de glicina adecuados, las suficientes para llevar a cabo procesos donde la glicina está involucrada sin llegar a la afectación de la bacteria.

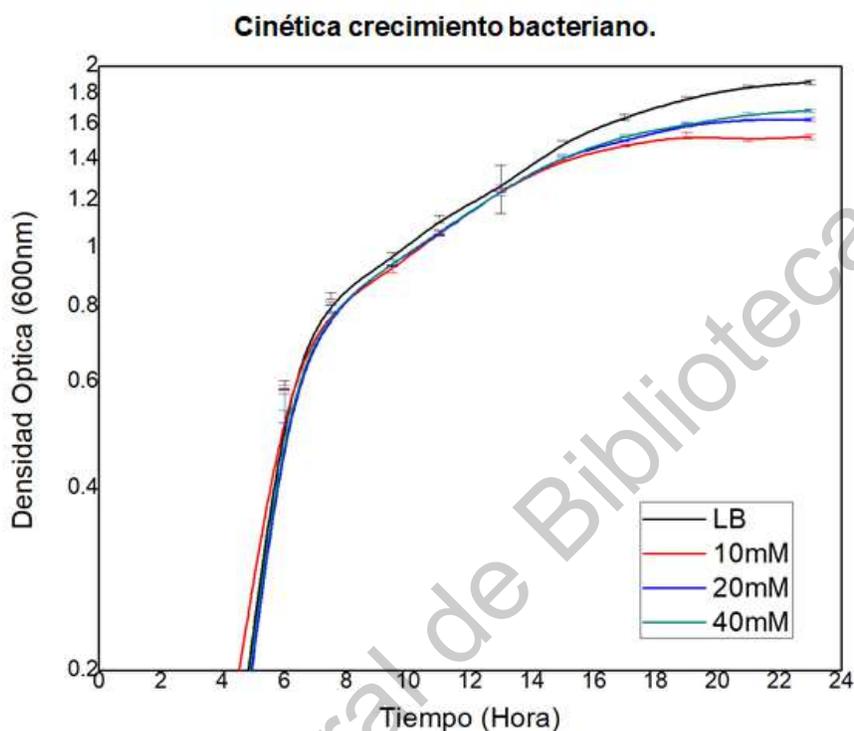


Figura 10. Cinética de crecimiento bacteriano

El ensayo de identificación de enzima indica que la enzima sarcosina oxidasa es un metabolito primario, es decir, se produce durante el proceso metabólico de la enzima y no bajo condiciones de estrés. La actividad enzimática se presentó en el extracto celular, lo cual indica que la bacteria secreta SOx al medio implicando que no es necesario un rompimiento de membrana celular para poder extraer la enzima siendo esto ventajoso en su obtención y purificación debido a que evita un proceso de lisis de membrana. La mayor actividad enzimática se presenta en medio LB suplementado con 20mM sarcosina después de 16-17 horas de inoculación, momento en que la bacteria alcanza su etapa de crecimiento estacionario, Figura 11. En adelante dentro de las condiciones empleadas para la producción de enzima sarcosina oxidasa se estableció el uso de medio LB suplementado con 20 mM sarcosina por un periodo de incubación de 17 horas.

Actividad volumétrica de sarcosina oxidasa

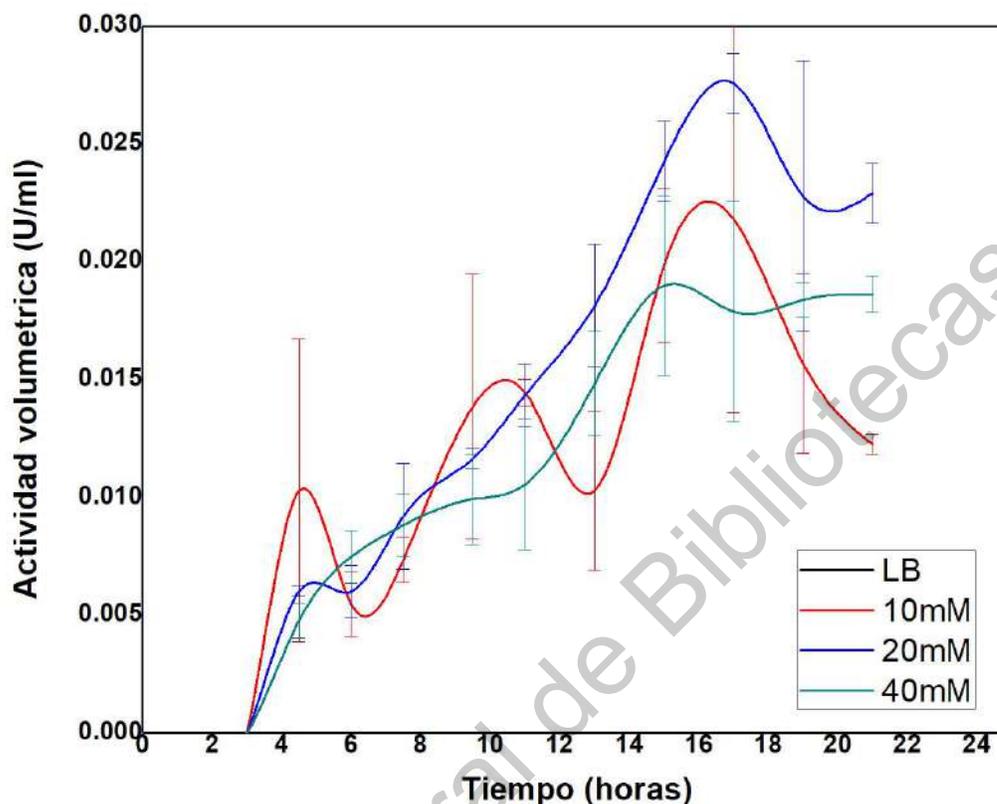


Figura 11. Cinética de producción enzimática

Nota: el elevado error en el ensayo se atribuye a la condición del extracto crudo que se toma para la prueba, en el extracto al tener presencia de interferentes y/o contaminantes y no exclusivamente la enzima aumenta la variabilidad en el resultado.

Adicional al seguimiento de actividad enzimática, se realizó la cuantificación de proteína total presente en el extracto crudo utilizando el método de Lowry, el contraste de ambas variables nos permite identificar la actividad específica de sarcosina oxidasa (Unidad de enzima por mg proteína), en la Figura 12 se puede apreciar que en medio LB+20 mM sarcosina se obtiene la mayor actividad específica enzimática, con este medio se puede obtener una mayor cantidad de producción de enzima considerando el total de muestra proteica, mientras que a 10mM la actividad específica es mínima y el medio con 40mM muestra una actividad específica considerablemente menor que la enzima producida en medio LB + 20 mM, resultado ligado a la autorregulación de

Pseudomonas sp en la cantidad de glicina presente, como se mencionó, un nivel de concentración elevado llevaría a la lisis celular de la bacteria, por tanto, se presenta inhibición de expresión de sarcosina oxidasa por la formación del producto como una respuesta de supervivencia.

Actividad específica de sarcosina oxidasa

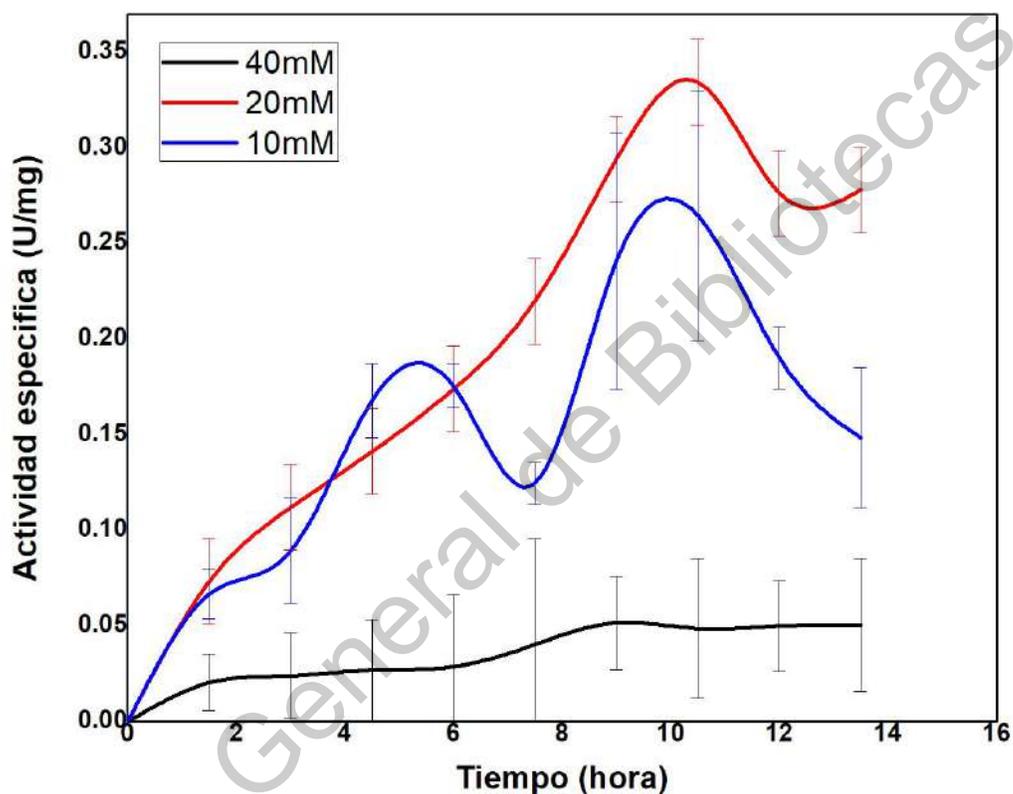


Figura 12. Actividad específica de sarcosina oxidasa

3.1.3 Purificación enzimática

Posterior a la precipitación proteica con sulfato de amonio, la muestra recuperada con sarcosina oxidasa fue dializada en un factor de 5.4×10^8 , considerando que dicho factor es igual al radio del volumen del buffer al volumen de la muestra (V_b/V_m) y cada cambio consecutivo de buffer es tomado como un nuevo factor de multiplicación. El sistema de diálisis se dispuso como se muestra

en la Figura 13 , se mantuvo en refrigeración a 4°C y agitación constante.

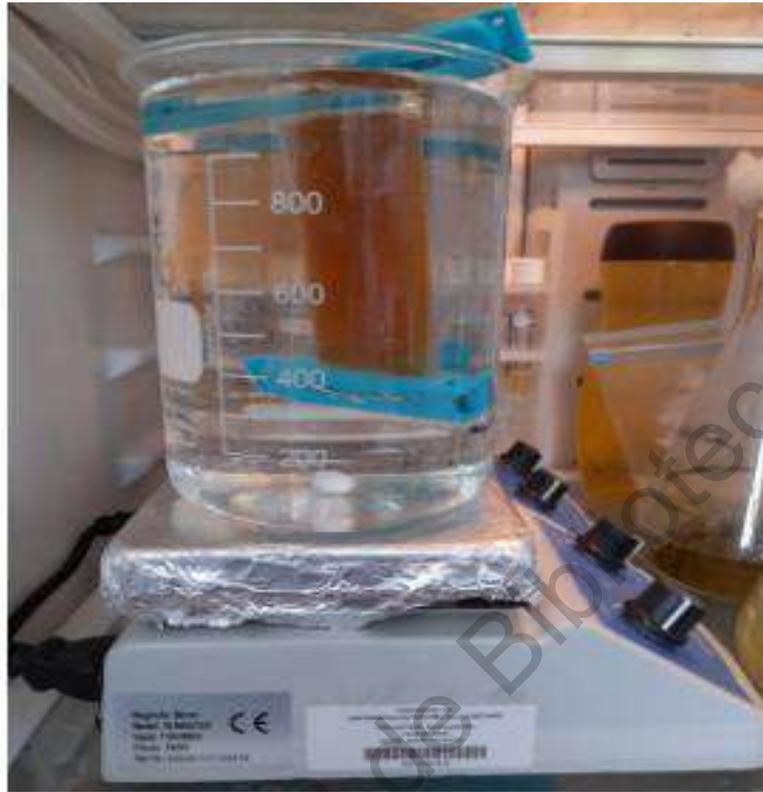


Figura 13. Sistema de diálisis mantenido en condiciones 4°C y agitación constante.

En la Figura 14 se compara visualmente la muestra antes y después del dializado, el cambio en el color se asocia a la separación de componentes del medio de cultivo utilizado que, al ser en su mayoría de carácter inorgánico, su tamaño es pequeño y por tanto menor al tamaño de poro de membrana de 14kDa. Cabe mencionar que el cambio de buffer dializante se detuvo una vez que la enzima recuperó su actividad inicial, la inhibición enzimática se asocia a la alta concentración de sulfato de amonio ocasionada por la etapa de precipitación.



Figura 14. Muestra antes de diálisis (izquierda) y después de dializar (derecha)

En cada etapa del proceso de extracción y purificación de sarcosina oxidasa se realizaron pruebas de actividad de la enzima así como cuantificación proteica con el fin de evaluar cada etapa y conocer el comportamiento de la enzima, su sensibilidad al método usado así como valorar el grado de pureza de la enzima en cada una de ellas. En la Tabla 3 se resume la información obtenida.

Tabla 3. Purificación enzimática sarcosina oxidasa.

Etapa de purificación	Actividad total (U)	Total de proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento total (%)	Purificación parcial	Purificación total
Extracto Crudo	13800	3852.237	3.582	100	1	1
Precipitado con Sulfato de Amonio*	---	240.219	-----	---	----	----
Diálisis	840	111.7585	7.516	6.086	2.098	2.098

Nota*: El sulfato de amonio inhibe la actividad enzimática de sarcosina oxidasa por lo tanto es inviable su cuantificación en esta fracción de la muestra, sin embargo con ensayo de Lowry podemos cuantificar y verificar la permanencia de proteína en la muestra en esta etapa de purificación.

Para dar seguimiento a las etapas de purificación se han acompañado la prueba de actividad enzimática y la cuantificación de proteína mediante el método de Lowry con electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (técnica SDS-PAGE por sus siglas en inglés: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

Primero se realizó un revelado de bandas utilizando el protocolo para tinción de Coomassie (Anexo B), se reporta que el peso molecular de sarcosina oxidasa se encuentra entre 43 a 48 kDa por consiguiente el revelado se espera indique bandas en este tamaño de referencia. La figura 11, presenta el revelado SDS-PAGE con tinción azul de Coomassie, las muestras fueron corridas en el siguiente orden: carril 1 contiene marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards, carril 2 con muestra concentrada de enzima sarcosina oxidasa (SOx) 1mg/ml, una muestra de enzima comercial (SOx) 1U/ml (aproximadamente 0.15 μ g) fue depositada en el carril 3, carril 4 tiene muestra de extracto crudo (sobrenadante recuperado de medio de cultivo), carril 5, 6 y 7 contienen muestra de extracto dializado.

Desafortunadamente esta técnica no permitió el revelado de dichas bandas. La tinción de Coomassie tiene un límite de detección de 2 μ g de proteína por ml, información que se verifica al colocar en el segundo carril/banda una muestra de 20 μ l de enzima sarcosina oxidasa (SOx) concentrada (1mg/ml) preparada con buffer de carga 4X lo que equivale a tener 5mg en la muestra permitiendo que la banda pueda ser identificada. En la Figura 15 puede apreciarse esta banda resaltada con el recuadro rojo. En el carril 3, la muestra depositada corresponde a enzima comercial en concentración 1U/ml, la hoja técnica indica que 1mg de enzima es equivalente a 50U, por lo tanto, considerando la dilución buffer de carga y que el llenado del pocillo del gel se realiza con 20 μ l, se tiene un aproximado de 0.37 μ g, que se encuentra por debajo del límite de detección y por tanto no hay revelación de banda.

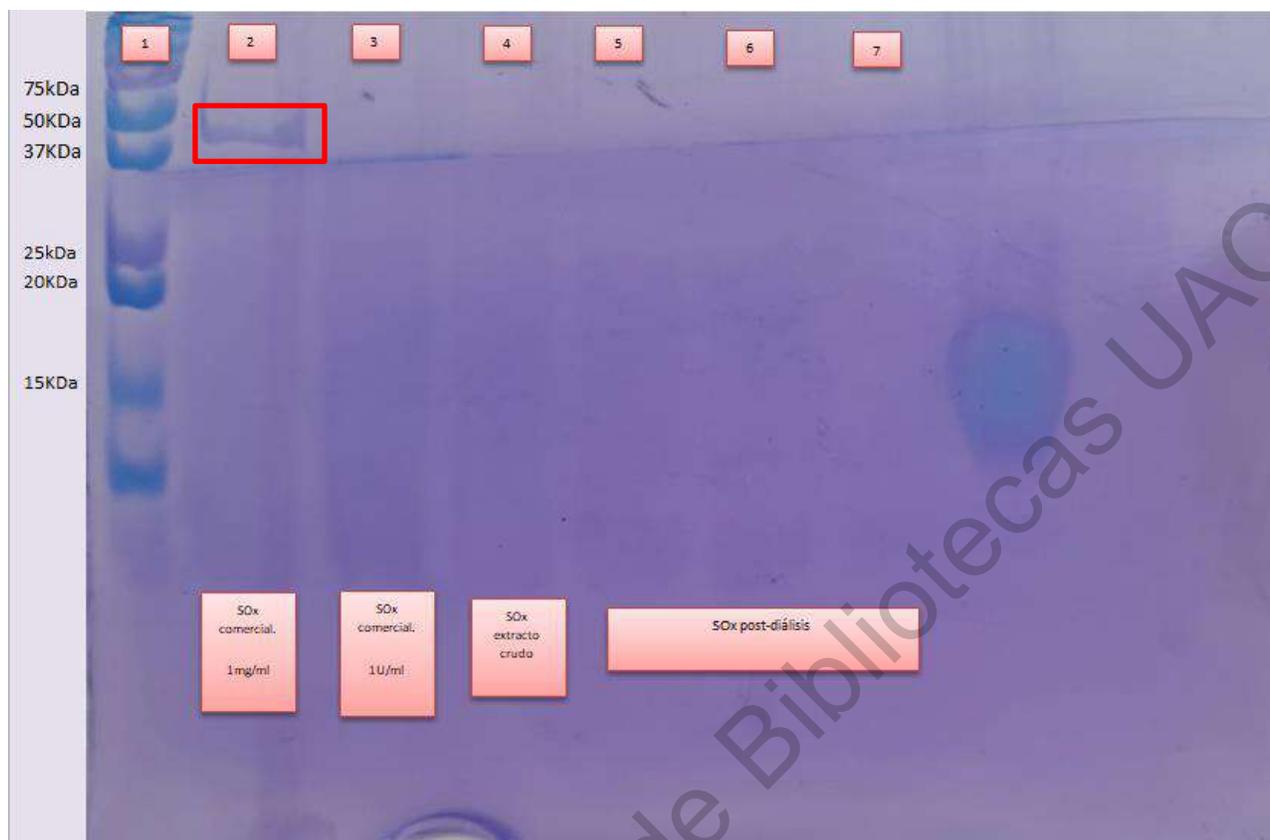


Figura 15. Revelado SDS-PAGE con tinción azul de Coomassie. En carril 1 contiene marcador de peso molecular, carril 2: muestra de enzima sarcosina oxidasa (SOx) 1mg/ml, carril 3: muestra de enzima comercial (SOx) 1U/ml (aproximadamente 0.15 µg depositados en el pozo), carril 4 muestra de extracto crudo (sobrenadante recuperado de medio de cultivo), carril 5, 6 y 7 contienen muestra de extracto dializado.

*La mancha en el carril 8 se debe a que se colocó una muestra de extracto en etapa de precipitación por sales, el sulfato de amonio contenido en esta afecta el proceso de electroforesis y su revelado.

Se decidió realizar nuevamente la caracterización electroforética siguiendo otro método de tinción - tinción de plata (Anexo B)- el cual tiene una mayor sensibilidad de detección con un límite de detección de 5-10ng. En esta ocasión se añadió la muestra de cultivo bacteriano en el carril 10 para tener una comparación visual de lo que está sucediendo conforme se avanza en la purificación, la Figura 16 ilustra el revelado de la técnica. En esta ocasión en el carril 7 correspondiente a una muestra de enzima dializada se logran apreciar dos bandas tenues que pueden ser indicativas a la enzima de interés. Esta prueba no es determinante para indicar que efectivamente es sarcosina oxidasa pero con el respaldo de la actividad mostrada en muestras dializadas se puede plantear que el proceso de purificación se encuentra encaminado en buena dirección, considerando la baja concentración que aún se tiene de enzima.

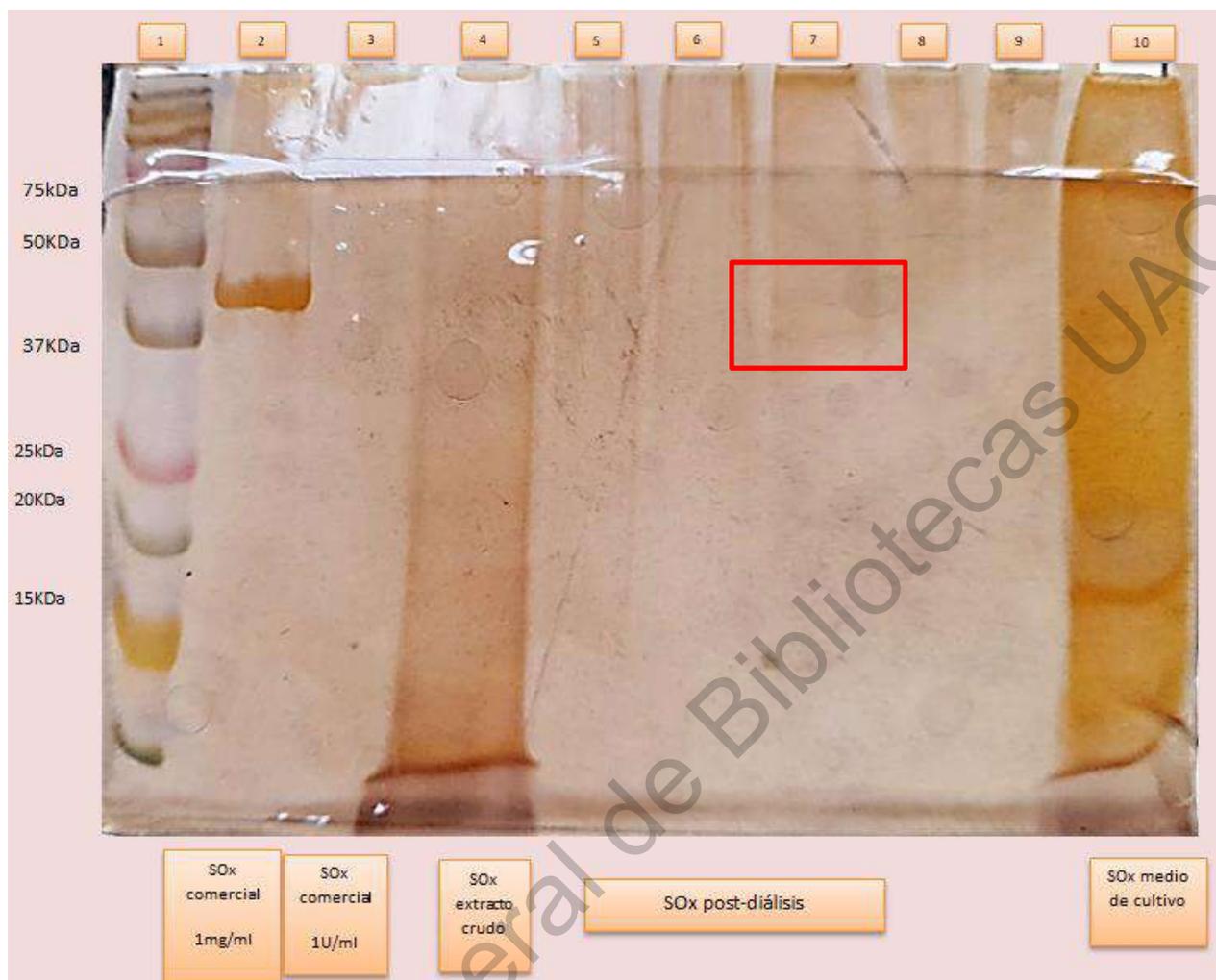


Figura 16. Revelado SDS-PAGE con tinción de plata. En banda 1 contiene marcador de peso molecular, banda 2: muestra de enzima sarcosina oxidasa (SOx) 1mg/ml, banda 3: muestra de enzima comercial (SOx) 1U/ml (aproximadamente 0.15 μ g depositados en el pozo), banda 4 muestra de extracto crudo (sobrenadante recuperado de medio de cultivo), banda 5, 6 y 7 contienen muestra de extracto dializado. En el carril 10 se adiciono una muestra del cultivo de bacteria.

3.1.4 Estudio de cinética de acoplamiento de la enzima SOx en los nanotubos de carbono multipared.

La inmovilización de la enzima se realizó empleando 2 mg de MWCNT. Como se puede apreciar en la Figura 17 el acoplamiento de la enzima a los MWCNT se completó durante 6 minutos de incubación, lográndose acoplar 14.2 μ g de SOx por mg de soporte, significando un 70.11 % de rendimiento de inmovilización.

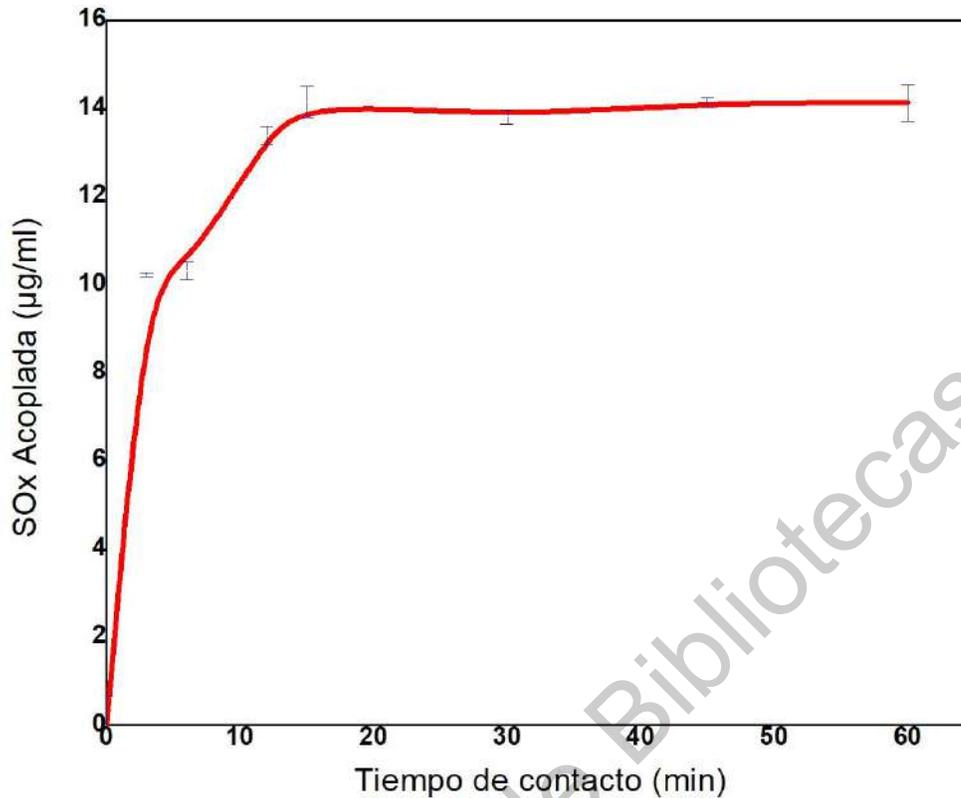


Figura 17. Representación gráfica de la cinética de acoplamiento de la enzima SOx en los MWCNT, mediante unión covalente mediada por EDC.

Trabajos previos, como el soporte de sarcosina oxidasa de *Arthrobacter sp.* sobre perlas de vidrio de alquilamina y arilamina unida por enlace covalente mediado por glutaraldehído y la diazotización reporta un acoplamiento de 0.86 µg/mg y 0.91 µg/mg. (Pundir et al, 2010). Yang & Mu (1996) realizaron de las primeras aportaciones en el desarrollo de biosensado de sarcosina a través de la inmovilización de sarcosina oxidasa en un electrodo de polianilina, el soporte se realizó por dopaje durante el proceso de oxidación de polianilina, si bien no hay una cantidad de enzima acoplada que se reporte, si señalan que este tipo de técnica presenta problemas durante la inmovilización ocasionado por la competencia entre la enzima cargada negativamente y los aniones del buffer durante el proceso de dopaje. Para aumentar la cantidad de enzima en la película deben utilizar una concentración más baja de buffer fosfato para preparar el electrodo de sarcosina oxidasa.

De lo anterior, podemos retomar que la inmovilización sobre los nanotubos de carbono basado en la unión covalente de sarcosina oxidasa, utilizando N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) que conduce a la formación de grupos estables éster en la superficie permite el acoplamiento de enzima dando permanencia y equilibrio a la unión matriz-enzima. Además la cantidad de enzima es considerablemente mayor en comparación con la cantidad de enzima acoplada en las perlas de vidrio. En última instancia es importante recordar que otra de las ventajas de usar nanotubos de carbono multipared, además de sus múltiples y conocidas propiedades físicas y químicas, es que cada uno de ellos actuara como un transductor individual proyectando a futuro su beneficio en el desarrollo de un dispositivo de biosensado para cuantificación de niveles bajos de sarcosina.

3.1.5 Evaluación actividad enzimática libre e inmovilizada.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

La comparación del efecto de pH en enzima comercial libre vs enzima purificada, Figura 18, indica un desfase en el pH de la purificada comparada con la comercial, mientras que en SOx comercial muestra un pH óptimo de trabajo en medio ácido y alrededor de un pH de 8.3, pH óptimo; la enzima purificada tiene un comportamiento de trabajo óptimo en un pH de 7.6. Aunque la actividad de las enzimas depende estrictamente del pH del medio debido al efecto que tiene el pH en el estado de protonación de grupos funcionales de aminoácidos y cofactores involucrados en la reacción catalítica y la estructura proteica nativa tridimensional de la enzima (Bisswanger, 2014) ni el pH óptimo ni el perfil de pH de una enzima tiene significado absoluto y ambos pueden variar según el parámetro que se represente y según las condiciones de las medidas.

Por ejemplo, la mayor actividad exhibida para sarcosina oxidasa extraída de *Bacillus sp.* fue presentada a pH 8.5 en buffer fosfato y es estable en un rango de 8.0 a 10 (Lui, 2010). Sarcosina oxidasa proveniente de *Cylindrocarpum didymum* M-1 mostró su mayor actividad en buffer fosfato a un pH 7.7 y en buffer glicilglicina en pH 8.0-8.5, la enzima fue encontrada estable en un rango de pH de 7 a 10 (Nobuhiro et al, 1980).

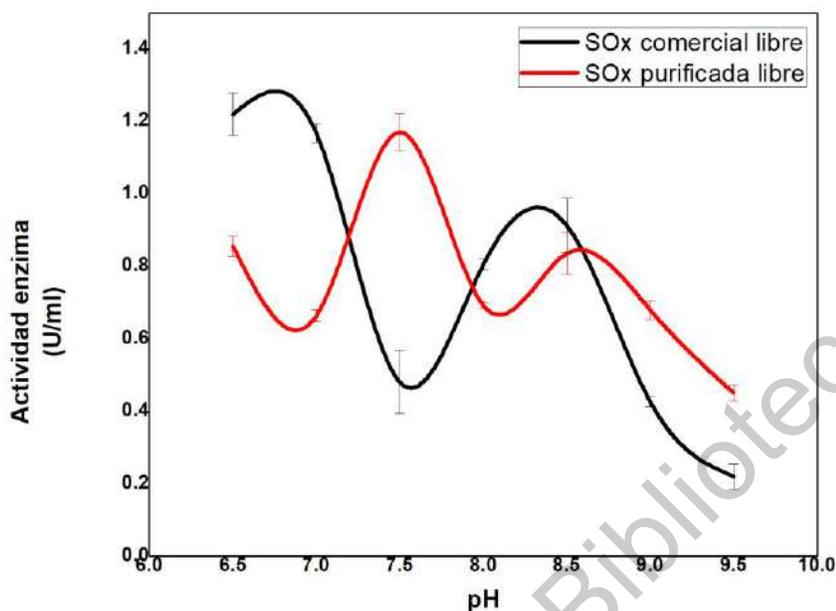


Figura 18. Comparación del efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidasa comercial y purificada.

Como se mencionó, las enzimas fueron inmovilizadas sobre nanotubos de carbono multipared (MWCNT), los resultados obtenidos perfilan una mejora en la actividad enzimática al ser inmovilizada para ambas enzimas, se observa en la Figura 19 el mismo comportamiento de trabajo donde se establece un pH óptimo alrededor de 8.5, y se tiene un rango de trabajo de 7.5 a 9. Asimismo se observa que el comportamiento tipo campana que está ausente en la enzima libre se presenta una vez que se soporta la enzima en los nanotubos, adicional a lo anterior las diferencias en la actividad de enzima respecto a un cambio de pH podrían catalogarse como no drásticos, por lo cual la inmovilización secunda una protección a la enzima en cuanto el estado de protonación de grupos funcionales de aminoácidos y cofactores involucrados en la reacción catalítica y la estructura proteica de la enzima ante cambios drásticos de pH de trabajo y evitando que su actividad se vea afectada.

Sarcosina oxidasa de *Arthrobacter sp.* inmovilizada covalentemente sobre perlas de vidrio de alquilamina y arilamina mostró un máximo de actividad a pH 7.5, el cual es más bajo que la enzima libre. Esto puede ser atribuido a la pérdida de de grupos $-NH_2$ en la superficie de la enzima por la inmovilización, debido a que la union a formaldehido y la diazotización involucra grupos $-NH_2$ del soporte tanto como de la enzima (Pundirm et al, 2010). La actividad de un sensor consistente en la inmovilización covalente de sarcosina oxidasa (SOx) de *Bacillus sp.* sobre el nanotubos de carbono de paredes múltiples carboxilados (cMWCNT) / quitosano (CHIT) y nanopartículas de cobre (CuNP), electrodepositados sobre electrodo de oro (Au) el pH óptimo tiene un valor de 7.0 (Narwal et al, 2018). Nuevamente, el pH óptimo de una enzima carece de significado absoluto y dependerá de las condiciones de trabajo por lo cual es un criterio que debe ser estudiado y adaptado a cada trabajo.

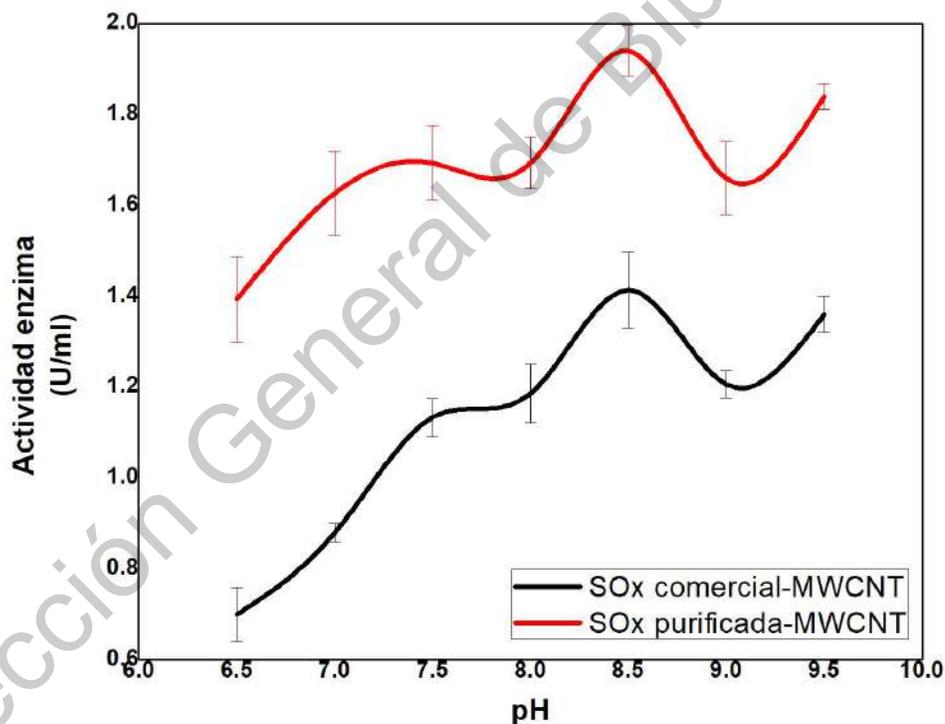


Figura 19. Comparación de efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidasa comercial y purificada inmovilizadas en nanotubos de carbono.

En la Figura 20 se muestra la comparación de enzima sarcosina oxidasa proveniente de *Pseudomona sp.*, donde contrasta la estabilidad que provee a la enzima la inmovilización en MWCNT. Adicionalmente se resalta que la menor actividad sarcosina oxidasa soportada se presenta a pH 6.5 donde retiene un 71.8% la actividad aún a este pH.

Considerando que el pH urinario varía de 4.5 a 8 (King et al, 2010). La orina es alcalina cuando su pH es mayor a 6.5 (Delgado et al, 2011), como sucede en dietas vegetarianas, ingesta de diuréticos, alcalosis respiratoria, vómito, acidosis tubular renal distal o tipo I y en aquellos casos donde la urea se convierta en amoníaco y aumente el pH —como sucede en las orinas procesadas tardíamente y en las infecciones por *Proteus spp*, productor de amoniaco gracias a la acción de la ureasa— (Cavagnaro, 2002). Por otra parte, cuando la orina tiene un pH menor a 6 se considera ácida y se da por dietas hiperproteicas, cetoacidosis diabética, infecciones por *E. Coli*, fiebre, acidosis respiratoria, aciduria por ácido mandélico y fosfórico, administración de fármacos como anfotericina B, espironolactona y Aines (Camuzano & Arbaláez, 2016), las pruebas en orina son viables dado la protección que brinda inmovilizar sobre nanotubos de carbono ante cambios de pH.

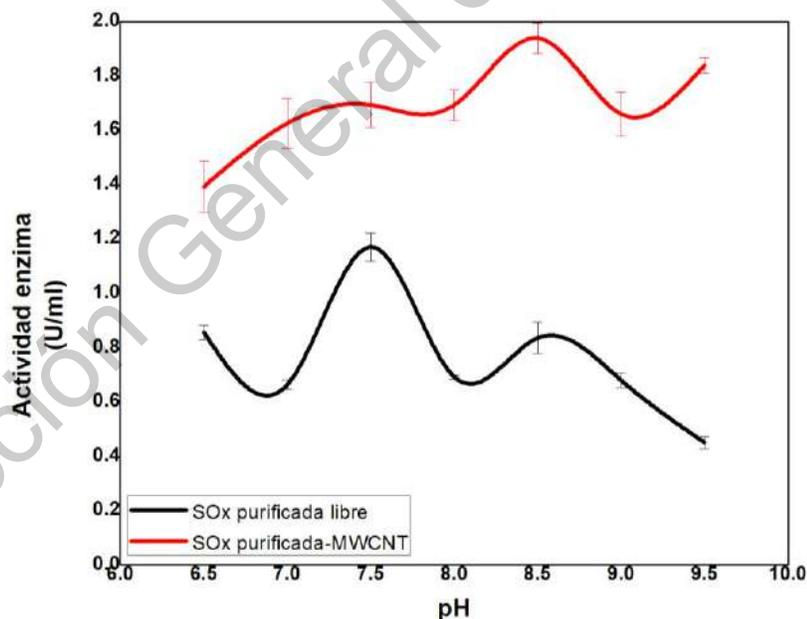


Figura 20. Comparación de efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidasa purificada libre e inmovilizada en nanotubos de carbono.

Efecto de temperatura sobre la actividad enzimática.

Al contrastar el comportamiento de actividad enzimática entre sarcosina oxidasa comercial y purificada, Figura 21, en diferentes condiciones de temperatura se observó que ambas enzimas de forma libre tienen una actividad óptima a 37 °C como es indicado por Suzuki (1981) en el protocolo de actividad empleado (Anexo A). La temperatura óptima para la enzima extraída de *Bacillus sp.* BSD-8 es de 60 °C (Lui, 2010), sarcosina oxidasa de *Cylindrocarpon didymum* tiene su mayor actividad al ser incubada a 45°C (Mori et al, 1980), es de mencionar que el buffer empleado en los casos mencionados es buffer fosfato y no glicilglicina.

Una vez que la enzima se encuentra soportada sobre nanotubos de carbono multipared la respuesta es favorable ya que el comportamiento de campana que mostró la enzima libre cambia y se observa, si bien la temperatura óptima de trabajo sigue siendo alrededor de 37°C, al variar estas temperaturas la actividad más baja mostrada a 15°C sigue conservando una actividad del aproximadamente 79.8%, planteando así la oportunidad de realizar las pruebas en orina a una temperatura ambiente (25 °C). Esta comparación se puede ver reflejada en la Figura 22 y Figura 23.

Se ha reportado en el caso de la enzima inmovilizada sobre perlas de vidrio la actividad máxima fue de 37°C para alquilamina y 45°C para arilamina. (Pundirm et al, 2010). Un electrodo xerografiado compuesto de sarcosina oxidasa tiene como temperatura óptima de trabajo 25°C (Rebelo, 2014). El electrodo de sarcosina de sarcosina oxidasa (SOx) inmovilizada sobre el nanotubos de carbono de paredes múltiples carboxilados (cMWCNT) / quitosano (CHIT) y nanopartículas de cobre (CuNP), electrodepositados sobre electrodo de oro (Au) encontró su máxima actividad en 35°C (Narwan et al, 2015). Para el electrodo de polianilina dopado con sarcosina oxidasa el registro de temperatura óptima fue 39.6°C. (Yang & Mu, 1996). Con lo anterior, se puede concluir que la temperatura óptima al igual que el pH no es un parámetro absoluto y se debe considerar las características del medio de trabajo.

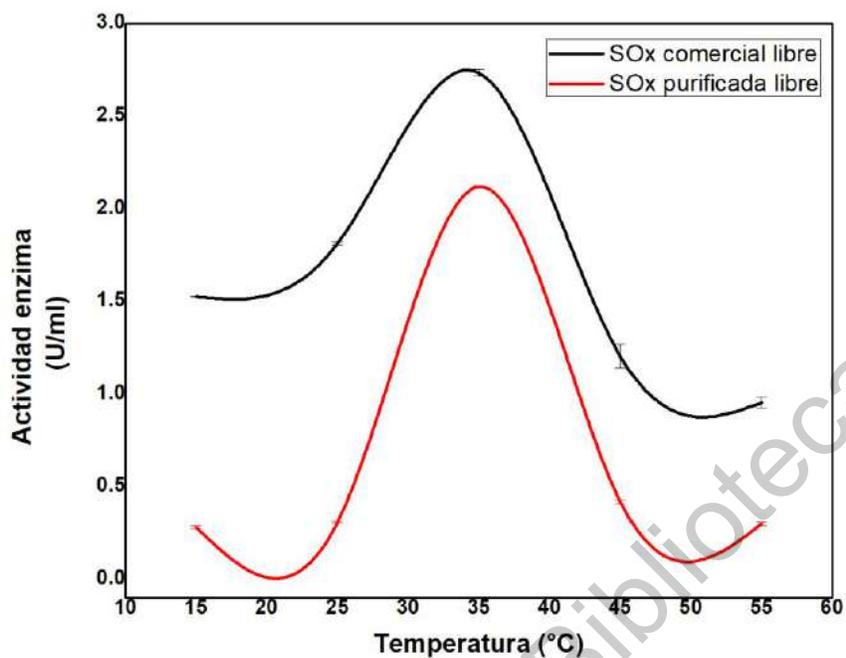


Figura 21. Comparación del efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidasa comercial y purificada.

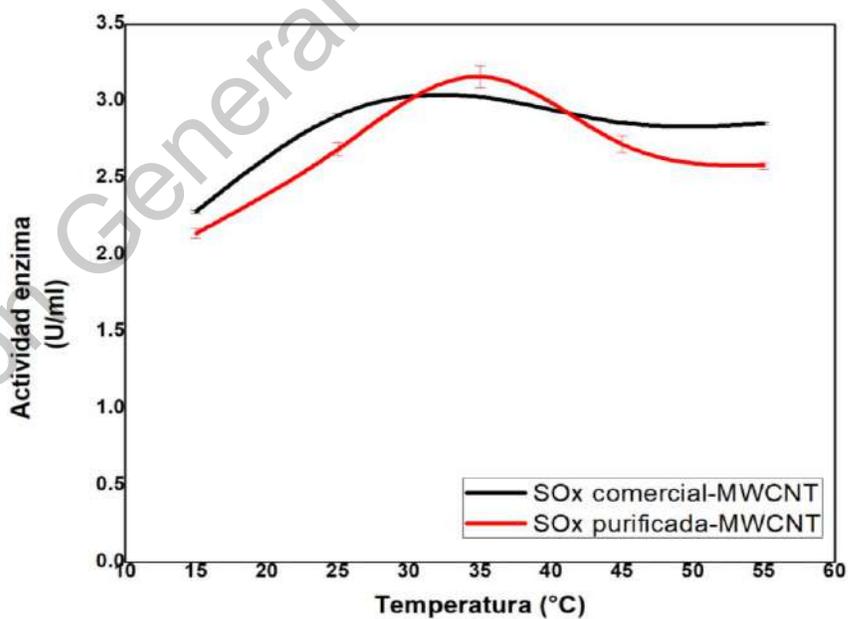


Figura 22. Comparación de efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidasa comercial y purificada inmovilizadas en nanotubos de carbono.

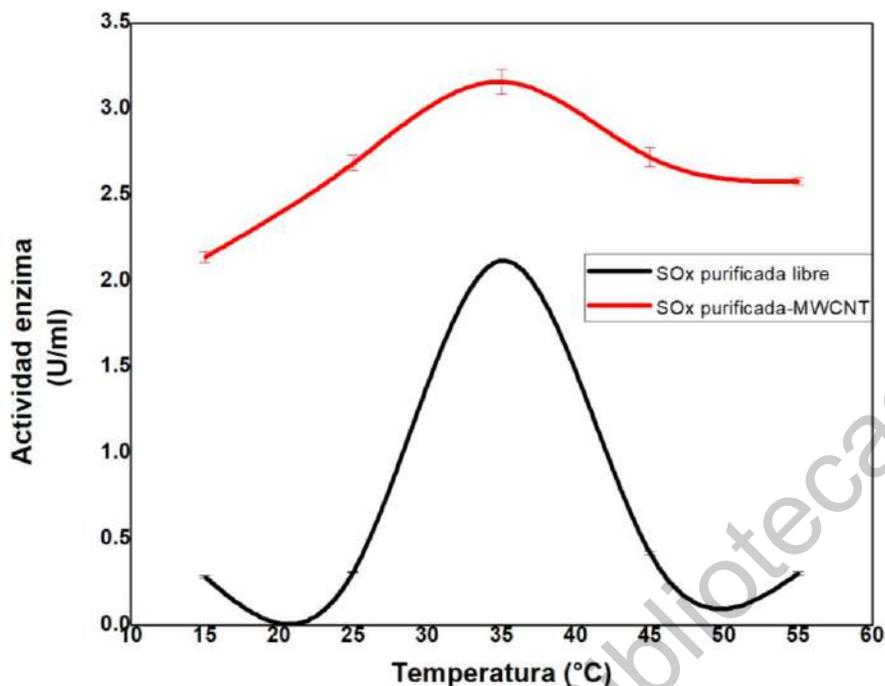


Figura 23. Comparación de efecto pH sobre actividad enzimática en sarcosina oxidasa purificada libre e inmovilizada en nanotubos de carbono.

Efecto de concentración de sustrato sarcosina sobre la actividad enzimática.

Una medida de la afinidad de unión según la ecuación de Michaelis-Menten es la constante de Michaelis (K_m), este valor indica la concentración del compuesto a la mitad de la saturación es decir, cuando la ocupación de los sitios de unión enzima-sustrato es del 50%, proceso que ocurre más eficientemente a concentraciones más bajas (Bisswanger, 2014).

En *brenda—enzymes.org* se reportan los siguientes K_m para sarcosina oxidasa obtenida de diferentes cepas bacterianas para el sustrato sarcosina:

Tabla 4. Constante de Michaelis (K_m) para sarcosina oxidasa de diferentes organismos y condiciones.

Organismo	K_m (mM)	Condiciones
0.01	Bacillus sp. (en Bacteria)	R49K mutant, pH 8.0, 25°C

0.285	Arthorbacter sp.	Enzima inmovilizada sobre perlas de vidrio de alquilamina, pH 7.8, 37°C
0.29	Bacillus sp. (en Bacteria)	Enzima nativa, pH 8.0, 25°C
0.91	Streptomyces sp.	-
1.379	Arthorbacter sp.	Enzima inmovilizada sobre perlas de vidrio de arilamina, pH=7.8, 37°C
1.47		K171A enzima mutante, pH 8.0, 25°C
1.72	Corynebacterium sp. U-96	K171R enzima mutante, pH 8.8, 25°C.
2.75		K171R enzima mutante, pH 8.0, 25°C
2.76		Enzima wild-type, pH 8.0, 25°C
3.1	Bacillus sp. (en Bacteria)	pH 8.5, 60°C
3.1		pH 8.5, 60°C
3.4	Corynebacterium sp. U-96	-
4.2	Achromobacter denitrificans	-
6-4	Paenarthrobacter ureafaciens	-
7.6	Bacillus sp. (en Bacteria)	Enzima nativa, pH 8.0, 25°C
12.2		-
17.4	Corynebacterium sp. U-96	K358R enzima mutante, pH 8.0, 25°C
28.8	Bacillus sp. (en Bacteria)	R49K enzima mutante, pH 8.0, 25°C
47.94	Bacillus sp. BSD-8	37°C, pH 8.0, enzima modificada con poli-lisina
50	Arthorbacter sp.	Enzima libre, pH 7.8, 37°C
141.6	Bacillus sp. (en Bacteria)	Enzima nativa reconstruida en sistema acuoso, pH 8.0, 37°C
141.65	Bacillus sp. BSD-8	Enzima soluble, pH 8.0, 37°C
141.65	Bacillus sp. (en Bacteria)	Enzima nativa, reconstruida con 20% de dimetilsulfóxido, pH 8.0, 37°C

Los ensayos de parámetros enzimáticos en laboratorio indicaron los resultados mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de sarcosina oxidasa pH 8.3, 37°C en diferentes condiciones.

Condiciones	V_{max} (mM/s)	K_m (mM)
Sarcosina oxidasa comercial	0.0799	143
Sarcosina oxidasa purifica 2 grados	0.0288	157.1
Sarcosina oxidasa comercial inmovilizada sobre nanotubos de carbono multipared	0.0267	53
Sarcosina oxidasa purifica 2 grados inmovilizada sobre nanotubos de carbono multipared.	0.0521	82

En la Figura 24, se observa el comportamiento de sarcosina oxidasa comercial y la purificada de forma libre e inmovilizada, cabe mencionar que para todos las condiciones la enzima muestra su velocidad máxima una vez alcanzada la concentración de 300 mM de sustrato sarcosina, en cuanto a los K_m se puede observar que la variación de enzima comercial y en estado libre tiene una variación de 14.1 mM, diferencia significativa que se proyecta disminuir conforme aumente el grado de pureza. Al comparar con los K_m reportados en la Tabla 5 , se puede considerar que la enzima obtenida de *Pseudomonas sp.* presenta un valor aceptable, considerando que el rango de valores de K_m entre 0.01 mM y 141.65 mM añadiendo que los valores más bajos reportador en la base de datos *Brenda-enzyme*, en su mayoría corresponde a enzimas mutadas, por ejemplo: R49K enzima mutante, pH 8.0, 25°C de *Bacillus sp.* (en Bacteria) con $K_m = 0.01$ mM o K171A, K171R enzimas mutantes, pH 8.0, 25 de *Corynebacterium sp.* U-96 con $K_m = 1.72$ y $K_m=2.75$ respectivamente. Donde la cepa bacteriana se ha modificado genéticamente y uno de los beneficios que busca este proyecto es el uso de cepas como *Pseudomonas sp.* que sin modificación alguna, de forma natural, produzca la enzima en cantidades óptimas.

La inmovilización sobre nanotubos de carbono multipared (MWCNT) presenta una respuesta favorable y encamina el proyecto a buen término debido a que la K_m de sarcosina oxidasa comercial disminuye un 62.93% del estado libre, y sarcosina oxidasa 2° disminuye 47.8%, recordando que la constante de Michaelis (K_m) corresponde a la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción alcanza un valor igual a la mitad de la máxima, en otras palabras, es

la concentración del sustrato cuando la mitad de los puntos de enlace activos de una enzima es ocupada por el sustrato. La constante ayuda a representar la afinidad de la enzima para su sustrato. Una enzima con una alta K_m tiene una afinidad inferior para el sustrato, y una alta concentración del sustrato es necesaria para que la enzima se sature. Inversamente, una enzima con una baja K_m tiene una alta afinidad para el sustrato y la enzima puede saturarse incluso con una pequeña cantidad de sustrato. Por lo tanto, la inmovilización enzimática mejora la afinidad de ésta por el sustrato, lo cual será beneficioso al querer detectar bajas concentraciones de sarcosina en muestras de orina.

En la inmovilización covalente de sarcosina oxidasa de *Arthrobacter sp.* sobre perlas de vidrio de alquilamina y arilamina los valores de K_m fueron 0.285mM para alquilamina y 1.379 mM para arilamina, el cual es más bajo que la enzima libre (50 mM) indicando el incremento de la afinidad por la enzima después de inmovilización, V_{max} fue de 80 $\mu\text{mol}/\text{min}$ para alquilamina y 47.62 $\mu\text{mol}/\text{min}$ para arilamina. Los cambios en los parámetros cinéticos son controlados por cuatro factores: i) cambio en la conformación de enzima, ii) efectos estéricos, iii) efectos del microambiente y iv) efectos en bulto y de difusión. En este trabajo de Pundir et al., 2010, el aumento de la afinidad fue de 99.484% y 97.242% respectivamente para alquilamina y arilamina, indicando que la afinidad puede ser incrementada en gran porcentaje, una evaluación de la inmovilización de sarcosina oxidasa sobre nanotubos de carbono y de las propiedades de detección del electrodo serán importantes en futuras investigaciones para obtener niveles de detección lo más bajos posibles.

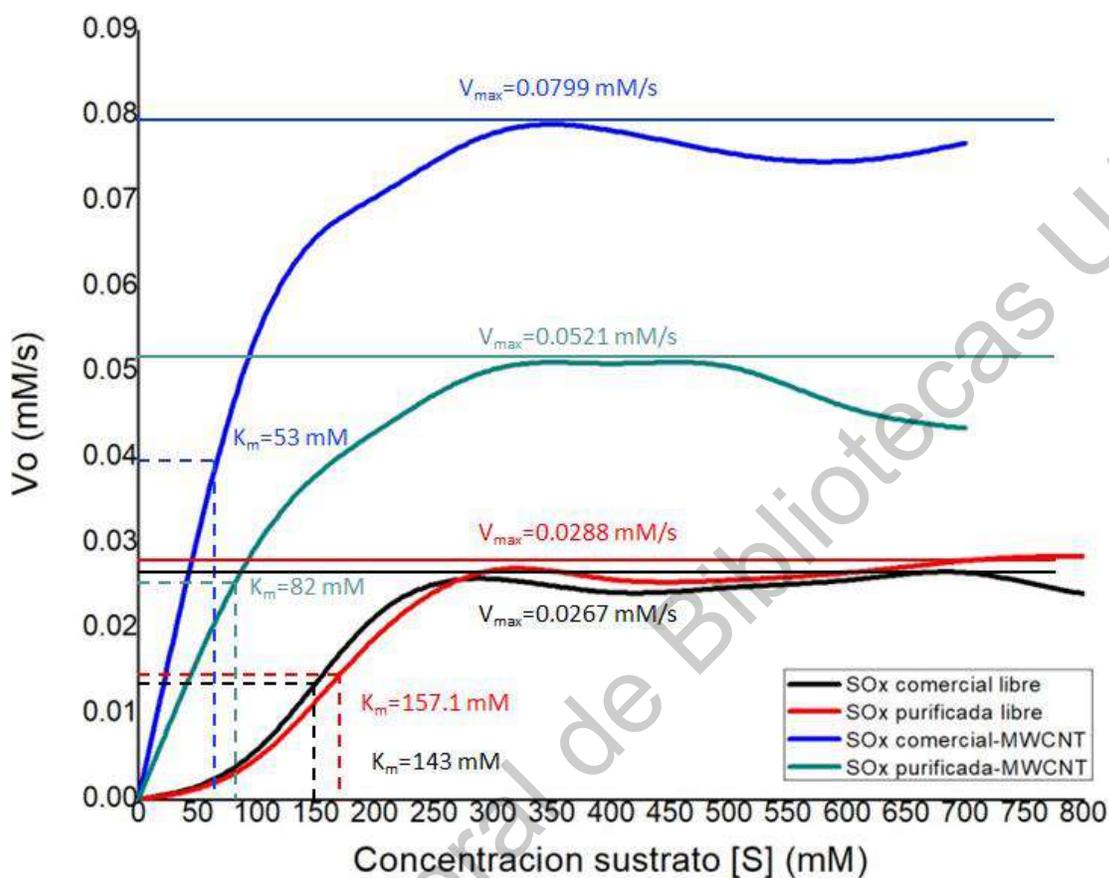


Figura 24. Parámetros cinéticos de sarcosina oxidasa pH 8.3, 37°C en diferentes condiciones.

3.1.6 Ensayo de inhibición de enzima.

De forma complementaria se llevaron a cabo pruebas de actividad enzimática considerando que se proyecta pueda detectar sarcosina en orina y ante la preocupación de algún posible proceso inhibitorio por algún componente en orina (Brooks & Keevil, 1996). Las condiciones de composición de orina se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes de orina

Componente	Cantidad (g)	Concentración (mM)
Peptona	1	

Extracto de levadura	0.005	
Ácido láctico	0.1	1.1
Ácido cítrico	0.4	2
Bicarbonato de sodio	2.1	25
Urea	10	170
Ácido úrico	0.07	0.4
Creatinina	0.8	7
Cloruro de calcio·2H ₂ O	0.37	2.5
Cloruro de sodio	5.2	2.5
Sulfato de hierro II ·7H ₂ O	0.0012	0.005
Sulfato de magnesio·7H ₂ O	0.49	2
Sulfato de sodio·7H ₂ O	3.2	10
Cloruro de amonio	1.3	25

Nota: las cantidades señaladas son requeridas para la preparación de 1 litro de orina simulada en buffer fosfato (Brooks & Keevil, 1996).

Las pruebas se realizaron en sarcosina oxidasa purificada 2 grados de pureza soportada en nanotubos de carbono multipared, para este ensayo se dividieron los componentes en varias muestras para identificar de forma más rápida y sencilla algún componente que inhibiera la actividad enzimática. La composición de cada muestra se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición de cada muestra utilizada en ensayo de inhibición enzimático.

Numero de muestra	Componentes
1	Blanco (sin componente)
2	Urea
3	Creatinina
4	Sulfato de hierro II ·7H ₂ O Sulfato de magnesio·7H ₂ O Sulfato de sodio·7H ₂ O
5	Cloruro de calcio·2H ₂ O

	Cloruro de sodio
	Cloruro de amonio
6	Ácido láctico
7	Ácido úrico
8	Peptona
9	Bicarbonato de sodio

Los resultados obtenidos refieren que los componentes de orina no son inhibidores para sarcosina oxidasa inmovilizada en nanotubos de carbono brindando la posibilidad de seguir con investigaciones que permitan el desarrollo del sistema de biosensado para detección de cáncer de próstata de forma oportuna y exacta, en la Figura 25 se observa que no hay una diferencia significativa en la actividad de sarcosina oxidasa inmovilizada. Además es conocido que el ácido (metiltio) acético (MTA) y el ácido pirrol-2-carboxílico (PCA) son inhibidores competitivos de sarcosina oxidasa (Trickey et al, 1999). Estudios de sarcosina oxidasa de *Cylindrocarpus didymum* M-1, reportaron inhibición por Ag⁺, Cu⁺, Hg²⁺, p-cloromercuribenzoato e iodoacetato. Sarcosina oxidasa de *Bacillus* sp. BSD-8 f fue inhibida dramáticamente por Ag⁺, Hg²⁺, SDS and Tween 80 (polisorbato 80: un aditivo alimentario con acción detergente). (Liu et al, 2010).

Los inhibidores anteriores no se presentan como parte de la orina. Los iones y compuestos anteriormente mencionados como inhibidores no son componentes de la orina y no debería existir presencia de ellos en esta, al menos en concentración considerable, si esto sucediera para algunos sería indicativo de intoxicación, como el mercurio; o enfermedad, por ejemplo, la enfermedad de Wilson, una enfermedad congénita, transmitida por herencia autonómica recesiva que se caracteriza por la acumulación tóxica en el organismo de cobre procedente de la dieta, y esto ocurre especialmente en el hígado y en el cerebro. (Foruny & Boixeda, 2010)

El biosensor amperométrico de sarcosina basado en la inmovilización covalente de sarcosina oxidasa (SarOx) sobre el nanotubos de carbono de paredes múltiples carboxilados (cMWCNT) / quitosano (CHIT) y nanopartículas de cobre (CuNP), electrodepositados sobre electrodo de oro

(Au). Desarrollado por Narwan et al., 2018 no tuvo ningún efecto de inhibición en la respuesta del biosensor en las condiciones estándar ante la presencia de ácido cítrico, glucosa, ácido glutámico, urea y ácido ascórbico en sus concentraciones fisiológicas

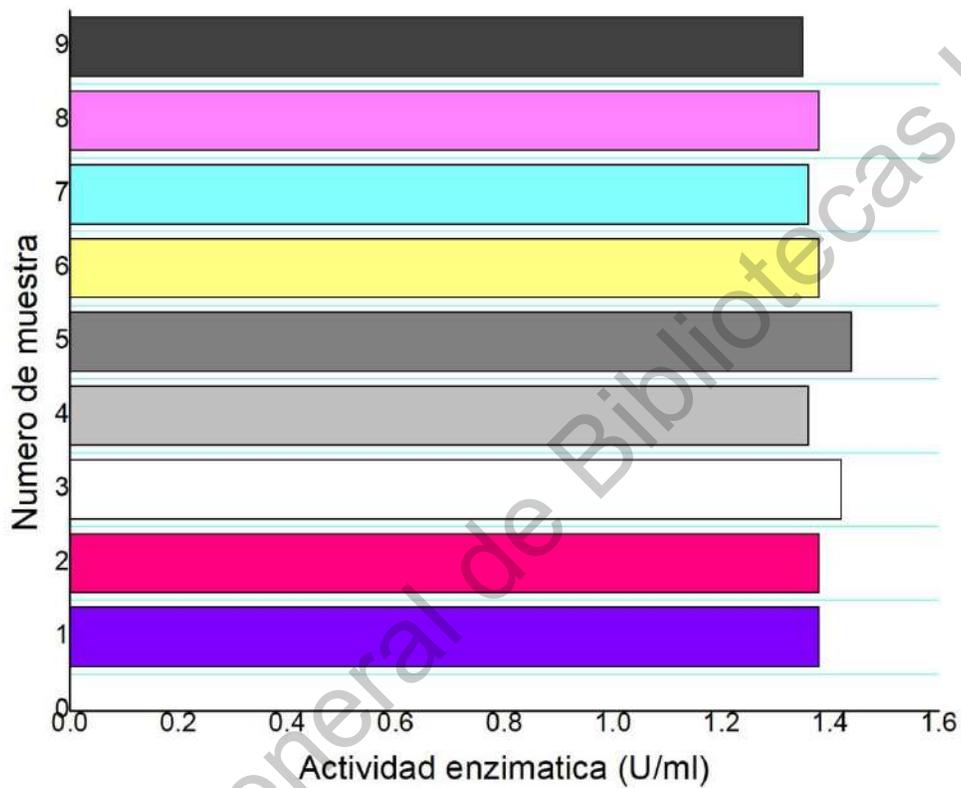


Figura 25. Comparación de actividad enzimática en presencia de diferentes componentes de la orina.

4 Trabajo futuro.

El alcance de este proyecto de investigación proyecta llegar hasta el desarrollo del sistema de biosensado para detección de cáncer en orina, es así que se alienta a seguir con el trabajo del desarrollo de sensado y miniaturización del mismo. Sin embargo, el objetivo inmediato que se deben plantear al dar seguimiento del presente trabajo es la purificación de sarcosina oxidasa mediante cromatografía líquida.

La cromatografía líquida de alta eficacia o high performance liquid chromatography es una técnica de separación de mezcla altamente usada en biología molecular (HPLC) debido a que permite realizar el fraccionamiento enzimático de una forma más selectiva y específica a la enzima de interés, en virtud de que el desarrollo de la presente tesis solo contempló el fraccionamiento de sarcosina oxidasa hasta la dialización del extracto, en este apartado se proveen condiciones que pueden servir de guía para continuar con el proceso de purificación mediante cromatografía permitiendo obtener mayor grado de pureza mejorando así sus parámetros cinéticos.

El extracto dializado deberá someterse a un proceso de cromatografía de intercambio iónico, para la purificación de sarcosina oxidasa se deberá usar una columna de intercambio aniónico y condición de pH mayor a 5.3 debido a que en pH 5.3 sarcosina oxidasa tiene su punto isoeléctrico (pI), recordando que es el punto donde la enzima tiene carga neta cero debido al equilibrio de todas las cargas positivas y negativas. Cuando el pH es más bajo que el punto isoeléctrico, habrá alta concentración de protones y los equilibrios se desplazarán hacia a izquierda. Cuanto más bajo sea el pH de la carga de la molécula será más positiva o bien menos negativa; es entonces, que cuando el pH sea más bajo que el pI de enzima esta tendrá carga positiva, cuando el pH sea más alto que el pI de la molécula esta y tendrá carga negativa.

En el caso de cromatografía por intercambio aniónico la fase estacionaria esta cargada positivamente, se recomienda utilizar la resina Macro-prep High Q resin la cual contiene grupos funcionales de amina cuaternaria que es ideal para la purificación de proteínas ácidas y neutras- una

proteína ácida es aquella que tiene un punto isoeléctrico <7 .

Por lo tanto, la fase estacionaria insoluble lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil (enzima dializada), la cual suele ser una disolución acuosa con cantidades moderadas de metanol u otro disolvente orgánico miscible con agua que contiene especies iónicas generalmente en forma de buffer. Los iones de ésta compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria.

Las muestras recolectadas después del proceso de purificación deben ser estudiadas mediante ensayos de actividad y electroforesis para determinar el grado de pureza. Se aconseja realizar una nueva caracterización bioquímica de la enzima en solución e inmovilizada, siguiendo la actividad mediante la detección del biomarcador sarcosina a través de la determinación del formaldehído (410 nm) generado durante el proceso de desmetilación oxidativa de la sarcosina catalizado por la sarcosina oxidasa purificada.

5. Conclusión

La selección de *Pseudomonas aeruginosa* como cepa de trabajo ha sido adecuada debido a su capacidad de adaptación, se plantea trabajar con otros microorganismos que presenten los mismos beneficios y permitan producciones exitosas de enzimas. El uso de medio LB suplementado con sarcosina como sustrato en una concentración 20mM como fuente de carbono y de energía de la bacteria resultó efectiva, forzando a la bacteria a producir la enzima sarcosina oxidasa alcanzando un producción máxima entre las 16 y 17 horas después de la inoculación.

Sarcosina oxidasa es un metabolito primario secretado de forma extracelular, característica que facilita la extracción enzimática al evitar un proceso de rompimiento de membrana celular y permitir la recuperación de la enzima directamente del medio de cultivo retirando el material bacteriano por centrifugación; el desarrollo de este proyecto permitió evaluar las propiedades de sarcosina oxidasa hasta dos grados de pureza, las cuales mostraron resultados favorables en los parámetros cinéticos de enzima tanto libre como inmovilizada por lo cual permite proyectar resultados óptimos una vez que la enzima pueda ser purificada mediante cromatografía líquida de alta eficacia, proceso descrito en el apartado de “trabajo futuro”.

La inmovilización de SOx sobre nanotubos de carbono multipared (MWCNT) mostró un rendimiento del 70.11% acoplándose 14.2 µg de sarcosina oxidasa por mg de soporte (MWCNT). Inmovilizar a sarcosina oxidasa presenta un efecto notable al mejorar la actividad enzimática permitiendo condiciones de trabajo en rangos más amplios de pH y temperatura, lo que abre un panorama a un desarrollo exitoso del sistema de biosensado - creando sistemas de diagnóstico en etapas tempranas permitiendo tener mayor expectativa de vida además de la reducción en la tasa de falsos positivos y negativos- al ser pruebas más específicas y sensibles. Sarcosina oxidasa inmovilizada, ante cambios de pH, retiene 71.8% de su actividad mayor en comparación con la menor actividad presentada a pH 6.5; en cuanto a cambios de temperatura, mientras que para la actividad más baja a 15°C la retención de actividad es de 79.8%.

El comportamiento cinético de sarcosina oxidasa ⁷³ fue modificado de forma favorable, el soporte enzimático sobre nanotubos de carbono multipared redujo la constante de Michaelis (K_m) en un

47.80% para sarcosina oxidasa con 2° de pureza y en 62.93% para enzima comercial Sigma-Aldrich. La constante ayuda a representar la afinidad de la enzima para su sustrato, entre más pequeño es el valor mayor afinidad presenta, es así que se concluye que la inmovilización previene la desnaturalización de sarcosina, mejora la actividad ante virajes en condiciones de pH y temperatura y presenta mayor afinidad al sustrato sarcosina.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6. Bibliografía

1. Henry, N. L., & Hayes, D. F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular oncology*, 6(2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>.
2. Buxbaum, E. (2015). Enzymes Are Biocatalysts. *Fundamentals of Protein Structure and Function*, 97–110. doi:10.1007/978-3-319-19920-7_4
3. Buchholz, K., Kasche, V., & Bornscheuer, U. T. (2012). *Biocatalysts and enzyme technology*. John Wiley & Sons.
4. Bioquímica de Laguna. (s. f.). Recuperado noviembre de 2021, de https://www.manualmoderno.com/apoyos_electronicos/9786074482911/galeria_entrada.php?cap=12&imagen_inicial=24
5. de María, Pablo D., Gonzalo de Gonzalo, and Andrés R. Alcántara 2019. "Biocatalysis as Useful Tool in Asymmetric Synthesis: An Assessment of Recently Granted Patents (2014–2019)" *Catalysts* 9, no. 10: 802. <https://doi.org/10.3390/catal9100802>
6. Chung S.M., Jin K.R. Method for Producing Fatty Acid, Glycerol or Unsaturated Fatty Acid Using Monoacylglycerol-Specific lipase AtMAGL6 or AtMAGL8 Protein. 101730078B1. *KR Patent*. 2017 Apr 25; [[Ref list](#)]
7. 32. Guan-Chiun L., Ting-Chun K. Methods for Producing Biodiesel by Recombinant Lipase. 9970035B2. *U.S. Patent*. 2018 May 15
8. *US Patent for Biosensor with peroxidase enzyme Patent (Patent # RE 41,264 issued April 27, 2010) - Justia Patents Search*. (2006, 27 julio). Recuperado noviembre de 2021, de <https://patents.justia.com/patent/RE41264>
9. Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
10. R. Shekher, S. Sehgal, M. Kamthania, A. Kumar. (2011), *Enzyme*(Res., Article ID 217861
11. Othman, Abdelmageed M, González-Domínguez, Elena, Sanromán, Ángeles, Correa-Duarte, Miguel, Moldes, Diego (2016). *Immobilization of laccase on functionalized*

- multiwalled carbon nanotube membranes and application for dye decolorization*. RSC Advances, The Royal Society of Chemistry. DO - 10.1039/C6RA18283F
12. R.V. Mundra, X. Wu, J. Sauer, J.S. Dordick, R.S. Kane, (2014) *Curr. Opin. Biotechnol.*, 28, 25.
 13. R.J. Lopez, S. Babanova, Y. Ulyanova, S. Singhal, P. Atanassov, *Chem* (2014). *Electrochem.*, 1, 241.
 14. S. Boncel, A. Zniszczoł, K. Szymańska, J. Mrowiec-Białoń, A. Jarzębski, K.Z. Walczak.(2013) *Enzyme Microb. Technol.*, 53.
 15. C. Zhang, S. Luo, W. Chen, (2013), *Talanta*, 113, 142.
 16. R. Pang, M. Li, C. Zhang, (2015), *Talanta*, 131, 38.
 1. MONTIEL Pacheco,Carmina, Bustos Jaimes, Ismael (2014). "Procesos enzimáticos amigables con el ambiente" *Revista Digital Universitaria [en línea].*, Vol. 15, No.11 [Consultada:]. Disponible en Internet:
<<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art92/index.html>> ISSN: 1607-6079.
 17. Yamkamon, V., Phakdee, B., Yainoy, S., Suksrichawalit, T., Tatanandana, T., Sangkum, P., & Eiamphungporn, W. (2018). Development of sarcosine quantification in urine based on enzyme-coupled colorimetric method for prostate cancer diagnosis. *EXCLI journal*, 17, 467-478. doi:10.17179/excli2018-145
 18. Burton C., Gamagedara S., Ma Y., A novel enzymatic technique for determination of sarcosine in urine samples, *Anal Methods* 4 (2012),141-146, <http://dx.doi.org/10.1039/c1ay05541k>.
 19. Peter Trickey, Mary Ann Wagner, Marilyn Schuman Jorns, F Scott Mathews, Monomeric sarcosine oxidase: structure of a covalently flavinylated amine oxidizing enzyme, *Structure*, Volume 7, Issue 3, 1999, Pages 331-345, ISSN 0969-2126, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80043-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80043-4).
 20. Joseph A. Ludwig & John N. Weinstein, Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection, *Nature Reviews Cancer* volume 5, pages 845-856 (2005)
 21. Wu, Li & Qu, Xiaogang. (2015). Cancer biomarker detection: Recent achievements and challenges. *Chemical Society reviews*. 44. 10.1039/c4cs00370e.
 22. Begard Kavosi, Abdollah Salimi, Rahman Hallaj, Kamal Amani (2013),
 23. A highly sensitive prostate-specific antigen immunosensor based on gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded on MWCNTS/chitosan/ionic liquid nanocomposite, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 52, Pages 20-28, ISSN 0956-5663,

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.08.012>.

24. Easton, D.F., Ford, D., Bishop, D.T., 1995. *Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers*. Breast Cancer Linkage Consortium. Am. J. Hum. Genet. 56, 265e271.
25. Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F.L., Walker, M.G., Watson, D., Park, T., Hiller, W., Fisher, E.R., Wickerham, D.L., Bryant, J., Wolmark, N., 2004. *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. N. Engl. J. Med. 351, 2817e2826. Petricoin, E.F., Ardekani, A.M., Hitt, B.A., Levine, P.J., Fusaro, V.A.
26. Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W., Hayes, D.F., 2004. *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. N. Engl. J. Med. 351, 781e791
27. Allegra, C.J., Jessup, J.M., Somerfield, M.R., Hamilton, S.R., Hammond, E.H., Hayes, D.F., McAllister, P.K., Morton, R.F., Schilsky, R.L., 2009. American Society of Clinical Oncology *Provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy*. J. Clin. Oncol. 27, 2091e2096.
28. Locker, G.Y., Hamilton, S., Harris, J., Jessup, J.M., Kemeny, N., Macdonald, J.S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F., Bast Jr., R.C., 2006. *ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer*. J. Clin. Oncol. 24, 5313e5327.
29. Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F., Bast Jr., R.C., 2007. *American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer*. J. Clin. Oncol. 25, 5287e5312.
30. Rustin, G.J., van der Burg, M.E., Griffin, C.L., Guthrie, D., Lamont, A., Jayson, G.C., Kristensen, G., Mediola, C., Coens, C., Qian, W., Parmar, M.K., Swart, A.M., 2010. *Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial*. Lancet 376, 1155e1163.
31. Bhatt, A. N., Mathur, R., Farooque, A., Verma, A., & Dwarakanath, B. S. (2010). Cancer biomarkers-current perspectives. *Indian J Med Res*, 132(2), 129.
32. Heger Z, Cernei N, wagner Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Babula P, Eckschlager T, Stiborova M, Kizek R, Adam V. Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker--a review.

Int J Mol Sci. 2013 Jul 4;14(7):13893-908. doi: 10.3390/ijms140713893. PMID: 23880848; PMCID: PMC3742224.

33. Instituto Nacional de Cancerología. (s. f.). OpusIncanMX | Tu programa guardián de próstata. Prostata México. Recuperado noviembre de 2021, de <https://prostatamexico.org/>
34. Narwal, Vinay & Kumar, Parveen & Joon, Pooja & Pundir, C.S.. (2018). *Fabrication of an amperometric sarcosine biosensor based on sarcosine oxidase/Chitosan/CuNPs/c-MWCNT/Au electrode for detection of prostate cancer*. Enzyme and Microbial Technology. 113. 10.1016/j.enzmictec.2018.02.010.
35. Sánchez Barriga, Juan Jesus. «Tendencias de mortalidad y años potenciales de vidas perdidos por cáncer de próstata en los 32 estados y en las 7 regiones socioeconómicas de México en el periodo 2005-2010.» Gaceta Médica de México (2013): 149:576-85.
36. PROFECO. (17 de junio de 2019). *Cuida tu próstata y regálale vida*. Recuperado septiembre de 2021, de <https://www.gob.mx/profeco/documentos/cuida-tu-prostata-y-regalate-vida?state=published>
37. Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). *Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors*. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
38. Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
39. Allen T, Mark W. 2004. Desalting, Concentration, and Buffer Exchange by dialysis and ultrafiltration. *Current protocols in protein science* 4.4.1-4.4.15. John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
40. Handbook GEb. (2006). *Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography: Principles and Methods*. GE Healthcare. Uppsala Sweden Mary Ann Wagner, Marilyn Schuman Jorns (1997), *Folate Utilization by Monomeric versus Heterotetrameric Sarcosine Oxidases*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 342, Issue 1. Pages 176-181, ISSN 0003-9861, <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0106>.
41. Graham G. Willsey, Matthew J. Wargo. *Sarcosine Catabolism in Pseudomonas aeruginosa Is Transcriptionally Regulated* by SouR *Journal of Bacteriology* Dec 2015, 198 (2) 301-310; DOI: 10.1128/JB.00739-1
42. Hampel KJ, LaBauve AE, Meadows JA, Fitzsimmons LF, Nock AM, Wargo MJ. *Characterization of the GbdR regulon in Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2014

Jan;196(1):7-15. doi: 10.1128/JB.01055-13. Epub 2013 Oct 4. PMID: 24097953; PMCID: PMC3911141.

43. Referencia glicina: Hishinuma, F., K. Izaki, and H. Takashashi. 1969. Effects of glycine and D-amino acids on growth of various microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 33:1577- 1586.
44. Fitzsimmons LF, Hampel KJ, Wargo MJ. Cellular choline and glycine betaine pools impact osmoprotection and phospholipase C production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2012 Sep;194(17):4718-26. doi: 10.1128/JB.00596-12. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22753069; PMCID: PMC3415529.
45. *Dialysis Methods for Protein Research | Thermo Fisher Scientific - NL.* (s. f.). Recuperado octubre de 2021, de <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/dialysis-methods-protein-research.htm>
46. *US Patent for Biosensor with peroxidase enzyme Patent (Patent # RE 41,264 issued April 27, 2010) - Justia Patents Search.* (2006, 27 julio). Recuperado noviembre de 2021, de <https://patents.jus> King-Strasinger S, Schaub-Di Lorenzo M. Análisis de la orina y de los líquidos corporales. 5th ed. Madrid: Ed. Med. Panamericana; 2010.
47. Delgado-Campos L, Rojas-Jiménez M, Carmona-Robles M. (2011). Análisis de una muestra de orina por el laboratorio. Libros de laboratorio. Recuperado 2021 de: <http://goo.gl/9Pb7FP>
48. Cavagnaro F. Análisis de orina. In: Guiraldes E, Ventura-Juncá P, editors. *Manual de Pediatría.* Santiago de Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile. Recuperado 2021: <http://goo.gl/mNSE4g>.
49. Campuzano-Maya G, Arbeláez-Gómez M. El Uroanálisis: un gran aliado del médico. *Revista Urología Colombiana.* 2007;16(1):67-92
50. MORI, Mamoru SANO, Yoshiki TANI and Hideaki YAMADA (1980) Purification and Properties of Sarcosine Oxidase from *Cylindrocarpus didymum* M-I Nobuhiro. *Agric. Biol. Chem.*, 44 (6), 1391,..., 1397. tia.com/patent/RE41264
51. Liu H, Sun G, Ma X, Sun L, Lu X, Zhang P. [Purification and characterization of a sarcosine oxidase from *Bacillus* sp. BSD-8]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2010 Mar;26(3):335-40. Chinese. PMID: 20518346.
52. Foruny Olcina, J. R., & Boixeda de Miquel, D.. (2010). Enfermedad de Wilson. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 102(1), 53-54. Recuperado en 09 de noviembre de 2021, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082010000100009&lng=es&tlng=es
53. Bisswanger Hans, (2014), *Enzyme assays*, Perspectives in Science, Volume 1, Issues 1–6,

Pages 41-55, ISSN 2213-0209, <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>. Recuperado 2021 de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213020914000068>

54. Anonimo (2020). The Effect of pH on Enzyme Kinetics. (September 1). <https://chem.libretexts.org/@go/page/41367>
55. Nobuhiro Mori, Mamoru Sano, Yoshiki Tani & Hideaki Yamada (1980) *Purification and Properties of Sarcosine Oxidase from Cylindrocarpon didymum M-1*, Agricultural and Biological Chemistry, 44:6, 1391-1397, DOI: 10.1080/00021369.1980.10864124
56. Pundir, C S, Chauhan, Nidhi, Kumari, Garima, Vandana (2010). *Immobilization of Arthrobacter sarcosine oxidase onto alkylamine and arylamine glass and its application in serum sarcosine determination*. Indian Journal of Biotechnology. Vol 10, pp 219-223. ISSN: 0975-0967 (Online); 0972-5849 (Print)
57. Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). *One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE)*. *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*, 151–159. doi:10.1016/b978-0-12-420119-4.00012-4
58. Rebelo, T. S. C. R., Pereira, C. M., Sales, M. G. F., Noronha, J. P., Costa-Rodrigues, J., Silva, F., & Fernandes, M. H. (2014). Sarcosine oxidase composite screen-printed electrode for sarcosine determination in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 850,
59. Yang, Y., & Mu, S. (1996). The bioelectrochemical response of the polyaniline sarcosine oxidase electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 415(1-2), 71–77. doi:10.1016/s0022-0728(96)04702-x
60. Manuel Tena Aldave, Jesús V. Jorrín. *Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería*. Novo Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba
61. Rogers A., Gibon Y. (2009) *Cinética enzimática: teoría y práctica*. En: Schwender J. (eds) *Plant Metabolic Networks*. Springer, Nueva York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78745-9_4
62. Yábar Varas, Carlos. *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN / Elaborado por Carlos Yábar Varas*. — Lima : Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2003. 59 p. : 30 cm. — (Serie de Normas Técnicas; 38)
63. Suzuki, M. (1981) *J. Biochemistry* 89, 599-607.
64. (Del Valle, L.J, s.f.) *III-Materiales y métodos*. Recuperado de: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/6441/06Ljvm06de12.pdf?sequence=6&isAllowed=y>
65. Brooks T. and Keevil C. W. (1996) *A simple artificial urine for the growth of urinary*

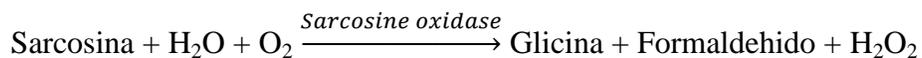
pathogens Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury,
Wiltshire, UK. 1174/96: received 22 July 1996 and accepted 25 July 1996

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ANEXOS

Anexo A. Ensayo de actividad enzimática sarcosina oxidasa.

Principio:



Condiciones: T = 37°C, pH = 8.3, A=410nm

Método: espectrofotométrico

Reactivos:

A. 60 mM Buffer glicilglicina, pH 8.3 at 37°C (Preparar 100 ml en agua desionizada usando gly-gly, Free Base, Sigma Prod. No. G-1002. Ajustar a pH 8.3 at 37°C con 1 M NaOH.)

B. 300 mM Solución de sarcosina (Preparar en Reactivo A usando sarcosina, Free Base, Sigma Prod. No. S-9881.)

C. 500 mM Ácido acético (CH₃COOH) (Preparar en agua desionizada usando Ácido acético Glacial, Sigma Prod. No. A-6283.)

D. 2 M Solución acetato de amonio) (Preparar en agua desionizada usando Acetatode amonio, Sigma Prod. No. A-7262.)

E. Isopropanol (Use Isopropanol, Anhydrous, Sigma Stock No. 405-7.)

F. Acetylacetone (Use Acetylacetone, Sigma Prod. No. A-3511.)

G. Color Reagent (Preparar añadiendo 20 ml of Reactivo D a 40 ml de Rectivo E. Entonces añadir 0.15 ml of Reagent F. Agitar y dejar en almacenamiento toda una noche entre 0-5°C.)

H. Solución de enzima sarcosina oxidasa (Inmediatamente antes de usar, preparar solución 0.5 -

1.0 unidades/ml of Sarcosina Oxidasa en Reactivo A 4°C.

PROCEDIMIENTO

Pipetear (en mililitros) los siguientes reactivos en tubos Falcon:

	Test	Blank
Reactivo A (Buffer)	0.20	0.30
Reactivo B (Sarcosina)	0.20	0.20

Mezclar y equilibrar a 37°C. Entonces añadir:

Reactivo H (Solución enzima)	0.10	-----
------------------------------	------	-------

Mezclar e incubar por 10 minutos a 37°C. Entonces añadir

Reactivo C (CH ₃ COOH)	0.50	0.50
-----------------------------------	------	------

Mezclar y añadir:

Reactivo G (Reactivo color)	3.00	3.00
-----------------------------	------	------

Mezclar e incubar a 60°C por 30 minutos. . Reaizar medición en UV-vis a A=410 nm.

Cálculos:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{(A_{410nm})(4)(df)}{(10)(8)(0.1)}$$

4=Total volumen de ensayo (en mililitros)

df= Factor de dilución

10= Tiempo de ensayo (minutos) por definición de unidad

8= Coeficiente de extinción molar.

0.1 = Volumen de enzima usada (en mililitros)

$$\text{Unidades/mg solido} = \frac{U/\text{ml enzima}}{\text{mg solido/ml enzima}}$$

$$\text{Unidades/mg protein} = \frac{U/\text{ml enzima}}{\text{mg protein/ml enzima}}$$

Definición UNIDAD: Una unidad formará 1.0 μmol de formaldehído a partir de sarcosina por minute (pH 8.3 T=37°C)

Concentración final de ensayo:

En 0.50 ml de mezcla de reacción, la concentración finales 60mM glicilglicina, 120mM sarcosina, y 0.05-0.10 unidades de sarcosina oxidasa.

REFERENCE: Suzuki, M. (1981) *J. Biochemistry* 89, 599-607.

Anexo B. Protocolo electroforesis.

BUFFER DE ELECTROFORESIS TRIS-GLICINA 10X PARA PROTEÍNAS

Reactivos		Concentración final
Stris-base	3,038 gr	0,25 M
Glicina	15,01 gr	2 M
SDS	1 gr	1 %

Completar con 100 mL de agua bidestilada.

SOLUCIÓN DE TRABAJO ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA AL 30%

Reactivos		Concentración final
Acrilamida	29.2 g	29.2%
Bisacrilamida	0.8 g	0.8%
Mezcla total	30 g	30%

Disolver con 100 mL de agua bidestilada. Filtrar para remover las impurezas en papel Whatman N° 1 y forrar el recipiente con papel aluminio o kraft.

PERSULFATO DE AMONIO (APS 10%) Pesar 100 mg y diluir en un volumen final de 1 mL con

agua tridestilada. Este reactivo en polvo es altamente hidrofílico, por lo tanto, es importante mantener el envase herméticamente cerrado. Esta preparación debe ser de 1 semana de antigüedad como máximo.

PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis de proteínas descrito a continuación corresponde al sistema discontinuo desnaturalante. Es discontinuo porque está conformado por dos geles de poliacrilamida de resolución y empacamiento que presentan diferente concentración, composición y pH. Ambos geles se encuentran unidos pero limitados por una fase de separación visible al trasluz. Debido a que en estado líquido ambos geles pueden mezclarse fácilmente, deben ser preparados por separado esperando la total polimerización del primero para continuar con la polimerización del otro. El gel de empacamiento generalmente se localiza en la parte superior del sistema formando los pocillos donde se depositarán las muestras. El gel de resolución por su parte forma el cuerpo del gel por donde migrarán y se separarán las proteínas.

Fundamento teórico

El gel de resolución es la matriz de poliacrilamida donde las moléculas de ADN o proteínas, van a migrar generando un perfil de bandas o patrón electroforético. Dicho patrón varía de acuerdo al peso molecular de cada una de las moléculas y a la concentración del gel mismo.

PREPARACIÓN DEL GEL DE EMPACAMIENTO

Fundamento teórico El gel de empacamiento es la matriz de poliacrilamida que tiene como característica retener a las proteínas manteniéndolas uniformes antes que ellas migren hacia el gel de resolución. Este proceso permite mejorar la resolución de las proteínas en la electroforesis.

Procedimiento

Mezclar los componentes del gel mostrados a continuación para el gel de separación 12% y posteriormente los del gel concentrador 5%. Una vez finalizada la preparación de la solución, agitar moderadamente sin hacer burbujas a fin de asegurar que el TEMED y el APS se distribuyan uniformemente en todo el volumen de la solución. Agregar la poliacrilamida entre los vidrios de la cámara y sobre el gel de resolución ya polimerizado. Inmediatamente después, colocar el peine entre ambos vidrios secando con papel toalla los restos de poliacrilamida que lleguen a derramarse. Una vez formado el gel, retirar el peine cuidadosamente y lavar todos los pocillos ya

formados con chorro suave de agua destilada.

PREPARACIÓN DE GELES POLIACRILAMIDA DE RESOLUCIÓN DE ACUERDO A CONCENTRACIÓN 12% Y VOLUMEN

Componentes de la solución	Volumen final de la solución.			
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
Gel al 12%				
Agua bidestilada	1.6	3.3	4.9	6.6
Acrilamida/bisacrilamida 30%	2.0	4.0	6.0	8.0
Tris 1,5 M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5.0
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2
Persulfato de amonio 10%	0.025	0.05	0.075	0.1
TEMED	0.0025	0.005	0.0075	0.01

PREPARACIÓN DE GELES DE EMPACAMIENTO AL 5% DE ACUERDO A SU VOLUMEN

Componentes de la solución	Volumen final de la solución.			
	4.5 ml	9 ml	14.5 ml	20.5 ml
Gel al 5%				
Agua bidestilada	1.1	2.3	3.4	4.6
Acrilamida/bisacrilamida 30%	2.5	5.0	7.5	10
Tris 0.5 M pH 6.8	1.3	2.5	3.8	5.0
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2
Persulfato de amonio 10%	0.025	0.05	0.075	0.1
TEMED	0.0025	0.005	0.0075	0.01

Principio del procedimiento

La preparación de la proteína consiste en un proceso fisicoquímico, en el cual se rompen enlaces peptídicos y puentes disulfuro gracias a la acción de detergentes iónicos, reactivos reductores y altas temperaturas, los que en conjunto consiguen desnaturalizar la proteína hasta su estructura primaria.

Procedimiento Mezclar la proteína con el buffer de la muestra concentrada por cuatro veces (4x)

en proporción 3:1 (tres partes de la muestra y una de buffer). Asegurar la tapa de los tubos con lámina extensible de parafina y someter la muestra a una temperatura de 100° C durante 5 minutos. Finalizado el procedimiento, retirar los tubos del vaso de precipitación y centrifugarlos por diez segundos a 12 000 rpm. Mantenerlos en una gradilla para microtubos dentro de un recipiente con hielo hasta el proceso de electroforesis.

BUFFER DE LA MUESTRA 4X PARA PROTEÍNAS

Reactivos		Concentración final
Tris 0,5 M, pH 6,8	2,5 mL	0,125 M
SDS al 10 %	2,5 mL	2.5 %
2-Mercaptoetanol	2,5 mL	25 %
Glicerol	2,5 mL	25 %
Azul de bromofenol	1 mg	0,1 mg/mL

Mezclar los componentes arriba mencionados.

COLORACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS USANDO AZUL BRILLANTE DE COOMASIE

Principio del procedimiento

El proceso de coloración se basa en la atracción electrostática del enlace peptídico de las proteínas sobre grupos de ácido sulfónico que son los que tiñen la proteína de color azul. Asimismo, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas participan en este proceso de unión mecánica. Este paso permite la visualización de proteínas en un rango de sensibilidad entre 0,5 µg y 2 µg.

Procedimiento

Sumergir el gel de poliacrilamida en un envase de vidrio o teflón, conteniendo solución de trabajo de azul brillante de Coomasie en un volumen que permita cubrir completamente el gel. Dejar incubando con un suave movimiento rotatorio por 15 a 20 minutos. Es importante precisar que el tiempo de incubación dependerá del grado de sensibilidad requerida en la prueba, de la concentración del gel y de la sensibilidad del azul brillante de coomasie propiamente dicho. En ese sentido, una máxima sensibilidad de coloración puede ser obtenida incubando por ejemplo un gel al 5% en 1 hora y un gel al 10% por 2 horas. Evitar la coloración del gel por más de dos horas,

debido a que el colorante puede quedar retenido fuertemente en el gel generando un fondo oscuro por sobretinción que impediría la visualización de las proteínas.

Culminado el tiempo de incubación, depositar el colorante en su frasco original. Cubrir el gel teñido con solución de decoloración rápida e incubar por 30 minutos. Eliminar la solución decolorante rápida y añadir un segundo volumen de la misma solución hasta apreciar las primeras bandas. Acto seguido, eliminar la solución de decoloración rápida y añadir la solución decolorante lenta. Dejar destiñendo a movimiento constante por lo menos una hora, cambiando la solución por una nueva cuantas veces sea necesario. Seguir destiñendo hasta que las bandas de las proteínas puedan ser apreciadas claramente. Finalizada la remoción del azul de Coomassie, descartar el decolorante usado y lavar el gel. Para poder analizar los resultados es recomendable secar el gel usando un equipo secador a vacío o manualmente.

SOLUCIÓN DE TRABAJO DE AZUL BRILLANTE DE COMASIE R250

Disolver 0,25 g de azul brillante de coomasie R250 en 90 mL de metanol:H₂O (v/v 1:1) y 10 mL de ácido acético glacial. Filtrar la solución a través de un papel Whatman N° 1 para eliminar los residuos extraños. Antes de usar dejar en reposo por una semana en un frasco oscuro. A.1.11

SOLUCIÓN DE DECOLORACIÓN RÁPIDA

Mezclar 10 mL de ácido acético glacial con 50 mL de metanol. Llevar la solución a 100 mL con 40 mL de agua destilada. A.1.12

DECOLORACIÓN LENTA

Mezclar 10 mL de ácido acético glacial con 5 mL de metanol. Llevar la solución a 100 mL con 85 mL de agua destilada.

(Yábar, 2003)

TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

Cantidades de proteína menores a 0.3 y 1µg (dependiendo de la naturaleza de la proteína) no pueden ser detectadas por tinción de Coomassie. Sin embargo, la tinción de los geles con plata permite detectar concentraciones muy pequeñas de proteínas, del orden de los nanogramos (ng).

Existen diversos protocolos para teñir geles con plata, y la detección del método puede variar entre 2 a 5 ng. La tinción de plata se basa en su unión a distintos grupos químicos de las proteínas, como los grupos sulfidril o carboxilo. La detección con plata es exclusivamente cualitativa. No puede ser utilizada para cuantificar proteínas por diversas razones, entre ellas: dependiendo de la naturaleza de la proteína, ésta puede adquirir un color particular (entre marrones y amarillos), o incluso puede teñirse negativamente contrastando del fondo del gel.

La tinción de plata se realizó de acuerdo al método de Blum et al. (1987). Éste método utiliza dos propiedades del tiosulfato: mejora la imagen por el pretratamiento del gel fijado, y evita el color de fondo no específico durante el desarrollo de la técnica. Cuando se quiere producir imágenes reproducibles se debe trabajar con mucho cuidado y exactitud en los tiempos. La técnica puede ser desarrollada en agitación a temperatura ambiente (20°-25°C).

Protocolo:

4.1.5.1 Mantener el gel al menos 1 hora en solución de fijación (50% metanol, 12% ácido acético). Los geles pueden ser mantenidos en esta solución varios días sin perder la calidad de tinción.

4.1.5.2 Lavar el gel en 50% etanol, 3 veces durante 20 minutos cada vez.

4.1.5.3 Sumergir el gel en solución de tiosulfato (0.2g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), exactamente, durante 1 minuto. Si se sobrepasa este período de tiempo se puede obtener una tinción con gran color de fondo.

4.1.5.4 Lavar el gel con agua, tres veces durante 20 segundos cada lavado.

4.1.5.5 Sumergir el gel durante 20 minutos en solución de nitrato de plata (2g/L AgNO_3 , 0.75ml/L formaldehído 37%)

4.1.5.6 Lavar el gel 2 veces con agua durante 20 segundos cada vez. Este paso remueve el exceso de plata.

4.1.5.7 Sumergir el gel en la solución de revelado (60 g/L Na_2CO_3 , 0.5 ml/L formaldehído 37%, 4 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), en agitación suave durante 10 minutos. Si la solución de revelado en contacto con el gel se torna marrón cambiarla inmediatamente por otra fresca. Como referencia, una banda que contiene 500 ng de proteína puede ser detectada en aprox. 30 segundos.

4.1.5.8 Lavar el gel dos veces en agua durante 2 minutos cada vez.

4.1.5.9 Mantener el gel durante 10 minutos en solución de fijación (paso 1)

4.1.5.10 Lavar el gel en metanol al 50% al menos durante 20 minutos. Después puede ser conservado a 4°C en metanol al 50%. Si se quiere secar el gel, mantener en agitación a 4°C durante 30 minutos en metanol al 30%, y luego otros 30 minutos en glicerol al 3%.

(Del Valle, L.J, s.f.)

Dirección General de Bibliotecas UAQ