

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Opción de Titulación: Tesis Individual

Título: Diseño y caracterización de un bioelectrodo basado en sarcosina oxidasa para detección de sarcosina como biomarcador de cáncer de próstata

Profesor Titular: Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Alumno: José Juan Olvera Medellín

Generación: 2016-2 – 2020-2



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Diseño y caracterización de un bioelectrodo basado en
sarcosina oxidasa para detección de sarcosina como
biomarcador de cáncer de próstata

por

José Juan Olvera Medellín

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: IGLIN-262940-0323-323

A mi familia, por apoyarme siempre
Con agradecimiento al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría
de la Universidad Autónoma de Querétaro

Tabla de Contenido

Tabla de Contenido	3
Lista de Figuras	5
Lista de Tablas	7
Lista de Ecuaciones.....	7
Resumen.....	8
Abstract	9
Planteamiento del problema.....	10
Justificación	11
Objetivos.....	12
Objetivo General	12
Objetivos específicos.....	12
Hipótesis	13
Antecedentes	14
Cáncer de próstata	14
Técnicas actuales de diagnóstico.....	17
Cáncer de próstata en México	20
Impacto de cáncer de próstata en México	20
Tamiz para diagnóstico de cáncer de próstata en México.....	23
Sarcosina	24
Métodos de medición de sarcosina.....	27
Biosensores.....	29
Biosensores electroquímicos	33
Voltamperometría cíclica	36
Enzimas como biorreceptores en biosensores electroquímicos	38
Inmovilización de enzimas.....	40
Nanotubos de carbono multipared.....	43
Sarcosina Oxidasa en bioelectrodos	46
Metodología	47
1. Evaluación de la estabilidad operacional y de almacenamiento de la enzima SOX inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (SOX/MWCNT).....	47

2. Modificación del electrodo serigrafiado de carbono con la inmovilizada en los nanotubos de carbono multipared.	47
3. Caracterización electroquímica del bioelectrodo (SOX/MWCNT/ESC).....	48
3.1 Evaluación de la oxidación de sarcosina por el biocatalizador (SOX/MWCNT) y el bioelectrodo (SOX/MWCNT/ESC) mediante voltamperometría de pulso diferencial.	48
3.2 Evaluación de la reducción de peróxido de hidrógeno por el biocatalizador (SOX/MWCNT) mediante voltamperometría cíclica.....	48
4. Estudios operacionales del bioelectrodo (SOX/MWCNT/ESC).....	49
4.1 Estudio de estabilidad de ensayo.	49
Resultados y discusión	50
Propiedades de la sarcosina oxidasa.....	50
Efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática	50
Efecto de la temperatura y el pH en la actividad enzimática	52
Caracterización electroquímica del bioelectrodo	55
Estudios de estabilidad operacional	64
Trabajo Futuro	67
Conclusión	68
Referencias.....	69

Lista de Figuras

Figura 1: Cambio en la tasa de incidencia ajustada por edad (p/100,000 habitantes) de a) incidencia de CaP, b) muertes, c) años ajustados por discapacidad (DALYs). Obtenida de Beltrán Ontiveros et al., (2022).....	22
Figura 2. Representación de la molécula de sarcosina en su forma zwitteriónica. Esquema presentado por Mostad (1989).	24
Figura 3: Esquema de las funciones biológicas de la sarcosina en condiciones biológicas y no-biológicas. Adaptado de Cernei et al. (2013)	26
Figura 4: Parámetros cinéticos de sarcosina oxidasa libre e inmovilizada sobre nanotubos de carbono multipared a pH 8.3, 37°C en diferentes concentraciones de sarcosina.....	51
Figura 5: Comparación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en sarcosina oxidas purificada libre e inmovilizada en nanotubos de carbono	53
Figura 6: Comparación del efecto del pH sobre la actividad enzimática en sarcosina oxidas purificada libre e inmovilizada en nanotubos de carbono	54
Figura 7: Voltamperograma cíclico de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa en presencia y ausencia de sarcosina en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5, 2mM de ferroceno metanol y velocidad de barrido de 25mVs-1.	56
Figura 8: Voltamperograma cíclico de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa en presencia de sarcosina 100mM en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5, 2mM de ferroceno metanol a diferentes velocidades de barrido.	57
Figura 9: Voltamperograma de pulso diferencial de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa a diferentes concentraciones de sarcosina en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol.....	58
Figura 10: Curva de calibración usando el electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa en presencia de sarcosina a distintas concentraciones en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol.	59

Figura 11: Voltamperograma de pulso diferencial de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa a 100Mm de sarcosina en solución a diferentes valores de pH y 2mM de ferroceno metanol	60
Figura 12: Voltamperograma de pulso diferencial de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa a diferentes temperaturas de sarcosina 100Mm en solución amortiguadora pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol.....	61
Figura 13: Voltamperograma lineal de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa a diferentes concentraciones de sarcosina en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol	62
Figura 14: Cronoamperometría a 0.12V de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa con sarcosina 100Mm en solución amortiguadora pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol.....	64
Figura 15: Voltamperograma de pulso diferencial de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa con sarcosina 100Mm en solución amortiguadora pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol, aplicando diferentes ciclos de lavado del electrodo.....	65
Figura 16: Evaluación del rendimiento de medición de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa con sarcosina 100Mm en solución amortiguadora pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol, aplicando diferentes ciclos de lavado del electrodo.....	66

Lista de Tablas

Tabla 1 : Carga de cáncer de próstata a nivel federal en México (2000-2019). Obtenida de Beltrán Ontiveros et al., (2022)	21
Tabla 2: propiedades de la sarcosina oxidasa, obtenida de Brenda Enzymes (Matsuda et al., 1987)	50

Lista de Ecuaciones

Ecuación 1: Ecuación de Nernst	35
Ecuación 2: Tasa de escaneo en voltamperometría cíclica	36
Ecuación 3: Ecuación de Cottrell.....	63
Ecuación 4: Ecuación de Cottrell resuelta para D_j	63

Resumen

En los últimos años se han realizado importantes esfuerzos de investigación para diseñar sensores con elementos de reconocimiento biológicos; entre estos destaca el uso de enzimas, el cual presenta ventajas como alta sensibilidad, especificidad, portabilidad, posibilidades de miniaturización y producción en masa. Ciertas enzimas involucran reacciones óxido-reducción durante la catálisis, generando una señal eléctrica cuantificable.

Una de las aplicaciones sobresalientes de estos en el campo médico es la dirigida al diagnóstico oportuno de cáncer. Sin embargo, la selección de la enzima para diseñar un prototipo de biodetección presenta la necesidad de identificación de un biomarcador distintivo del padecimiento a diagnosticar usable como sustrato enzimático.

El cáncer de próstata (CaP) constituye un problema de salud mundial, posicionado como el segundo cáncer de mayor prevalencia y la quinta causa de muerte más común a nivel global. Los actuales métodos de tamiz para la detección temprana de CaP conllevan falsos positivos y riesgo de sobretratamiento, mientras que los procedimientos definitivos de diagnóstico son invasivos y generan complicaciones médicas. Debido a esto, surge la necesidad de desarrollar un procedimiento de diagnóstico capaz de detectar de manera precisa el CaP en etapas tempranas y no invasivas.

Los estudios de Sreekumar et al. (2009) y Morote et al. (2010) han propuesto a la sarcosina como un biomarcador prometedor para la detección de CaP, debido a la presencia significativa en etapas tempranas de dicho padecimiento y en pacientes con tejido tumoral.

El presente proyecto plantea la elaboración de un bioelectrodo basado en la enzima sarcosina oxidasa inmovilizada en nanotubos de carbono multipared, a fin de cuantificar los niveles de sarcosina por métodos electroquímicos; así como la caracterización de sus propiedades electroquímicas y de estabilidad operacional. El desarrollo de este bioelectrodo permitirá sentar las bases para el desarrollo de un sensor capaz de detectar sarcosina en muestras de orina.

Palabras clave: sarcosina, biomarcador, cáncer de próstata, bioelectrodo

Abstract

Recent research efforts have been centered around using biological components as sensing elements in sensors; notably, enzymes provide advantages such as high sensitivity, specificity, portability, miniaturization capabilities and mass-production viability. Some enzymes involve redox reactions in their catalysis process, producing a measurable electrical signal.

One particular application for biosensors in the medical industry is early cancer detection. However, in order to select an adequate enzyme for designing a biosensor prototype, selecting a distinctive, suitable biomarker as substrate is needed.

Prostate Cancer (PCa) presents a worldwide public health concern, leading as the second most common cancer and fifth most common death cause globally. Current screening methods for early PCa detection are prone to false positives and risk overtreatment, while definitive diagnostic procedures are of invasive nature and lead to several complications; thus, the need for designing a non-invasive, early PCa detection diagnostic method arises.

Studies such as the ones presented by Sreekumar et al. (2009) and Morote et al. (2010) have proposed sarcosine as a promising early PCa detection biomarker, reporting elevated measurements in early stages of the disease with tumoral tissue.

This project aims to build a bioelectrode based on multiwalled carbon nanotube-immobilized (MWCNT) sarcosine oxidase (SOx), capable of electrochemically measuring sarcosine; as well as the characterization of its electrochemical and operational stability properties. Building this bioelectrode will lay the groundwork for developing a biosensor capable of measuring sarcosine levels in urine.

Keywords: sarcosine, biomarker, prostate cancer, bioelectrode

Planteamiento del problema

El cáncer de próstata (CaP) es la principal causa de defunciones masculinas en el mundo. Esto se debe principalmente a que la detección del CaP suele ser tardía. Dada la naturaleza invasiva del principal método de detección de esta enfermedad, más del 70% de los pacientes demoran en la realización de la prueba hasta el avance a etapas avanzadas de la enfermedad, si bien está recomendada a partir de los 40 años, propiciando así una detección oportuna.

Partiendo de esta problemática y de la necesidad de una detección del CaP en las primeras etapas de desarrollo, en los últimos años han sido investigados distintos indicadores que permitan una detección temprana. Algunos de los métodos a destacar son la cuantificación de mRNA como indicador de expresión proteica (Mukherjee et al., 2012), el uso de cromatografía líquida y de gas (Jentzmik et al., 2011) y colorimetría (Lanet et al., 2014) en los biomarcadores potenciales identificados por Skreekumar et al. (2009). Sin embargo, dichos procesos presentan una larga duración, aunado a un alto costo de realización, de ahí que resulte necesario el desarrollo de una prueba que sea efectiva, rápida y de menor costo.

Skreekumar et al. (2009) han encontrado que la sarcosina es un biomarcador presente en etapas tempranas del padecimiento, así como la relación entre cantidades elevadas con la presencia de tejido tumoral, por lo que la elaboración de una prueba que detecte este componente en fluidos corporales facilitará la detección temprana de CaP. Si bien existen investigaciones sobre los diversos métodos de detección de sarcosina, estas están enfocadas principalmente en la validación de dicha sustancia como potencial biomarcador selectivo, así como en la cuantificación.

Uno de los métodos de detección más explorados recientemente es la aplicación de técnicas electroquímicas para la cuantificación de sarcosina, tales como los bioelectrodos, cuya fácil operabilidad, bajo costo y alta selectividad y sensibilidad lo convierten en una opción prometedora. A pesar de ello, las investigaciones de interferentes en fluidos corporales y condiciones de estabilidad operacional son escasas, lo que impide la implementación de un sistema de sensado en condiciones operacionales fuera de laboratorio.

Justificación

La detección temprana de CaP es una problemática que resulta urgente de solucionar. Siendo la quinta causa de muerte en el mundo y con un costo de tratamiento cercano a los doscientos mil pesos, poder desarrollar una prueba de detección no invasiva y veloz permitiría poder tratar a los pacientes de CaP antes de que estos se encuentren en una etapa avanzada.

Los ensayos de pruebas que identifican la sarcosina por cuantificación constan con diversas metodologías, entre las que destacan la cuantificación de mRNA como indicador de expresión proteica (Mukherjee et al., 2012), el uso de cromatografía líquida y de gas (Jentzmik et al., 2011) y la colorimetría (Lanet et al., 2014). No obstante, todas estas técnicas presentan altos costos, alta capacitación del usuario y uso de aparatos especializados.

Considerando lo anterior, el proyecto actual propone la construcción de un bioelectrodo enzimático para la detección de sarcosina, capaz de cuantificar dicho biomarcador en un fluido que simule las condiciones de la orina humana. Esto implica un paso crítico en el desarrollo de un sistema de detección de sarcosina selectivo, de bajo costo, de fácil uso y cuya miniaturización permitiría facilidad en su transporte y la reducción del tamaño de muestra requerido.

Objetivos

Objetivo General

Construir y caracterizar un bioelectrodo basado en la enzima sarcosina oxidasa inmovilizada en nanotubos de carbono multipared, que permita la detección de sarcosina por métodos electroquímicos.

Objetivos específicos

Inmovilizar la enzima Sarcosina Oxidasa (SOX) en nanotubos de carbono multipared (MWCNT).

Caracterizar la estabilidad operacional y de almacenamiento de la enzima sarcosina oxidasa inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (SOX/MWCNT).

Modificar y optimizar un bioelectrodo serigrafiado de carbono por medio de inmovilización enzimática de SOx en el soporte.

Caracterizar el bioelectrodo mediante técnicas electroquímicas para cuantificar sarcosina a través de la detección de peróxido de hidrógeno.

Evaluar el rendimiento operacional del bioelectrodo por medio de estudios de estabilidad y de validación.

Hipótesis

La inmovilización de la enzima sarcosina oxidasa, por medio de la unión covalente con nanotubos de carbón multipared, permitirá el desarrollo de electrodos para aplicación en biosensores para sarcosina, brindándole una buena estabilidad y reproducibilidad.

Antecedentes

Cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CaP) es, a nivel global, el principal tipo de cáncer en hombres. De acuerdo a la información obtenida por la Colaboración para la Carga Global del Cáncer (GBDCC) en 2018 (Khazaei et al., 2019; Rawla, 2019), este padecimiento conforma el 15% del total de casos de cáncer en hombres (Fitzmaurice et al., 2017), y representa la segunda causa principal de muerte por cáncer en hombres, y la quinta principal causa de muerte en el mundo (Pernar et al. 2018).

Los principales síntomas asociados con la enfermedad incluyen impotencia, poliuria, hematuria, dolor en la región lumbar y flujo seminal con dolor, dificultad o discontinuidad al orinar (Khazaei et al., 2019; Rawla, 2019).

Los prospectos de supervivencia en pacientes diagnosticados son altamente dependientes del país donde el individuo radique, esto debido a la diferencia entre tratamientos disponibles, así como la costeabilidad de estos y la capacidad de solventarlo del paciente, reduciendo así los prospectos en países con un menor desarrollo. El cáncer de próstata es el cáncer con mayor incidencia en hombres en 103 países, y la principal causa de muerte en 29 de éstos (Fitzmaurice et al., 2017).

El cáncer de próstata, al igual que otros cánceres y otras enfermedades debilitantes, resulta en una disminución de la expectativa de vida en los pacientes, así como de la calidad de vida de los mismos; la GBDCC (Fitzmaurice et al., 2017; Kocarnik et al., 2022) ha propuesto métodos para cuantificar el impacto que este tiene a nivel global.

Dichos métodos involucran la tasa de incidencia de cáncer de próstata, la tasa de mortalidad del padecimiento, los años de vida perdidos (YLL), los cuales se obtienen obtenidos a partir de la edad promedio de fallecimiento de los individuos diagnosticados con esta enfermedad y la expectativa de vida al nacimiento en su país; los años vividos con discapacidad (YLD), obtenidos según la prevalencia de las secuelas causadas directamente por el padecimiento y la morbilidad por los tratamientos derivados de éste (ej. Cirugías y radioterapia), todo esto multiplicado por un puntaje ponderado según la severidad de las secuelas causadas y

las discapacidades generadas; y los años de vida ajustados a discapacidades (DALY), resultado de la adición de YLLs y YLDs, el cual representa “la pérdida de un año de vida en condiciones de perfecta salud” (Fitzmaurice et al., 2017).

Los datos al 2015 estiman, con una tasa de incidencia de 1,618,000 nuevos casos de cáncer de próstata y un conteo de 366,000 muertes, un aproximado de 6.3 millones de DALYs; 82% debido a los YLLs y el 18% restante a los YLDs.

Un estudio más reciente coloca el conteo de nuevos casos en 1,410,000, y la cantidad de decesos en 487,000 (Kocarnik et al., 2022).

Epidemiológicamente, los factores de riesgo están compuestos de los factores genéticos, edad, grupo étnico, historial familiar, dieta y consumo de alcohol (Hsing et al., 2000; Chu et al., 2011), exposición a radiación ultravioleta, hormonas masculinas (andrógenos), infecciones de transmisión sexual y abuso de sustancias. El factor genético juega un papel muy importante en personas de ascendencia africana, doblando la tasa de incidencia y mortalidad con respecto a hombres caucásicos (Khazaei et al., 2019; Rawla et al., 2019).

Respecto al factor de la edad como factor de riesgo, Rawla et. Al (2019) establecen que el riesgo de desarrollar cáncer de próstata aumenta significativamente en los individuos sin historial familiar de incidencia de cáncer a partir de los 50 años, mientras que el riesgo aumenta a partir de los 40 en personas de ascendencia africana o con historial familiar de cáncer de próstata. El análisis de Khazaei et al. (2019) destaca que la edad promedio de diagnóstico de cáncer de próstata a nivel global es de 72 años, con un porcentaje cercano al 75% de todos los casos perteneciendo a hombres mayores a 65 años.

Scardino et al. (1992) reportan que cerca del 30% de los hombres por encima de los 50 años, al morir por causas no relacionadas al cáncer de próstata, presentan indicios histológicos de este tipo de cáncer al momento de la autopsia. El descubrimiento post-mortem de tejido con indicios de cáncer de próstata indica que una gran cantidad de hombres puede sufrir de cáncer de próstata asintomático o sin el desarrollo de la enfermedad a un grado clínicamente relevante antes de fallecer por causas externas.

La prevalencia del cáncer de próstata a nivel global reportada por Hassanipour-Azgomi et al., (2016) indica que hay una mayor incidencia en las zonas de Asia del Sur y del Este, Europa, Norteamérica, Australia y Nueva Zelanda, con tasas de mortalidad mayores en países con alto índice de desarrollo humano.

El estudio de Rawla et al (2019) confirma los datos anteriores, cuantificando las tasas de incidencia y mortalidad a nivel global. Para el año 2018, Oceanía encabezaba la tasa de incidencia (medidas en casos por cada 100,000 habitantes) con 79.1, seguida de Norte América con una tasa de 73.7; y Europa con una tasa de 62.1. Las regiones con menor incidencia son Asia con 11.5 casos por cada 100,000 habitantes; seguida de África, con 26. La tasa de mortalidad, en cambio, ve a Centroamérica como la región con mayor número de defunciones a causa del cáncer de próstata, con 10.7 fallecimientos por cada 100,000 habitantes; Oceanía baja al segundo puesto, con una tasa de 10.2; y Europa del Oeste concentra una tasa de 10.1. Las regiones con menor tasa de mortalidad siguen siendo Asia, con 4.7 defunciones por cada 100,000 habitantes; y África del Norte con 5.8.

El tratamiento del padecimiento se realiza por medio de cirugía para la remoción de la próstata y ganglios linfáticos asociados, además de la aplicación de radioterapia y quimioterapia, y bloqueos hormonales (Secretaría de Salud, 2019).

Como la gran mayoría de los cánceres, el riesgo de metástasis se encuentra presente, siendo las costillas, columna vertebral y zona pélvica las principales zonas afectadas por este proceso (Askari et al., 2005; Daniyal et al., 2014).

Técnicas actuales de diagnóstico

Las técnicas usadas en la actualidad para el diagnóstico preliminar consisten en la examinación digital rectal (EDR) de la próstata y el análisis sanguíneo de PSA (Antígeno Prostático Específico). El análisis de PSA fue originalmente introducido en 1986 como un marcador para el seguimiento de la progresión de cáncer en pacientes con un diagnóstico de cáncer de próstata (Haas et al., 2008), sin embargo, en la actualidad es utilizado como un diagnóstico preliminar de cáncer de próstata. Existen variantes sanguíneas y de suero sanguíneo, con una variante de análisis en saliva presentada por Khan et al. (2018).

La introducción de las pruebas de PSA como método de diagnóstico ha representado una disminución considerable en la tasa de mortalidad (Schröder et al., 2009); el valor de corte para sujetos saludables es menor a 4ng/ml, con valores mayores sugiriendo una tendencia mayor al desarrollo de cáncer de próstata (Otto et al., 2010). Lamentablemente, este valor de corte presenta varias limitantes durante el proceso de diagnóstico, tales como la presencia de una llamada “zona gris” entre los valores de 4ng/ml y 10ng/ml, valores entre los cuales se suelen encontrar casos de falsos positivos y falsos negativos (Freedland et al., 2007). Aquellos casos de falsos positivos conllevan un riesgo de sobretratamiento, cuyos efectos fueron reportados por la ERSPC y la PLCO (Schröder et al., 2009; Andriole et al., 2009).

Schröder et al. (2000) reporta una incidencia de hasta 30% de casos de cáncer de próstata con rangos menores a 4 ng/ml, evidenciando una capacidad de diagnóstico severamente limitada con este biomarcador.

Adicionalmente a su capacidad ambigua de diagnóstico, las pruebas por PSA se ven limitadas en selectividad ante otras condiciones prostáticas benéficas, además de no proveer información relevante de la etapa de progresión ni contar con un límite mínimo específico de diagnóstico (Patel et al., 2013). De igual manera, se considera que los hombres mayores de 75 años se ven poco beneficiados por la aplicación de exámenes de PSA, a no ser que presenten un tumor agresivo (Kawachi et al., 2010).

Debido a las limitantes previamente mencionadas, se han propuesto varias soluciones alternativas derivadas del mismo biomarcador; entre las más destacables podemos encontrar el ajuste del valor de corte límite para PSA en función de la edad del paciente, la reducción del límite de corte de PSA a 2.6 ng/ml, la obtención de la razón entre el PSA y el volumen total prostático al momento de la toma de muestras y la velocidad de cambio de concentración de PSA dada una ventana de tiempo. (Patel et al., 2013)

Una de las alternativas presentadas al diagnóstico por PSA, la cual ha ido ganando terreno en el ámbito de diagnóstico, es la prueba de tasa fPSA/PSA, la cual mide la cantidad de PSA libre en sangre en comparación con la cantidad total de éste. Dicha cuantificación ha demostrado tener una mayor capacidad de diagnóstico entre casos de hiperplasia benigna y cáncer, al igual que ha permitido la reducción de incidencia de biopsias innecesarias (Kawachi et al., 2010). A pesar de mostrar mejores resultados al usarse en conjunto con las pruebas de PSA estándares, su capacidad de diagnóstico específico al grado de progresión del padecimiento sigue viéndose limitada (Shariat et al., 2008).

El diagnóstico definitivo suele ser realizado por medio de una biopsia transrectal, el cual consiste en la obtención de tejido prostático para su evaluación histológica, usualmente por medio de una serie de punciones en diversos núcleos o sitios de la próstata (Djavan et al., 2001). Una de las desventajas que acarrea este procedimiento es su invasividad, cuyos efectos secundarios incluyen sangrados en vías urinarias, recto y durante la producción de semen, dificultad para orinar, así como fiebre e infecciones de diversas gravedades (Efesoy et al., 2013; Djavan et al., 2001).

El estudio realizado por Djavan et al. (2001) efectuó la cuantificación de las complicaciones de pacientes con diagnóstico temprano de cáncer de próstata en una muestra de n=1871 individuos. El procedimiento para la evaluación de dichas complicaciones consistió en el seguimiento de pacientes ambulatorios tras la realización de examinación rectal digital y una biopsia transrectal guiada por ultrasonido con dos punciones adicionales en zonas de transición prostática. Las múltiples punciones en diferentes zonas permiten el análisis de posibles puntos focales tumorales; sin embargo, los sitios de punción pueden no contener tejido cancerígeno, por lo que después de seis semanas se realizó una segunda biopsia en pacientes con resultados iniciales negativos.

Considerando aquellos casos ligeros como de naturaleza ambulatoria y los casos moderados a severos como aquellos con necesidad de intervención médica, los resultados reportados indican un conteo de n=1829 (97.75%) casos de sangrado rectal menor, y n=52 (2.77%) casos de sangrado rectal moderado a severo; episodios vasovagales ligeros (disminución de la presión sanguínea) n=1831 (97.80%), y episodios moderados a severos (disminución significativa/pérdida de consciencia) n=40 (2.13%); un total de casos de hematuria ligera n=753 (40.24%) y casos moderados n=1119 (59.80%).

En contraste con el estudio de Djavan et al. (2001), la incidencia de complicaciones reportada por Efesoy et al. (2013) (n=2049) comprende un 79.2% de casos con complicaciones menores, y 1.3% de pacientes que experimentaron complicaciones severas., entre las que podemos destacar urosepsis, hematuria severa con necesidad de transfusiones sanguíneas, gangrena e infartos al miocardio.

Las biopsias transrectales son consideradas procedimientos ambulatorios graves (Efesoy et al., 2013) debido a las tasas relativamente bajas de complicaciones severas, captando en su mayoría dichos casos en la estancia hospitalaria postquirúrgica; sin embargo, los pacientes de riesgo, es decir, aquellos con valores de PSA mayores a 10ng/ml o un alto grado de neoplasia epitelial suelen ser sometidos a múltiples procedimientos aún tras un diagnóstico inicial negativo a fin de descartar falsos negativos. Aquellos individuos sometidos a múltiples biopsias tienen un riesgo mayor de sufrir complicaciones posteriores al procedimiento (Djavan et al., 2001).

A fin de reducir la comorbilidad y las complicaciones asociadas a las biopsias transrectales, diversos estudios han investigado la viabilidad de métodos no invasivos como ensayos en orina, los cuales proveen un diagnóstico no invasivo, al igual que la posibilidad de detectar casos de cáncer de próstata con puntos focales tumorales heterogéneos, es decir, tienen la capacidad de detectar productos y residuos celulares tumorales de tejido canceroso distribuido en diversos sitios de la próstata (Cao et al., 2010).

Cáncer de próstata en México

El cáncer de próstata (CaP) implica un problema de salud pública en México, con una incidencia aproximada de 25,000 casos nuevos diagnosticados y 7,000 casos de mortalidad anualmente (Secretaría de Salud, 2019). Estadísticamente, el CaP representa la principal causa de muerte en hombres mayores de 65 años. Adicionalmente, el 70% de los casos se detectan en etapas avanzadas del padecimiento (Secretaría de Salud, 2019).

El consenso médico indica los 40 años como la edad adecuada para la realización del primer chequeo de cribado y diagnóstico, cuyo impacto en la oportuna detección en etapas iniciales provee un estimado del 90% de probabilidades de tratamiento exitoso (Real Cárabes, 2019). Sin embargo, la detección del padecimiento en el país tiende a realizarse en etapas avanzadas debido a una serie de factores sociales, como son la disparidad educativa, la falta de cultura de salud preventiva y la estigmatización cultural del examen diagnóstico por parte de la población masculina (CANIFARMA, 2018). Fernández Quílez et al., (2022) reportan una significativa diferencia de consultas para el tamiz de cáncer de próstata entre personas con una escolaridad menor a 7 años y personas que exceden dicha marca, con el 12.0% de las personas con escolaridad menor a 7 años acudiendo de manera anual tras los 50 años, comparado contra el 41.1% de las personas con escolaridad mayor a 7 años.

Según las declaraciones del Hospital General de Occidente (Barrera, 2018), el costo promedio para el tratamiento de cáncer de próstata en 2016 fue de \$196,000 pesos, convirtiéndolo en el cáncer más costoso tratado por el Seguro Popular Mexicano.

Impacto de cáncer de próstata en México

El costo humano, al igual que económico, es un factor importante en la epidemiología del cáncer de próstata en México. Beltrán Ontiveros et al., (2022) presentan un análisis localizado a las 32 entidades federativas, derivado de los estudios de Kocarnik et al., (2022), en el cual detalla las tasas de incidencia, fallecimientos y disminución en calidad de vida durante el periodo de 2000 al 2019. Dicha información fue recopilada por el Estudio de Carga por Enfermedades Global (GBD, 2019) de un total de 166 fuentes diferentes, entre

las que podemos encontrar los censos poblacionales del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), al igual que los certificados de defunción por entidad.

Las métricas presentadas son consistentes con aquellas expuestas de manera global por Kocarnik et al., (2022): la cantidad de años de vida perdida (YLLs) fueron obtenidos tomando la diferencia entre edad de fallecimiento y expectativa de vida por entidad federativa; los años vividos con discapacidad fueron calculados como el producto de la incidencia de discapacidades causadas por el progreso del padecimiento y los tratamientos recibidos, ponderado por una constante entre 0 (sin efectos en la salud) y 1 (causa de muerte) según el padecimiento; y finalmente los años de vida ajustados a discapacidades como el agregado de los dos datos anteriores. La Tabla 1 muestra las métricas recopiladas entre los años 2000 y 2019:

	Conteo		
	2000	2010	2019
Incidencia	11,444	17,784	27,096
Muertes	4,812	6,864	9,256
Años ajustados a discapacidad (DALY)	85,401	118,808	161,552

Tabla 1 : Carga de cáncer de próstata a nivel federal en México (2000-2019). Obtenida de Beltrán Ontiveros et al., (2022)

Durante el año 2019, a nivel estatal, el Estado de México y la Ciudad de México fueron las entidades federativas con mayor número de casos, con conteos de 2,866 y 2,541 casos, respectivamente. En cambio, Campeche mantuvo el conteo más bajo entre todas las entidades federativas, con 165 casos reportados ese año. La tasa de incidencia ajustada a la edad difiere, sin embargo, en comparación a la incidencia absoluta, con Sinaloa encabezando el primer puesto con 85.2 casos por cada 100,000 habitantes, seguido de Baja California Sur con 74.9 casos por cada 100,000 habitantes; las entidades con menor incidencia siendo Puebla y Oaxaca con 36.1 y 33.8 casos por cada 100,000 habitantes, respectivamente. La Figura 1 muestra estos datos de manera gráfica por entidad federativa (Beltrán Ontiveros et al., 2022).

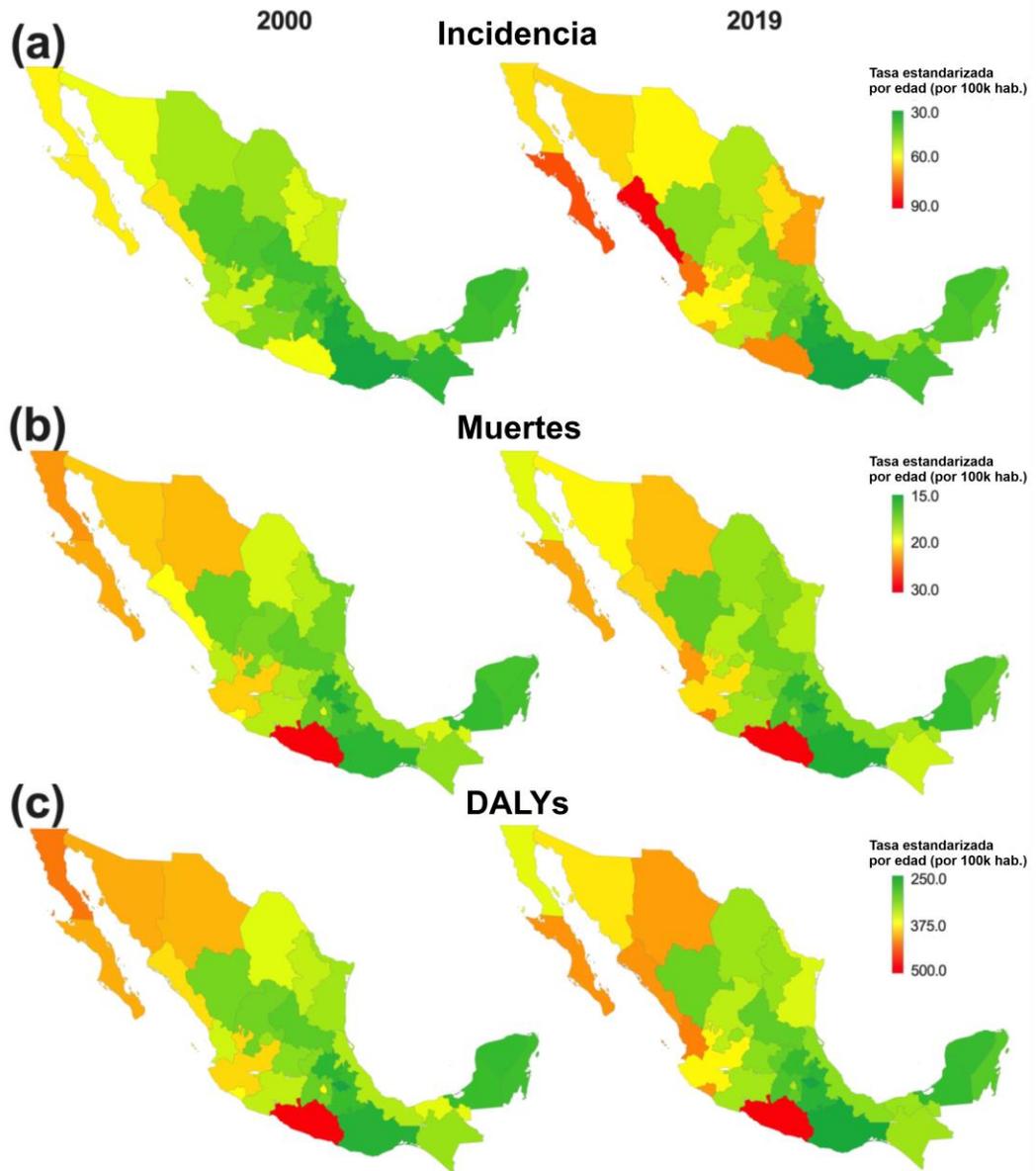


Figura 1: Cambio en la tasa de incidencia ajustada por edad (p/100,000 habitantes) de a) incidencia de CaP, b) muertes, c) años ajustados por discapacidad (DALYs). Obtenida de Beltrán Ontiveros et al., (2022)

Freedland et al. (2005) señalan la existencia de una gran brecha en la disparidad entre estados dentro de un mismo país respecto a las tasas de mortalidad de la enfermedad,

acentuada por las diferencias socioeconómicas y educativas, así como accesibilidad al tratamiento y calidad de cuidado brindado.

El impacto del cáncer de próstata en el paciente mexicano promedio no se limita a la reducción de expectativa de vida, como demuestran los estudios cualitativos de Knaul et al. (2020) y Tristán Martínez et al. (2022), en los cuales se consideran los efectos indirectos de una enfermedad crónica de alto costo como lo es el cáncer de próstata. Entre algunos de los problemas descritos podemos encontrar afecciones en el estado anímico como la depresión y distimia resultantes de sobrellevar la enfermedad, agravado por la poca atención psicosocial ofrecida en el sector público de salud; alto impacto en la economía de los pacientes o sus familias debido a los costos de transporte y acomodación para terapias en caso de individuos sin acceso inmediato a hospitales, a los gastos personales por falta de medicamentos y tratamientos en el sistema de salud pública y a la suspensión temporal o pérdida del trabajo del paciente y familiares con el rol de cuidador del mismo.

Tamiz para diagnóstico de cáncer de próstata en México

México actualmente cuenta esfuerzos limitados en la actualización y mejora de estudios en el tamiz diagnóstico de cáncer de próstata, incurriendo en altos costos para el servicio de salud pública el cual da seguimiento a 15 millones de mexicanos mayores de 50 años -edad recomendada para el inicio de chequeos anuales- (Lajous et al., 2020). Amaya Fragoso et al. (2021) reportan el uso extendido en la república mexicana de los estudios de PSA, PSA libre (fPSA) y densidad de PSA por volumen prostático (PSA density), y propone la implementación de los protocolos de evaluaciones predictivas PBCG (Prostate Biopsy Risk Collaborative Group) y PCPTRC 2.0 (Prostate Cancer Prevention Trial Risk Calculator) a fin de reducir la realización de biopsias en todos los pacientes de riesgo con resultados positivos en examinación de PSA.

A pesar de los esfuerzos presentados por Amaya Fragoso et al. (2021), la aplicación del protocolo PCPTRC 2.0 resultó en una reducción de 15% de falsos positivos; esto demuestra la necesidad de la búsqueda de alternativas de diagnóstico que sean capaces de reducir los costos económicos y de salud asociados a biopsias innecesarias.

Sarcosina

La sarcosina (N-metilglicina) es un aminoácido no proteínogénico, (Figura 1), hallado en formas aniónica y zwitteriónica, producto intermedio de la síntesis del aminoácido glicina (Cernei et al., 2013), generada a partir de la glicina por medio de la glicina-N-metil transferasa (GNMT), degradada por la sarcosina deshidrogenasa (SARDH) y la L-pipecolato oxidasa (PIPOX) (Khan et al., 2013). En las células, la sarcosina se genera por la transferencia enzimática de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina hacia la glicina, a su vez produciendo S-adenosilhomocisteína. Esta reacción se encuentra catalizada por la GNMT, expresada en altos niveles en el hígado, páncreas y próstata (Kerr et al., 1972; Yeo et al., 1994). Por su parte, las enzimas SARDH y PIPOX se encargan de catalizar la desmetilación oxidativa de la sarcosina, convirtiéndola de nuevo en glicina.

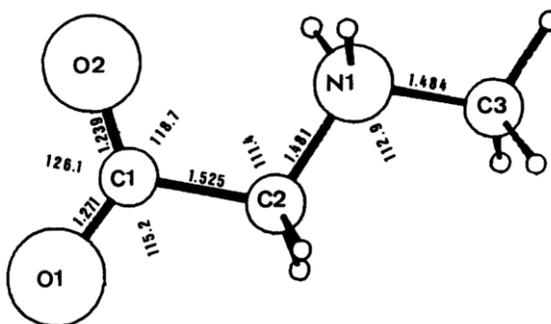


Figura 2. Representación de la molécula de sarcosina en su forma zwitteriónica.

Esquema presentado por Mostad (1989).

Sreekumar et. al. (2009) identificaron una serie de biomarcadores asociados a la incidencia de cáncer de próstata, entre los cuales la sarcosina presenta resultados favorables para la detección en etapas tempranas; durante éste, se observó un alza en la concentración de sarcosina en durante la etapa de metástasis de los pacientes. Los estudios de Cavaliere et al. (2011), dando seguimiento a los hallazgos de previos, reportan el involucramiento de la

sarcosina en los procesos de metabolización y metilación de varios aminoácidos presentes durante el progreso tumoral del cáncer de próstata.

Las células cancerosas tienen una predisposición a diferentes requisitos metabólicos en comparación con células diferenciadas sanas debido a su continua reproducción. A fin de ser capaces de mantener una alta tasa de proliferación, las células cancerosas consumen una alta cantidad de nutrientes y son redistribuidas hacia rutas de síntesis macromolecular (Griffin et al., 2004). Durante el desarrollo de dichos cambios de rutas metabólicas, se producen alteraciones en distintas etapas del metabolismo celular, tales como la regulación genética y actividad cinética enzimática, al igual que cambios en la regulación de reacciones metabólicas (Lucarelli et al., 2012).

Estudios como los de Khan et al. (2013) y Jornet-Martínez et al. (2019) reportan que la sarcosina exhibe efectos estimulatorios considerables en el crecimiento de células cancerosas prostáticas metastásicas, hipotéticamente debido a la acumulación en el tejido tumoral y su conversión subsecuente en serina y glicina, proveyendo promotores de crecimiento tumoral (Heger et al., 2016; Rodrigo et al., 2018). Narwalet al. asevera (2018) que la sarcosina cumple un rol en la activación de células prostáticas cancerígenas, y su presencia en la sangre indica malignidad de las células cancerosas.

Los estudios de Mukherjee et al. (2012) demuestran la correlación de la biosíntesis de sarcosina y su precursor, glicina, y la presencia de procesos metabólicos de tejido canceroso. Asimismo, Khan et al. (2013) reportan niveles mayores de sarcosina en tejido tumoral prostático al de aquellos tejidos sanos. Lucarelli et al., (2012) reportan un aumento de actividad de la enzima metiltransferasa en tejido tumoral; al realizar pruebas de control de GNMT, adicionalmente, la reducción de esta enzima redujo de manera significativa la invasividad de líneas celulares de tejido tumoral de cáncer de próstata.

Posteriormente, Cernei et al. (2013) y Khan et al. (2013) describen teorías del mecanismo de acción por el cual la metabolización de sarcosina se relaciona con el progreso tumoral en cáncer de próstata, tales como la presentada por Cernei en la Figura 3. La glicina-N-metiltransferasa (GNMT) cumple un íntimo rol en la metabolización de la metionina, así como en la gluconeogénesis y la transformación de sarcosina en glicina. La GNMT actúa

como un componente esencial en la síntesis de sarcosina (Wang et al., 2011; Yen et al., 2013); la GNMT se encuentra a su vez regulada por un gen con el mismo nombre (gen *GNMT*), el cual es considerado un gen de susceptibilidad tumoral -es decir, aumenta la predisposición al padecimiento de tumores- (Song et al., 2011). De acuerdo al estudio realizado por Ianni et al. (2013), este gen suele encontrarse sobreexpresado en pacientes de cáncer de próstata. La sobreexpresión del gen puede conllevar a alteraciones en la metilación del ADN, promoviendo varios cánceres, entre ellos el cáncer de próstata. Asimismo, las enzimas metabolizadoras SARDH y PIPOX se reportan en menores cantidades en tejido tumoral de cáncer de próstata, contribuyendo a las altas concentraciones de sarcosina (Khan et al., 2013).

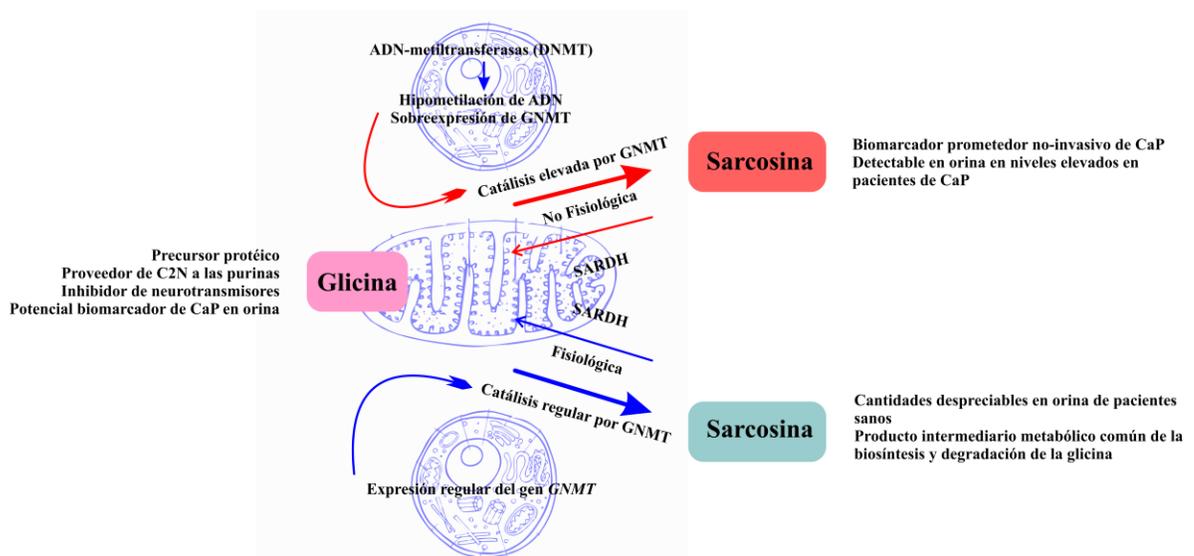


Figura 3: Esquema de las funciones biológicas de la sarcosina en condiciones biológicas y no-biológicas. Adaptado de Cernei et al. (2013)

Cavaliere et al. (2011) y Jentzmik et al. (2011) indican la presencia del biomarcador en el supernatante de la orina de sujetos con el padecimiento, mientras que Sreekumar et al. (2009) la reportan como ausente o en cantidades despreciables en la orina de personas

saludables, sugiriendo la posibilidad de reducción de casos de falsos positivos durante pruebas de cribado, además de permitir su uso en técnicas de diagnóstico no invasivas.

A partir de los reportes realizados en los trabajos anteriores, una serie de estudios de validación han sido realizados, destacando los resultados de Cao et al. (2011) y Bianchi et al. (2011), cuyo alto número de muestras de validación demuestran un mejor desempeño con respecto a otros biomarcadores propuestos.

Según los resultados presentados por Lucarelli et al. (2012), Miyake et al. (2012) e Issaq et al. (2011), la capacidad de diagnóstico tiene un índice de éxito mayor en pacientes con niveles bajos de PSA, lo que sugiere efectividad en diagnóstico de etapas tempranas y en la llamada “zona gris”, rango de valores con una limitada capacidad de diagnóstico; capacidad que se ve reducida en comparación con otros indicadores en etapas posteriores (Cernei et al., 2013). Cao et al., (2011) descartan la relación aparente entre la sarcosina y la escala de Gleason, escala utilizada para definir la etapa clínica según los resultados histológicos de las biopsias tomadas del tejido canceroso.

Métodos de medición de sarcosina

La detección y cuantificación de sarcosina puede ser realizada por diversos métodos, cada uno con ventajas y desventajas en su utilización. La utilización de cromatografía (líquida y de gas) permite un alto índice de repetibilidad y un alto rendimiento respecto a las muestras. La sensibilidad del método permite la detección y cuantificación de bajas concentraciones de sarcosina, así como de interferentes como los isómeros de la molécula y la alanina. Sin embargo, la variante de cromatografía en gas presenta una detección de sensibilidad menor (Cavaliere et al., 2011; Cernei et al., 2013). Ambas técnicas cromatográficas presentan dos desventajas adicionales: la alta necesidad de tratamiento de las muestras y la cantidad extensiva de tiempo requerido (Liu et al., 2019).

Otro de los métodos comúnmente empleado es la colorimetría, método de bajo costo, pero que sufre de alta susceptibilidad a interferentes y posee una baja sensibilidad (Lan et al., 2014; Liu et al., 2019). Un ejemplo adicional de colorimetría es el diseño de Biavardi

(2012), el cual comprende un cavitando enlazante anclado a un sustrato de silicio cuya detección proporcionaba cambios de intensidad de fluorescencia en presencia de sarcosina.

Los métodos de detección electroquímica, de igual manera, permiten la cuantificación de bajas concentraciones de sarcosina (Cernei et al., 2013). No obstante, una de las desventajas que presentan estos métodos es la necesidad de un pretratamiento adecuado (Cernei et al., 2012; Le Boucher et al., 1997). Debido a lo anterior, varios investigadores han enfocado sus esfuerzos en el desarrollo de métodos de detección electroquímica, tales como el electrodo impreso, basado en sarcosina oxidasa inmovilizada en N-Hidrosuccinimida, diseñado por Rebelo et al. (2014); el sensor basado en un arreglo microfluídico y ensayo tipo ELISA desarrollado por Tang et al. (2016); y, más recientemente, el biosensor con un bioelectrodo amperométrico basado en sarcosina oxidasa y quitosano, presentado por Narwal et al. (2018)

Biosensores

Un biosensor se define a grandes rasgos como un dispositivo analítico capaz de convertir una respuesta biológica en una señal cuantificable y procesable. Según la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), un biosensor es un dispositivo integrado autónomo capaz de proveer información analítica específica semicuantitativa o cuantitativa mediante el uso de un elemento de reconocimiento biológico, el cual está en contacto espacial directo con un transductor (Grieshaber et al, 2008).

De acuerdo a la definición provista por Grieshaber et al. (2008), un biosensor está conformado por:

- a) Un elemento de reconocimiento biológico o biorreceptor que tiene unión específica con el analito de interés en una muestra. Los elementos de reconocimiento usados usualmente en el biorreceptor son enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, células y receptores químicos.
- b) Una arquitectura de interfaz eléctrica donde sucede el evento biológico específico el cual genera una señal bioquímica
- c) Un elemento transductor (que comúnmente es un electrodo), el cual recoge la señal generada del evento de unión del analito y el biorreceptor y la convierte en una señal eléctrica. Debido a la escala de la señal producida, el elemento transductor debe estar acoplado a una etapa de amplificación eléctrica en el circuito de detección para permitir su análisis.
- d) Componentes de procesamiento: permiten la traducción de señales a valores nominales e interpretables por el operador del equipo. Son considerados el punto final de interacción del usuario con el sistema, otorgando una representación de los valores detectados en el proceso de medición.

Según el tipo de integración dado por los elementos de biorreconocimiento, los biosensores pueden ser agrupados en dos amplias categorías (Kirsch et al., 2013):

- a) Sensores metabólicos: aquellos en los que el proceso de reconocimiento produce una conversión química del analito en productos propios de la reacción

metabolizada por el elemento de reconocimiento, esta a su vez produciendo cambios de propiedades en el medio donde se realiza la reacción. Dichos cambios son la clave para la cuantificación de la respuesta del sensor, ya que su captación y subsecuente transducción hacia una señal medible permiten la interpretación de las concentraciones medidas.

Una propiedad notable de esta categoría de sensores es que la interacción del analito con el elemento de biorreconocimiento suele ser reversible, lo que permite que el biosensor sea reusable siempre y cuando dicho elemento se encuentre activo.

- b) Sensores de afinidad: aquellos biosensores en los que el proceso de reconocimiento molecular produce un complejo analito-elemento de biorreconocimiento, dando lugar a cambios fisicoquímicos en el medio, los cuales son registrados por un transductor afín a ellos. La particularidad de estos biosensores es que, debido al complejo formado, se debe llevar un paso de regeneración en el cual los elementos de biorreconocimiento deben ser retornados a un estado inicial por un proceso de separación del complejo, lo cual dificulta el reuso de este tipo de sistemas.

Los casos de aplicación de los biosensores se encuentran en diversos campos, tales como el monitoreo ambiental, diagnóstico médico, análisis farmacológico, telemetría en procesos agrícolas y monitoreo de procesos industriales. El desarrollo de nuevos tipos de tecnología de biodetección ha sido un punto de discusión entre la comunidad científica y biotecnológica, especialmente debido al gran impacto que los bioelectrodos han tenido como herramientas instrumentales en los últimos años. (Kirsch et al., 2013)

El mercado actual de biosensores, al año 2022, se valúa en un total de 28,500 millones de dólares (Global Market Insights, 2022), con una gran parte de ésta proviniendo del sector de diagnóstico médico. El principal promotor del crecimiento en esta industria es la constante batalla contra el aumento de casos de padecimientos crónicos y debilitantes (Kirsch et al., 2013).

De acuerdo con Grieshaber et al. (2008) y Ronkainen et al. (2010), la viabilidad de producción de biosensores listos para el mercado depende de una serie de requisitos tales como:

- El biosensor debe contar con un biocatalizador de alta especificidad para poder asegurar la medición únicamente del analito deseado. Dicho biocatalizador debe ser capaz de mantener su estabilidad en condiciones de almacenamiento y mostrar una alta tasa de repetibilidad y baja variación entre mediciones realizadas.
- El resultado de la reacción debería de ser capaz de realizarse independientemente de las condiciones físicas en las que se realice (ej. Temperatura, pH), o bien, con el menor impacto posible de éstas en la medición. A mayor independencia de estas condiciones, el sistema requerirá menor pretratamiento.
- En el caso de que el elemento de biorreconocimiento sea enzimático, el sistema debe contar con los cofactores y coenzimas aplicables a la reacción disponibles para que la reacción se lleve a cabo (preferentemente inmovilizados en conjunto con la enzima).
- La respuesta debe ser de alta precisión y exactitud, así como reproducible y de respuesta lineal a lo largo del rango de interés de concentraciones de analito en la muestra.
- La respuesta de la señal transducida debe contener el menor ruido posible por interferentes en la muestra o condiciones exteriores.
- Idealmente, el tiempo de respuesta del sistema de biosensado debe ser instantáneo o lo suficientemente corto.
- La producción debe ser eficiente en cuanto a costo, y la presentación del sistema debe ser portable y de fácil uso para reducir la necesidad de entrenamiento al personal operador del mismo.

Actualmente, las limitantes principales en el desarrollo de biosensores aptos para comercialización en el mercado son la capacidad de miniaturización de los sistemas, así como la efectividad de costo de producción. Debido a esto, las pruebas de biosensado se encuentran limitadas en gran parte a laboratorios, con requisitos de uso de equipo de alto costo y un alto grado de entrenamiento de operadores del mismo (Grieshaber et al, 2008).

En el caso de los sistemas de transducción para el desarrollo de biosensores, los transductores de tipo electroquímico (electrodos) son los más utilizados, debido a su bajo costo, a la sencillez de su diseño y a su capacidad de miniaturización (Sassolas et al., 2012).

Los biosensores pueden ser aplicados para detección de distintos analitos en una gran diversidad de muestras, dentro de las que se incluyen fluidos corporales (sangre, saliva, orina).

Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos son una categoría de biosensores que permite el análisis del contenido de muestras biológicas por medio de la conversión directa de procesos biológicos en señales eléctricas, principalmente suscitando reacciones químicas de óxido-reducción. Los componentes principales de éstos son el elemento de biorreconocimiento, la arquitectura de interface y los electrodos (los cuales fungen como transductores).

Entre las ventajas provistas por este tipo de biosensores podemos encontrar una alta robustez, facilidad para la miniaturización del sistema debido a su integración con microcircuitos, buenos límites de detección debido a la capacidad de amplificación de las señales eléctricas producidas por los procesos electroquímicos de reconocimiento y su baja necesidad de cantidades de analito y de consumo de energía eléctrica. (Putzbach et al., 2013)

El sensado electroquímico requiere usualmente tres electrodos con diferentes funciones:

- Electrodo de referencia: éste sirve como un punto de comparación con el medio de la reacción, cuyo potencial eléctrico es estable y conocido. Se suele mantener a una distancia determinada del sitio donde la reacción se lleva a cabo para mantener su potencial.
- Electrodo de trabajo: también conocido como electrodo de sensado o electrodo redox. Es el electrodo usado como elemento de transducción en la reacción bioquímica.
- Contraelectrodo o electrodo auxiliar: establece una conexión entre la solución electrolítica en la que se lleva a cabo la reacción electroquímica, permitiendo así la transmisión de una corriente hacia el electrodo de trabajo.

El proceso de detección depende altamente de los electrodos usados, debido a que las respuestas medibles producidas por las reacciones sólo pueden ser cuantificadas en proximidad de la superficie del electrodo. De igual manera, la composición material y conductividad, estabilidad química, las dimensiones y las modificaciones de la superficie del electrodo afectan en su capacidad de detección.

Las características de los electrodos pueden ser alteradas al realizar modificaciones en la superficie del mismo, tales como el uso de nanofibras, nanopartículas y nanotubos de carbono, proporcionando aumentos en la razón superficie-volumen y la capacidad del electrodo de obtener mejores razones señal-ruido (SNR).

Este tipo de biosensores suele usar sistemas de “etiquetado” para la cuantificación de la cantidad de moléculas de analito enlazadas al mismo; usualmente el sistema de etiquetado involucra enzimas, las cuales catalizan reacciones donde la molécula de analito enlazada no altera de manera significativa el proceso de intercambio de carga a través de la interfaz del electrodo. Si la reacción electroquímica se lleva a cabo alejada de la interfaz del electrodo, se pueden ocupar mediadores -moléculas conductoras capaces de transferir los electrones entre el sitio de reacción y la superficie del electrodo.

Los biosensores electroquímicos son altamente dependientes del componente de la arquitectura de la interface, intermediario entre el elemento de biorreconocimiento y los electrodos, ya que ésta dicta la reducción de la variación entre reacciones bajo diversas condiciones (pH, fuerza iónica en el medio).

Una arquitectura de interface adecuada para su uso en biosensores electroquímicos debe ser altamente conductiva para asegurar el transporte de la carga generada durante el proceso de biorreconocimiento. A ésta se le puede aplicar un recubrimiento en su superficie para volverla inerte a las reacciones llevadas a cabo durante el proceso de sensado, o bien, puede ser funcionalizada con grupos funcionales para permitir el anclaje del elemento de reconocimiento a dicha interface.

En el campo de la bioelectroquímica, las respuestas eléctricas sensadas se pueden clasificar en respuestas amperométricas, dada una corriente mensurable; respuestas voltamétricas, dada una diferencia de potencial o carga; respuestas conductométricas, dadas alteraciones en las propiedades conductivas del medio donde se lleva a cabo la reacción; respuestas impedimétricas, dadas alteraciones de la resistencia o impedancia del medio; y respuestas de efecto campo, dadas por mediciones obtenidas de transistores FET.

Estas clasificaciones dan lugar a diversos tipos de dispositivos:

- Dispositivos amperométricos: sensores electroquímicos capaces de medir de manera continua la corriente resultante de una reacción óxido-reducción de un reactivo electroactivo (Eggins et al., 2002; Luppá et al., 2001). Si la corriente es medida bajo condiciones constantes de potencial, la medición es conocida como amperometría; si se realiza en condiciones de variación de potencial eléctrico, se denomina voltametría.

La voltametría puede ser realizada bajo diversos patrones de variación de potencial eléctrico: polarografía (corriente directa), barrido lineal, escalera diferencial, pulso normal, pulso invertido, pulso diferencial y variación cíclica.

En este tipo de mediciones se producen picos de corriente proporcionales a la concentración del analito (Chaubey et al., 2002; Luppá et al., 2001).

Debido a que no todas las moléculas de interés en el proceso de biorreconocimiento producen reacciones de óxido-reducción, se han desarrollado técnicas de medición indirecta por medio de productos secundarios de la reacción principal, o bien, concatenando reacciones.

- Dispositivos potenciométricos: sensores electroquímicos que miden el potencial en el electrodo de trabajo en comparación con el electrodo de referencia en una celda electroquímica, en la cual hay un flujo de corriente despreciable entre ambos electrodos (Eggins et al., 2002; Chaubey et al., 2002; D'Orazio et al., 2003). La relación entre la concentración del analito y el potencial se encuentra descrita por la ecuación de Nernst.

$$EMF = E_{celda}^0 - \frac{RT}{nF} \ln(Q)$$

Ecuación 1: Ecuación de Nernst

Donde:

EMF: fuerza electromotiva

E_{celda}^0 : contribución constante de potencial de la celda;

R: constante universal de gases

T: temperatura absoluta

F: constante de Faraday

n: número de carga en la reacción

Q: tasa de entre concentración iónica anódica y catódica

Por medio de este método se puede determinar la concentración de un analito en su forma iónica (potenciometría directa).

Adicionalmente a las mediciones de concentración, este tipo de medición es capaz de determinar eléctricamente el punto de equilibrio de reacciones bioquímicas.

- Dispositivos conductométricos: sensores electroquímicos que miden la capacidad de conducción entre electrodos de un analito en soluciones electrolíticas.

Estos dispositivos suelen utilizar enzimas como elemento de biorreconocimiento, donde la fuerza iónica, y consecuentemente la conductividad, cambia como resultado de la actividad enzimática (D'Orazio et al., 2003).

Las técnicas más comunes de detección electroquímica son la voltamperometría cíclica, la cronoamperometría, cronopotenciometría y la espectroscopía de impedancia.

Voltamperometría cíclica

La voltametría cíclica consiste en la medición de corriente resultante (técnica amperométrica) dada la variación de potencial eléctrico entre dos rangos V_1 y V_2 , entre los cuales se realiza un barrido reversible. Dicho barrido comienza en V_1 , con incrementos dada una tasa de barrido constante hasta llegar a V_2 , a partir del punto en el que el cambio de potencial se realiza en sentido contrario al sentido inicial.

La tasa de escaneo:

$$r = \frac{\Delta V}{\Delta T}$$

Ecuación 2: Tasa de escaneo en voltamperometría cíclica

-donde ΔV representa el cambio de potencial eléctrico, y ΔT el cambio de tiempo-
representa un factor crítico en la obtención de información a partir de la medición, pues la duración del escaneo debe proveer el tiempo suficiente para permitir que ocurra en cantidades perceptibles la reacción electroquímica (Pei et al., 2001).

El cambio de potencial durante el proceso de barrido es medido entre el electrodo de referencia, mientras que la corriente se mide entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo.

Las mediciones obtenidas de potencial eléctrico y corriente se grafican la una contra la otra, resultando en un voltamograma. Conforme el voltaje se incrementa desde V_1 hacia el potencial de reducción electroquímica de un analito, la corriente aumentará hasta formar un pico al alcanzar el potencial de reducción, a partir del cual la corriente comenzará a disminuir continuamente hasta llegar a V_2 .

A medida que el voltaje decremente en dirección de V_1 , la reacción oxidará nuevamente el producto de la reacción inicial. Esto produce un incremento en la corriente con la polaridad contraria al barrido inicial, generando un pico análogo al alcanzar el potencial de oxidación.

Esta técnica puede ser utilizada para obtener información acerca del potencial redox y las tasas de reacción electroquímica de los analitos; adicionalmente, proporciona información acerca de la reversibilidad de una reacción dada una cierta tasa de escaneo (Gosser et al., 1994).

Enzimas como biorreceptores en biosensores electroquímicos

Las enzimas son proteínas capaces de catalizar la conversión de sustratos en productos. Algunas de ellas, conocidas como enzimas redox, producen o consumen electrones durante el proceso de catálisis, lo que las convierte en un componente idóneo para mediciones electroquímicas. Los sitios específicos de enlace de las enzimas pueden, lugar donde se lleva a cabo la catálisis y, por ende, el intercambio electrónico puede ser aprovechado en la medición de densidad de corriente durante la reacción catalítica, transportando portadores de carga a la interfaz con el electrodo a fin de ser cuantificado. El acoplamiento de dichas enzimas a electrodos produce un tipo de dispositivo conocido como bioelectrodo enzimático (Grieshaber et al., 2008).

Los bioelectrodos enzimáticos comprenden un grupo muy importante dentro del desarrollo de biosensores, ya que aprovechan la alta afinidad y selectividad que presentan las enzimas hacia sus moléculas blanco. La arquitectura de un bioelectrodo enzimático consiste en una capa de bio-reconocimiento formada por enzimas inmovilizadas sobre la superficie de un electrodo. Durante el proceso de reconocimiento, la capa enzimática interactúa con el analito, que puede ser un sustrato, cosustrato o cofactor. De la reacción de óxido-reducción producida por la interacción enzima-analito se transportan portadores de carga al transductor y son convertidos en una señal eléctrica cuantificable (Putzbach et al., 2013).

Tradicionalmente, los biosensores electroquímicos se basan en el principio de transducción directa de la corriente en medida proporcional a la tasa de reacción de las reacciones electroquímicas involucradas (Chaubey et al., 2002), volviendo idóneo el hecho de que la reacción se lleve a cabo lo más cerca posible de la superficie del electrodo debido a la difusión multidireccional de los productos de la reacción (incluida la difusión de los portadores de carga). Sin embargo, no siempre es posible debido a la disposición de los sitios de enlace enzimático, volviendo así necesarios métodos de medición indirecta. En estos casos es necesario la utilización de mediadores que permitan el transporte de los portadores de carga desde el centro redox de la enzima hacia la superficie del electrodo. Dichos mediadores suelen ser aceptores artificiales de electrones con un potencial de oxidación bajo, los cuales pueden encontrarse difundidos de manera libre en la solución o medio de la reacción, o inmovilizados en conjunto con la enzima (Grieshaber et al., 2008).

Los bioelectrodos enzimáticos pueden ser dispositivos con una alta sensibilidad, debido a su capacidad de adaptar y confinar interacciones específicas entre distintas moléculas biológicas. Las ventajas que presentan estos dispositivos sobre los sistemas analíticos clásicos provienen de sus características sencillas de operación, ya que generalmente no requieren de una instrumentación especializada ni de usuarios altamente capacitados para su utilización. Por otra parte, los bioelectrodos pueden ser dispositivos económicos y miniaturizables, lo que permite su fácil manipulación y transporte (Grieshaber et al., 2008).

Una de las limitantes presentadas por el uso de enzimas en bioelectrodos es la tendencia de desnaturalización de las enzimas ante cambios de condiciones, afectando su estabilidad química y capacidad catalítica y, por lo tanto, la vida útil y estabilidad operacional del bioelectrodo. Al integrarse en un biosensor de uso comercial, es importante considerar que las enzimas son el componente con la menor vida útil en el sistema, determinando por consiguiente la vida útil del dispositivo mismo (Grieshaber et al., 2008; Putzbach et al., 2013). Ante este reto se han desarrollado métodos de inmovilización para evitar la desnaturalización, desactivación o inhibición de actividad ante cambios de condiciones químicas o temperatura una vez adsorbida la enzima (Chaniotakis et al., 2004; O’Fagain et al., 2003).

Inmovilización de enzimas

Las enzimas gozan de un amplio uso en biosensores en los diferentes sectores de aplicación debido a la especificidad de detección de sustratos de la que gozan; sin embargo, la viabilidad de uso a grandes escalas se ve limitada por la capacidad de reusabilidad de las mismas, volviéndose esto un factor económicamente limitante.

Diversos factores afectan la reusabilidad de las enzimas, entre ellos la formación de complejos, la inhibición por sustratos interferentes y la difícil mantención de la estabilidad estructural.

La inmovilización enzimática representa una solución a las dificultades que representa la desnaturalización por pérdida de estabilidad estructural ante condiciones externas como el pH y la temperatura, y la baja tasa de disponibilidad y recuperabilidad una vez adsorbidas al sensor del que forman parte.

El proceso de inmovilización enzimática consiste en el confinamiento de la enzima a una fase (matriz o soporte) diferente de los sustratos y productos. Algunos de los soportes utilizados son los polímeros inertes y materiales inorgánicos.

Las enzimas inmovilizadas son preferidas ante las libres debido a que el aumento en su tasa de reusabilidad se traduce en la reducción de procesos de purificación para su reobtención tras un proceso de sensado. La inmovilización conlleva, en un contexto industrial, operación económica constante, la posibilidad de automatización de procesos y un aumento en la viabilidad económica debido al incremento de productividad respecto a la inversión inicial (D'Souza, 1998).

A lo largo de los años, diferentes investigadores como Singh et al. (2009) y Wang et al. (2011) han propuesto diversos métodos de inmovilización enzimática, tales como: la adsorción de portadores, el cual consiste en el uso de portadores insolubles en agua como derivados de polisacáridos, polímeros sintéticos y vidrios; el entrelazado covalente, método dependiente del uso de reactivos como glutaraldehído, bisdiazobencidina y diisocianato de hexametileno.

Las distintas técnicas de inmovilización enzimática pueden ser clasificadas según el principio físico de inmovilización en:

- Adsorción: técnica resultante de las interacciones hidrofóbicas y enlaces entre sales, donde el soporte se recubre de la enzima para un proceso de adsorción física o bien, la enzima se deposita directamente sobre la superficie de un electrodo y se permite el secado del medio en el que se encuentra.

Las enzimas adsorbidas se encuentran protegidas ante la agregación, proteólisis e interacción contra interfaces hidrofóbicas (Spahn and Minteer 2008).

Una de las ventajas provistas por este método es el aumento en área superficial, el cual favorece las reacciones ácido-reducción y es, por consiguiente, ideal para su utilización en bioelectrodos enzimáticos.

- Enlace covalente: técnica resultante de la asociación de los aminoácidos de la cadena lateral de la enzima usada a los grupos funcionales en la interface, tales como el imidazol, indol, hidroxilo fenólico, por medio de enlaces covalentes. (Singh et al. ,2009)

Según el tratamiento y los grupos funcionales a los que se enlace la enzima, las propiedades pueden sufrir modificaciones útiles tales como el aumento en la vida media y en la estabilidad operacional dado el acoplamiento a soportes como sílice mesoporoso y quitosano; o un aumento en la actividad residual debido al incremento en el área superficial y porosidad al entrecruzar enzimas con nanofibras electrohiladas (electrospinning).

Las superficies modificadas por péptidos, tales como las reportadas por (Fu et al., 2011), en cambio reportan una mayor actividad específica y un aumento en la estabilidad operacional.

- Inmovilización por afinidad: método que aprovecha la afinidad de la enzima al soporte donde será inmovilizada en condiciones fisiológicas. Se puede lograr de dos maneras: preacoplando la matriz a un ligando afín a la enzima a usar o bien, conjugando la enzima a una molécula con afinidad hacia la matriz.
- Atrapamiento: método que consiste en la encapsulación de las enzimas dentro de geles o fibras por medio de enlaces no covalentes.

Algunas de las ventajas reportadas han sido la prevención de la friabilidad y de lixiviado en las enzimas -es decir, la pérdida de enzima de la interface con el tiempo-, así como el aumento de la actividad enzimática.

Singh et al. (2009) refieren de manera conjunta con la técnica de inmovilización una serie de características que debe tener una matriz de soporte para el proceso de inmovilización enzimática, entre las cuales destacan la costeabilidad, ser inerte ante las reacciones realizadas durante el proceso de sensado, la mantención de su estabilidad química, capacidad de regenerabilidad tras varios ciclos de sensado y la reducción de inhibición de productos.

Nanotubos de carbono multipared

Los nanotubos de carbono, descubiertos por Ijima (1991), son macromoléculas cilíndricas compuestas de láminas de grafeno enrolladas de forma cilíndrica con un diámetro que puede ir desde los 2nm a los 50nm, de especial relevancia en el campo de los biosensores enzimáticos (Giraldo et al., 2007). Una variante de los nanotubos de carbono sencillos (CNT) son los nanotubos de carbono multipared (MWCNT), cuya disposición es idéntica a los CNT, con la diferencia de encontrarse envueltos uno en otro de manera concéntrica y una separación entre capas de 0.34nm. Las reducidas dimensiones de éstos, sin embargo, dificultan su uso como interfaces en biosensores con elementos de reconocimiento de mayor tamaño, tales como células y tejidos. (Putzbach et al., 2013)

Los carbonos que componen la estructura de los nanotubos de carbono se encuentran enlazados de manera covalente con sus tres vecinos adyacentes, dando así origen a una estructura de enrejado hexagonal (Kumar et al., 2007).

Sus principales métodos de síntesis son la ablación por láser (Rinzler et al., 1998; Giraldo et al., 2007), descarga de arco eléctrico (Journet et al., 1997), vaporización de electrodos de grafito (Thess et al., 1996) y deposición de vapores químicos (Bell et al., 2006).

Diversos estudios reportan una serie de propiedades excepcionales tanto en los CNT como en los MWCNT, entre las que podemos encontrar: una alta capacidad conductiva térmica y eléctrica, resistencia y dureza excepcionales y baja densidad (Narwal et al., 2018). Putzbach et al. (2013) describen una importante diferencia entre ambas variaciones de nanotubos de carbono: los CNT, debido a su hibridación, pueden actuar como conductores metálicos o semiconductores dependiendo de su estructura; en cambio, los nanotubos de carbono tienen un comportamiento más similar a los conductores metálicos y una mayor conductividad, haciéndolos más apropiados para aplicaciones de biosensores electroquímicos.

De manera más específica a su aplicación en sistemas de sensado electroquímico, al ser químicamente inertes y térmicamente estables, los CNT permiten se vuelven una

alternativa bastante atractiva para fungir como matriz de inmovilización enzimática (Varadan et al., 2006).

El primer biosensor desarrollado con nanotubos de carbono como método de inmovilización enzimática fue reportado por Britto (1996), a partir del cual se ha despertado interés en sus propiedades y beneficios al ser introducidos como matriz interfaz con el transductor en sistemas de sensado. Las propiedades beneficiosas conferidas reportadas con su incorporación incluyen una mayor sensibilidad, una tasa de respuesta más rápida ante mediciones y límites de detección menores en comparación con otros métodos (Kumar et al., 2007).

Con respecto al uso de enzimas como elementos de biorreconocimiento, una limitante importante en la obtención de señales eléctricas suficientemente perceptibles es la distancia del sitio activo enzimático hacia el electrodo y su consecuente disminución en intensidad de corriente transducida. Los nanotubos de carbono, al ser utilizados como método de inmovilización y debido a su alta tasa de transferencia electrónica, pueden ser aprovechados a su vez como mediadores para la transferencia de portadores de carga hacia la superficie del electrodo (Narwal et al., 2018).

Los factores restantes en la disminución de intensidad de señales también se ven amortiguados al utilizar complejos enzima-CNT:

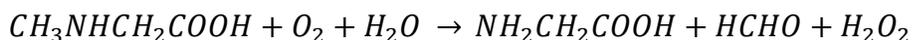
- La estructura hueca y cilíndrica de los nanotubos de carbono da pie a la posibilidad de realizar la inmovilización de manera interna o externa a las paredes cilíndricas de la molécula, evitando el bloqueo de los sitios activos en la enzima y, por consiguiente, aumentando los rangos de linealidad de detección al no restringir la cantidad de sitios disponibles para la catálisis enzimática. (Putzbach et al., 2013)
- La alta relación superficie-volumen da lugar a una mayor capacidad de adsorción enzimática aumentando la tasa de catálisis; aunado a que permiten la difusión radial de los reactivos a las enzimas gracias a la apertura estructural de la que disponen, factores los cuales aumentan la razón señal-ruido obtenida al ser captada por el transductor. (Putzbach et al., 2013)

La adsorción física de las enzimas en los nanotubos de carbono se efectúa por medio de enlaces no covalentes. Éstos tienen una estructura aromática hidrofóbica, y no permite enlaces electrostáticos a menos que se encuentren funcionalizados. (Putzbach et al., 2013)

El método de adsorción física enzimática desarrollado por Lyons y Keely (Lyons et al., 2008) es un ejemplo prevalente en la actualidad de su uso en electrodos, en el cual por medio del pulido mecánico de la superficie del electrodo con alúmina y una almohadilla de nylon se prepara la superficie para su acoplamiento, para posteriormente aplicar una gota de la solución enzimática y permitir que el solvente se evapore. El resultado es la adsorción física de la enzima inmovilizada en una superficie libre de impurezas, hecho comprobable por medio de voltametría cíclica.

Sarcosina Oxidasa en bioelectrodos

La sarcosina oxidasa monomérica es una enzima que cataliza la producción de glicina por medio de la desmetilación oxidativa de la sarcosina. La reacción de óxido-reducción llevada a cabo es la siguiente:



Donde la reacción de oxidación del enlace entre el átomo de nitrógeno y el carbono metilo de la sarcosina se produce en el sitio del residuo Cys315, catalizada por el dinucleótido flavina adenina. Sin embargo, actualmente se desconoce el mecanismo de acción de esta catálisis de manera precisa.

Yukihiro et al. (2017) propusieron una serie de mecanismos, de entre los cuales el mecanismo de transferencia de hidruros resultó el más viable de manera teórica. Dicho mecanismo propone la transferencia de hidrógeno en estado atómico, y la transferencia de un único electrón de la sarcosina hacia el dinucleótido flavina-adenina (FAD).

La reacción redox resultante de la desmetilación presenta la posibilidad de detectar los niveles de sarcosina como biomarcador por medio de la reacción óxido-reducción y la transferencia de electrones resultante (Becerra Hernández, 2017); sin embargo, la selectividad y vida útil de la enzima se pueden ver afectadas por las condiciones de almacenamiento y operación. Para mitigar dichos efectos negativos se emplea un proceso de inmovilización enzimática, la cual limita la enzima a una matriz diferente y la vuelve insoluble (Datta et al., 2013). Recientemente se han demostrado las ventajas del uso de nanotubos de carbono multipared, como el incremento en el área de superficie y la facilidad de adsorción enzimática a éstos (Tavares et al., 2015).

Debido a la naturaleza oxido-reductora de la reacción de desmetilación catalizada por la enzima sarcosina oxidasa, un acercamiento por mediciones voltamperométricas permite el aprovechamiento de la capacidad de detección específica de la enzima para la cuantificación del sustrato deseado (Narwal et al., 2018).

Metodología

Se adaptó el método de inmovilización y caracterización enzimática presentado por Becerra Hernández (2017) para la inmovilización de Sarcosina Oxidasa (SOX) en nanotubos de carbono multipared (MWCNT). La enzima sarcosina oxidasa (Sigma Aldrich) es proveniente de la bacteria *Bacillus* sp.

1. Evaluación de la estabilidad operacional y de almacenamiento de la enzima SOX inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (SOX/MWCNT).

La estabilidad operacional se define como la capacidad de una enzima inmovilizada de ser reutilizada tras ser sometida a un método físico de recuperación como la centrifugación o filtración, lo cual permite la reducción de costos operativos (Lucarelli et al., 2012).

La resistencia y efectividad del sistema enzima-soporte ante su uso en varias iteraciones fueron obtenidos por la aplicación de ciclos consecutivos de catálisis enzimática, proceso consistente en el empacado de ésta en una columna cromatográfica (Bio- Rad), en la cual se llevaron a cabo 15 ciclos de la reacción enzimática (desmetilación oxidativa), empleando solución amortiguadora de glicilglicina con sarcosina.

Posteriormente, la evaluación de la estabilidad de almacenamiento de la enzima inmovilizada (SOX/MWCNT) fue realizada al mantener 1 mL de la suspensión (4 mg) a 4 °C en amortiguador de glicilglicina (60 mM, pH 8.3). Se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática de la muestra durante un periodo de 30 días.

2. Modificación del electrodo serigrafiado de carbono con la inmovilizada en los nanotubos de carbono multipared.

La adaptación del bioelectrodo fue realizada en un electrodo serigrafiado obtenido por fotolitografía, cuya superficie fue sometida a un proceso de limpieza mediante sonicación en un baño de acetona al 20 % en agua desionizada. Posteriormente, se aplicaron dos lavados con agua desionizada y un lavado con etanol al 96 %, y reposo hasta secado a temperatura ambiente (25° C). En la superficie del electrodo fueron depositadas dos gotas (aproximadamente 2 µl) de la enzima inmovilizada (SOX/MWCNT), y reposado hasta

secado a temperatura ambiente. Finalmente, el electrodo modificado (SOX/MWCNT/ESC) fue sometido a tres lavados con una solución de PBS 20 mM para eliminar el soporte no adsorbido a su superficie.

3. Caracterización electroquímica del bioelectrodo (SOX/MWCNT/ESC)

La capacidad electrocatalítica del bioelectrodo fue cuantificada a través de mediciones de voltamperometría cíclica a temperatura ambiente (25° C) por medio de un potenciostato (Modelo VSP, Bio-Logic, Francia), empleando un conector modelo DSC (Dropsens, España) para adaptar el bioelectrodo al potenciostato.

3.1 Evaluación de la oxidación de sarcosina por el biocatalizador (SOX/MWCNT) y el bioelectrodo (SOX/MWCNT/ESC) mediante voltamperometría de pulso diferencial.

Se evaluó la respuesta de oxidación del biocatalizador (SOX/MWCNT) hacia diferentes diluciones de sarcosina en solución amortiguadora de glicilglicina (60 mM, pH 8.3), mediante voltamperometría de pulso diferencial (DPV).

Posteriormente, se examinó el comportamiento del bioelectrodo (SOX/MWCNT/ESC) hacia distintas soluciones de sarcosina en solución amortiguadora de glicilglicina (0, 100 y 200mM).

3.2 Evaluación de la reducción de peróxido de hidrógeno por el biocatalizador (SOX/MWCNT) mediante voltamperometría cíclica.

La detección de sarcosina es realizada de manera indirecta, a través de la detección del peróxido de hidrógeno generado como producto de la reacción catalítica. Se realizaron estudios comparativos de la capacidad de reducción del peróxido de hidrógeno por medio de voltamperometría cíclica en distintos arreglos de electrodos: a) nanotubos de carbono multipared no funcionalizados (MWCNT-NF), b) nanotubos de carbono multipared funcionalizados (MWCNT-F), y nanotubos de carbono multipared con la enzima SOX acoplada (biocatalizador, SOX/MWCNT); en presencia de una solución de peróxido de hidrógeno 10 mM en amortiguador de glicilglicina.

4. Estudios operacionales del bioelectrodo (SOX/MWCNT/ESC).

4.1 Estudio de estabilidad de ensayo.

Con el objetivo de evaluar el rendimiento del bioelectrodo (SOX/MWCNT/ESC) durante diversos ciclos de detección de sarcosina se llevó a cabo un estudio de estabilidad de ensayo, el cual consistirá en el registro de las respuestas amperométricas generadas por el bioelectrodo mediante de voltametría de pulso diferencial (DPV), en presencia de soluciones de sarcosina a diferentes concentraciones en un medio de solución amortiguadora (pH 7.4). Las respuestas generadas por cada solución de sarcosina serán registradas durante tres ciclos de reacción, realizando un paso intermedio de lavado del bioelectrodo con solución amortiguadora.

Resultados y discusión

Propiedades de la sarcosina oxidasa

De acuerdo a la hoja técnica proporcionada por Brenda Enzymes (Matsuda et al., 1987), las propiedades de la sarcosina oxidasa obtenida de la bacteria *Bacillus* sp son las siguientes:

Sarcosina Oxidasa	
KM [mM] - sustrato: sarcosina	12.2
Temperatura óptima de actividad [°C]	37
Rango de pH - Estabilidad	7 - 10 [pH]
Rango de pH - Actividad óptima	8.5 - 9 [pH]

Tabla 2: propiedades de la sarcosina oxidasa, obtenida de Brenda Enzymes (Matsuda et al., 1987)

Se realizaron una serie de pruebas para medir los efectos de la temperatura y el pH en la actividad enzimática tanto en la enzima libre como en la enzima inmovilizada, así como su respuesta a diferentes concentraciones de sarcosina.

Efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática

La estructura proteica de una enzima, determinada por la secuencia de aminoácidos que lo conforman, a su vez determina la estructura de los sitios activos posibles en una enzima. El estado del sitio activo, zona donde se realiza la reacción catalítica, dicta la capacidad de catálisis de una enzima, permitiendo un nuevo proceso una vez que el sitio se libere del sustrato utilizado para la reacción.

Dado un agregado de enzimas en un medio, la velocidad de reacción está directamente ligada a la cantidad de enzima, la cantidad de sustrato, el sustrato utilizado -y, por consiguiente, la afinidad de la enzima a dicho sustrato- y las condiciones en las que se

realiza la reacción; sin embargo, el aumento de la concentración de sustrato tiene un efecto limitado debido a la dependencia de la disponibilidad de sitios activos libres para la continuación de las reacciones catalíticas. Una vez alcanzada cierta concentración, el medio con el sustrato se considera saturado y la velocidad de reacción no aumentará aún al aumentar la concentración de sustrato.

El ensayo de actividad enzimática de la sarcosina oxidasa dada distintas concentraciones de sarcosina, presentado en la Figura 4, demuestra la saturación de la sarcosina oxidasa libre dada una concentración de sustrato de 400mM, a partir de la cual se puede apreciar una meseta en la gráfica manteniendo una tasa de catálisis de 0.025mM/s.

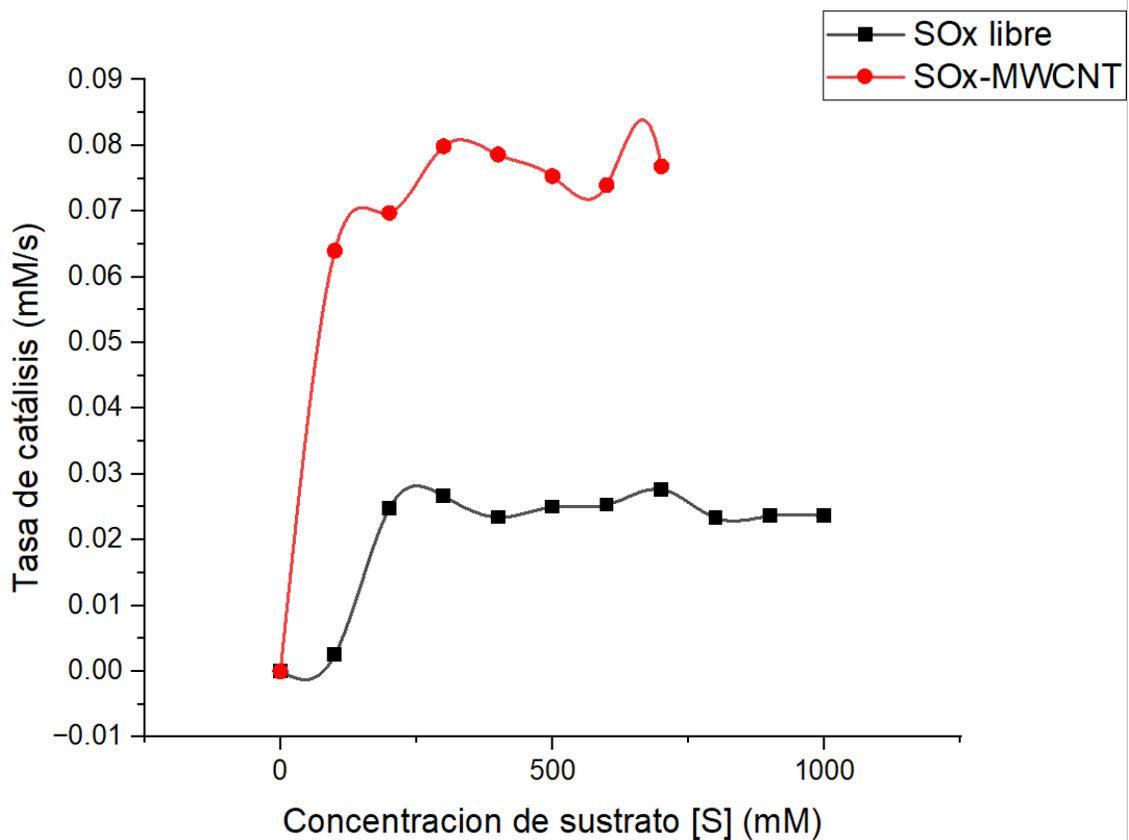


Figura 4: Parámetros cinéticos de sarcosina oxidasa libre e inmovilizada sobre nanotubos de carbono multipared a pH 8.3, 37°C en diferentes concentraciones de sarcosina.

En concordancia con lo expuesto por Datta et al. (2013), la adsorción física en la enzima inmovilizada a los nanotubos de carbono permitió un aumento en la tasa de catálisis. El comportamiento de los puntos sugiere que la meseta puede ser alcanzada alrededor de los

300 a 400 mM, comportamiento esperado con una cantidad igual de enzima entre pruebas; sin embargo, se presenta una mayor tasa de catálisis. Esto apunta a un aumento en la cantidad de sitios activos disponibles dado un cierto punto en el tiempo; especulativamente la adsorción a los nanotubos de carbono permitió el posicionamiento enzimático de manera que ninguno de los sitios activos fuesen bloqueados durante el proceso de catálisis.

El aumento de la tasa de catálisis es mayor al 100%, sugiriendo resultados satisfactorios para el uso de la enzima inmovilizada en un sensor, dando pie a la expectativa de una mejora cuantitativa en la señal eléctrica del sistema de sensado.

Efecto de la temperatura y el pH en la actividad enzimática

Los rangos de pH y temperatura tomados para el desempeño de las pruebas fueron seleccionados con base en los resultados experimentales de la actividad enzimática con variaciones de dichas condiciones externas, así como la información disponible de los rangos óptimos de funcionamiento.

El punto de temperatura establecido como óptimo según Brenda Enzymes (Matsuda et al., 1987) es de 37°C, temperatura cercana a la corporal. La Figura 5 muestra los resultados experimentales obtenidos, confirmando de manera muy estrecha que la actividad enzimática se ve favorecida en temperaturas similares a las reportadas.

La enzima libre presenta una caída considerable en los extremos de los rangos utilizados durante el ensayo, tanto por debajo de los 25°C como por encima de los 45°C. El descenso en la actividad enzimática en el extremo menor puede ser atribuido a la baja energía presente en la reacción, producto directo de la cantidad de calor -y por ende, de energía- en el medio; en cambio, el descenso de la actividad enzimática en el extremo de mayor temperatura indicaría en primera instancia un cambio morfológico en las enzimas debido a la desnaturalización causada por el cambio de temperatura, y la consecuente reducción de sitios activos disponibles. Esto es contrastante con los estudios de Guo et al. (2006), quien reporta una temperatura óptima de 60°C en sarcosina oxidasa proveniente de *Escherichia coli*.

Por otro lado, la actividad enzimática con el complejo SO_x-MWCNT muestra un comportamiento favorecedor en el rango de 25-45°C, la cual ronda los 2.9 U/ml; sobre los extremos de ese rango la enzima libre sufrió una caída notable en actividad. Asimismo podemos observar un aumento considerable del desempeño en los extremos de temperatura en comparación con la enzima libre; el aumento de actividad en el rango de temperatura de 45-55°C proporciona solidez a la teoría de desnaturalización en ese rango, puesto que la adsorción a los nanotubos de carbono proporcionaría una disposición resistente al cambio de la estructura enzimática.

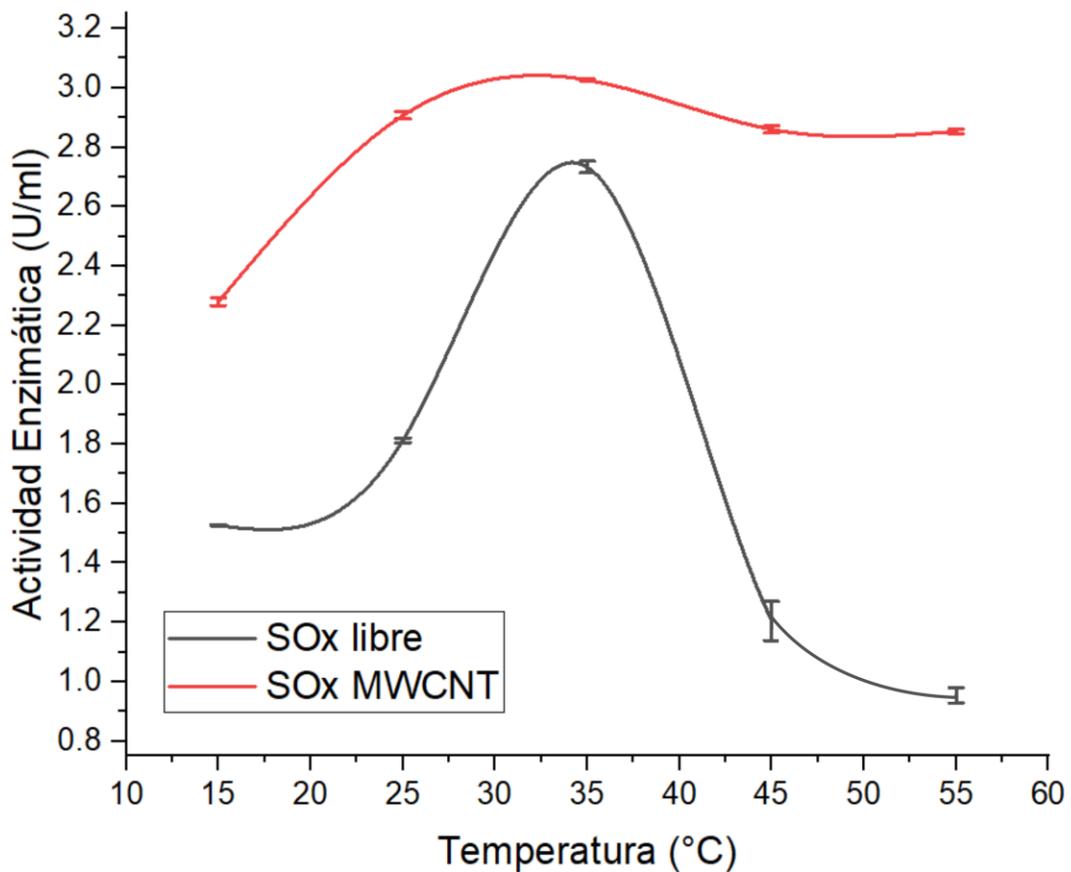


Figura 5: Comparación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en sarcosina oxidada purificada libre e inmovilizada en nanotubos de carbono

Las implicaciones del aumento de actividad ante un rango mayor de temperatura proporcionan un pronóstico prometedor en su uso comercial. La temperatura regular de la orina recién emitida es de 35.61-37.61°C (Geneva et al., 2019), rango bastante cercano tanto a la temperatura óptima para la sarcosina oxidasa reportada por Matsuda et al., como a los resultados obtenidos de este estudio. El aumento de actividad bajo una reducción de temperatura volvería viable el estudio en orina en una ventana de tiempo aceptable, puesto que la orina expuesta a la temperatura ambiente durante 4 minutos sufre una pérdida considerable de calor, y por consecuencia restringe la ventana de tiempo permisible para realizar una medición viable (Geneva et al., 2019).

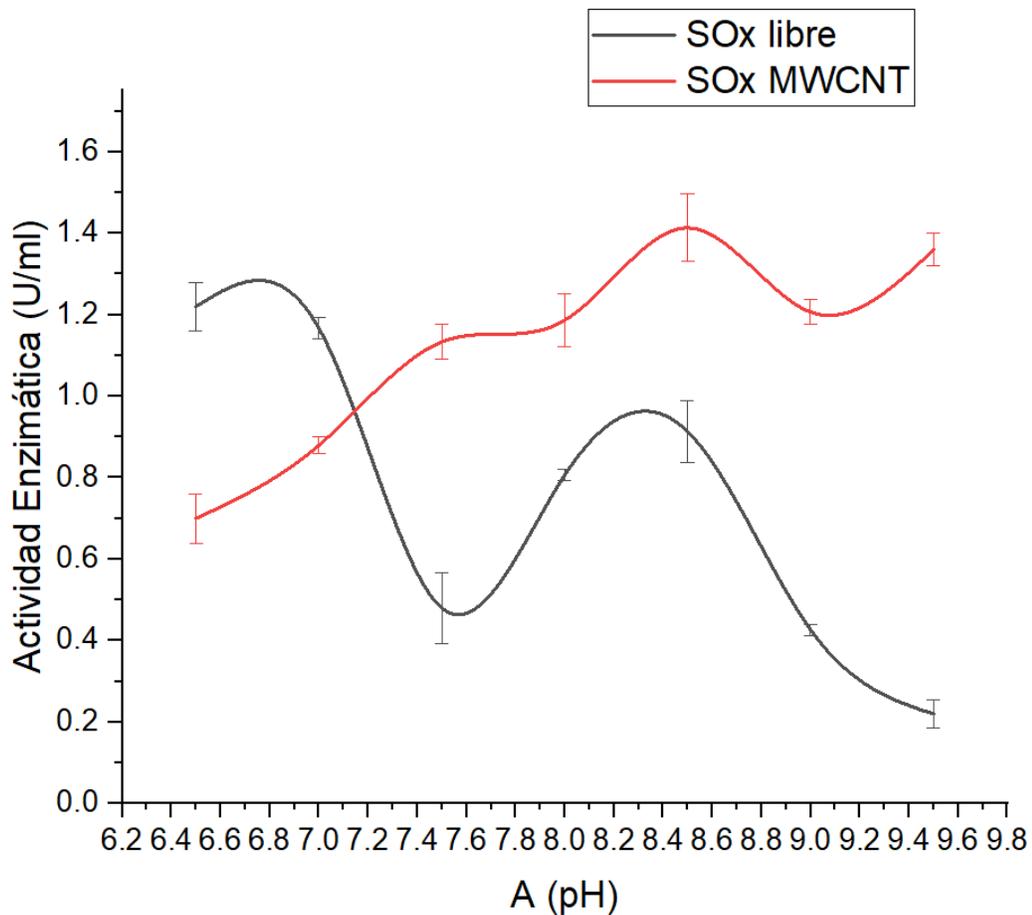


Figura 6: Comparación del efecto del pH sobre la actividad enzimática en sarcosina oxidasa purificada libre e inmovilizada en nanotubos de carbono

Las mediciones realizadas dadas la variación del pH, mostradas en la Figura 6, muestran un resultado comparativo dentro de las expectativas en el rango de pH de 7.5 a 9.0, con un aumento pronunciado en la actividad enzimática del complejo SOx-MWCNT en comparación con la enzima SOx libre. El aumento de actividad del complejo SOx-MWCNT puede ser atribuido a un efecto protector de los grupos funcionales de los aminoácidos en la enzima por parte del soporte ante la deprotonación en un ambiente alcalino -pH mayor a 7, presencia de iones [OH⁻]-.

La sarcosina oxidasa libre, contrario a las expectativas, presentó un aumento pronunciado en la actividad enzimática en el pH de 6.5, con una actividad significativamente mejor que el complejo SOx-MWCNT en el rango de pH 6.5-7.0.

De acuerdo con King et al. (2014), las condiciones de pH de la orina pueden variar entre 4.5 y 8. Esto representa una posible complicación durante la integración a un sistema de biosensado, conteniendo este rango la mayor variación entre actividad enzimática entre la sarcosina oxidasa libre y la sarcosina oxidasa inmovilizada.

Caracterización electroquímica del bioelectrodo

Se realizaron una serie de pruebas electroquímicas para la determinación de la respuesta del complejo sarcosina oxidasa/nanotubos de carbono multipared (SOx-MWCNT). La Figura 7 muestra el voltamperograma cíclico de la reacción catalítica del complejo SOx-MWCNT ante diferentes concentraciones de sarcosina, incluyendo la ausencia de la misma. Los resultados muestran cuasi-reversibilidad de la reacción en el barrido cíclico, así como un aumento de aproximadamente 1 μ A en las corrientes catódicas y anódicas correspondiente por cada aumento de la concentración de sustrato en 100mM.

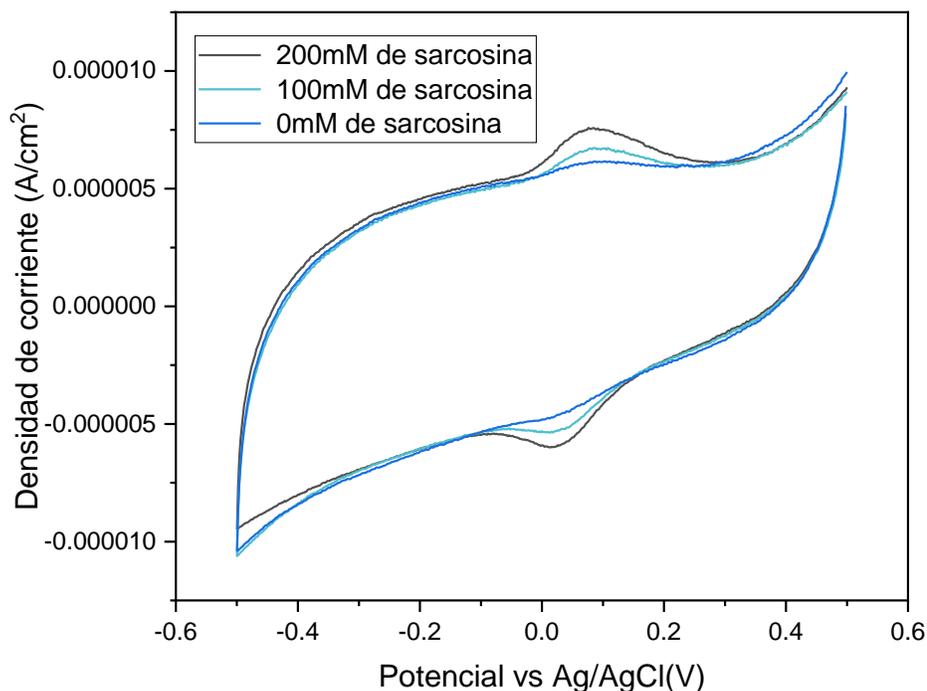


Figura 7: Voltamperograma cíclico de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa en presencia y ausencia de sarcosina en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5, 2mM de ferroceno metanol y velocidad de barrido de 25mVs-1.

La Figura 8 muestra el efecto de la variación de la velocidad de barrido durante la voltametría cíclica, demostrando un aumento en la densidad de corriente medida conforme la velocidad de barrido aumentaba. A partir de estos resultados se puede inferir que la reacción redox es altamente dependiente de la diferencia de potencial eléctrico sobre el tiempo; las condiciones capaces de alterar esto en condiciones de operación son la concentración de analito y la influencia de su carga eléctrica neta, así como la concentración de iones [H⁺] y [OH⁻] -comportamiento dictado por el pH del medio utilizado en el proceso de sensado-.

Los valores de picos de voltaje obtenidos fueron:

Pico de potencial catódico: $E_{pc}=0.017V$

Pico de potencial anódico: $E_{pa}=0.084V$

Potencial de media onda: $E_{1/2}=0.033V$

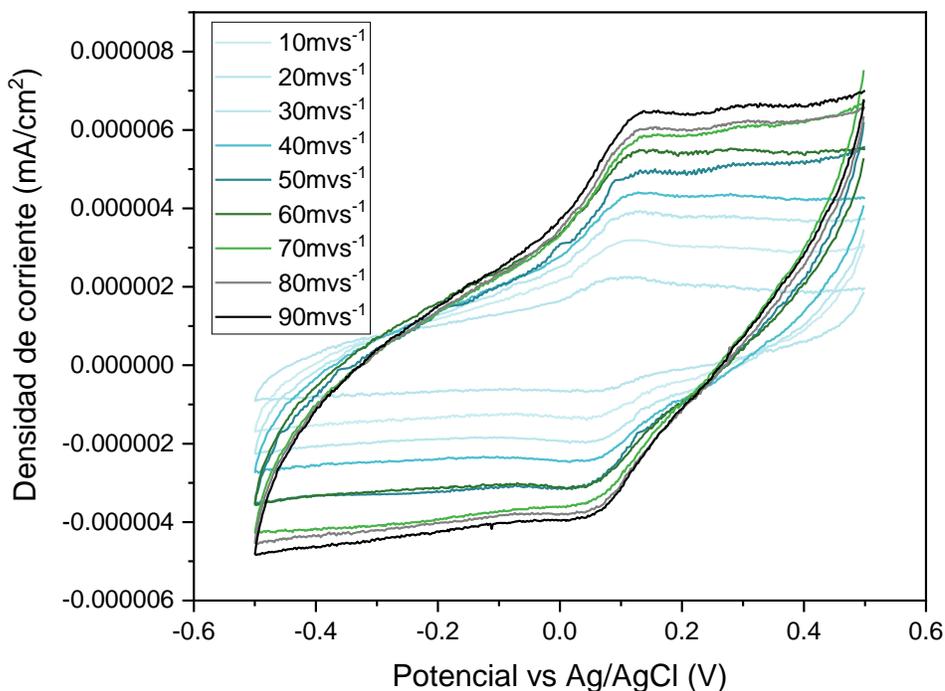


Figura 8: Voltamperograma cíclico de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa en presencia de sarcosina 100mM en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5, 2mM de ferroceno metanol a diferentes velocidades de barrido.

La Figura 9 presenta los resultados de la voltametría de pulso diferencial realizada con concentraciones de sarcosina entre 0 y 1500mM (incrementos de 187.5mM), con un barrido entre -0.3V y 0.5V. Se puede observar un aumento homogéneo en la densidad de corriente a la par del aumento de las concentraciones de sarcosina, sugiriendo una relación de proporcionalidad entre el aumento de concentración y la densidad de corriente. El uso de un voltaje y una concentración de sarcosina establecidos permite el análisis de esta relación, el cual es mostrado en la curva de calibración de la Figura 10.

El pico mayor para todas las concentraciones se encuentra en 0.63V, punto donde se muestra de manera clara el efecto de concentración en la de densidad de corriente.

Adicionalmente, la Figura 9 valida la sugerencia de cuasi-reversibilidad presentada en la Figura 7, dado que el pico no muestra una simetría perfecta.

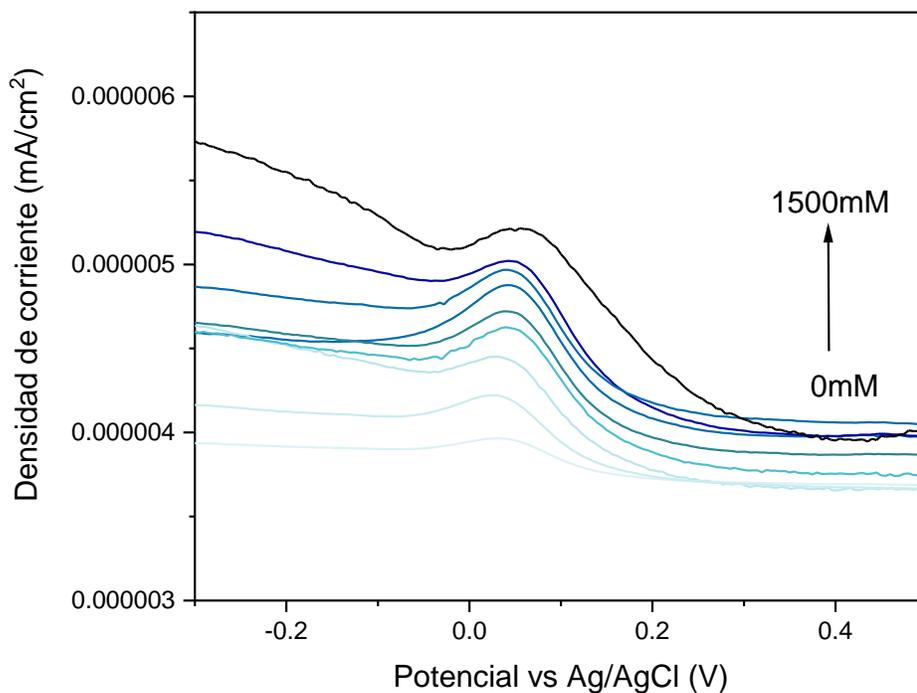


Figura 9: Voltamperograma de pulso diferencial de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa a diferentes concentraciones de sarcosina en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol

La curva de calibración presentada en la Figura 10 permite apreciar un rango lineal desde 0 hasta 1500mM de sarcosina, cubriendo el rango de interés de 0.1683uM presentado por Yousefi et al. (2020). El coeficiente de determinación r^2 provee una excelente capacidad de ajuste lineal, con un valor de 0.99631, determinando así una alta capacidad predictiva de la variabilidad por el modelo.

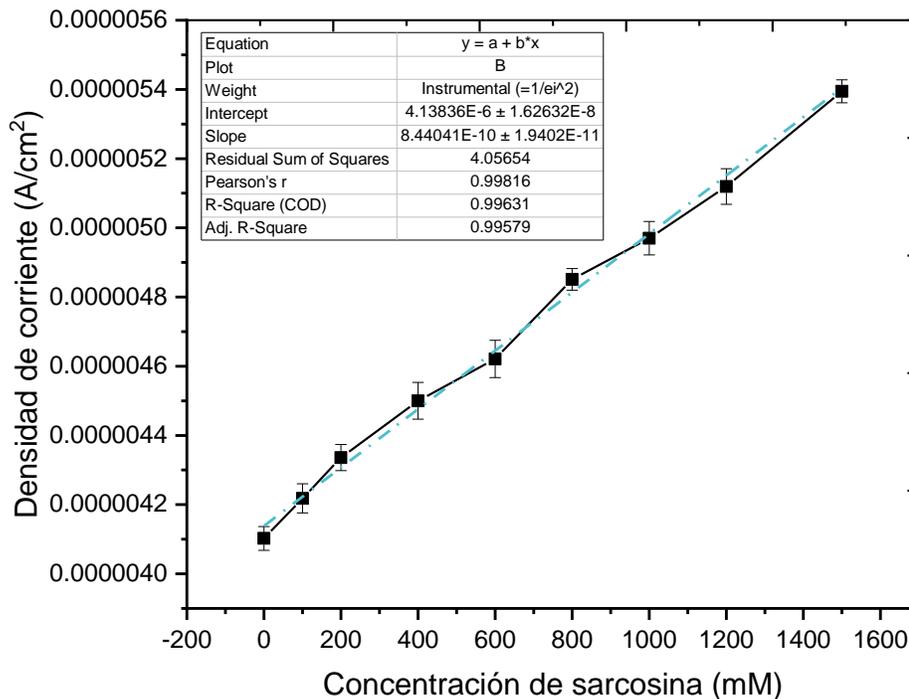


Figura 10: Curva de calibración usando el electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa en presencia de sarcosina a distintas concentraciones en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol.

La Figura 11, consistente en los resultados de la voltametría de pulso diferencial de SOx-MWCNT a una concentración de 100nM y variaciones de pH en el rango de 7.5 a 9, nos presenta un resultado muy similar al obtenido en la Figura 6, mostrando una respuesta favorable de la densidad de corriente medida según la actividad enzimática de la SOx-MWCNT, con la mayor densidad correspondiente al pH óptimo: 8.5, seguida de las cantidades de pH con un cierto grado de inhibición de la actividad enzimática.

En este caso, el pico de densidad de corriente está dado en un voltaje similar al potencial de la Figura 8, con un valor de $E_p = 0.11V$.

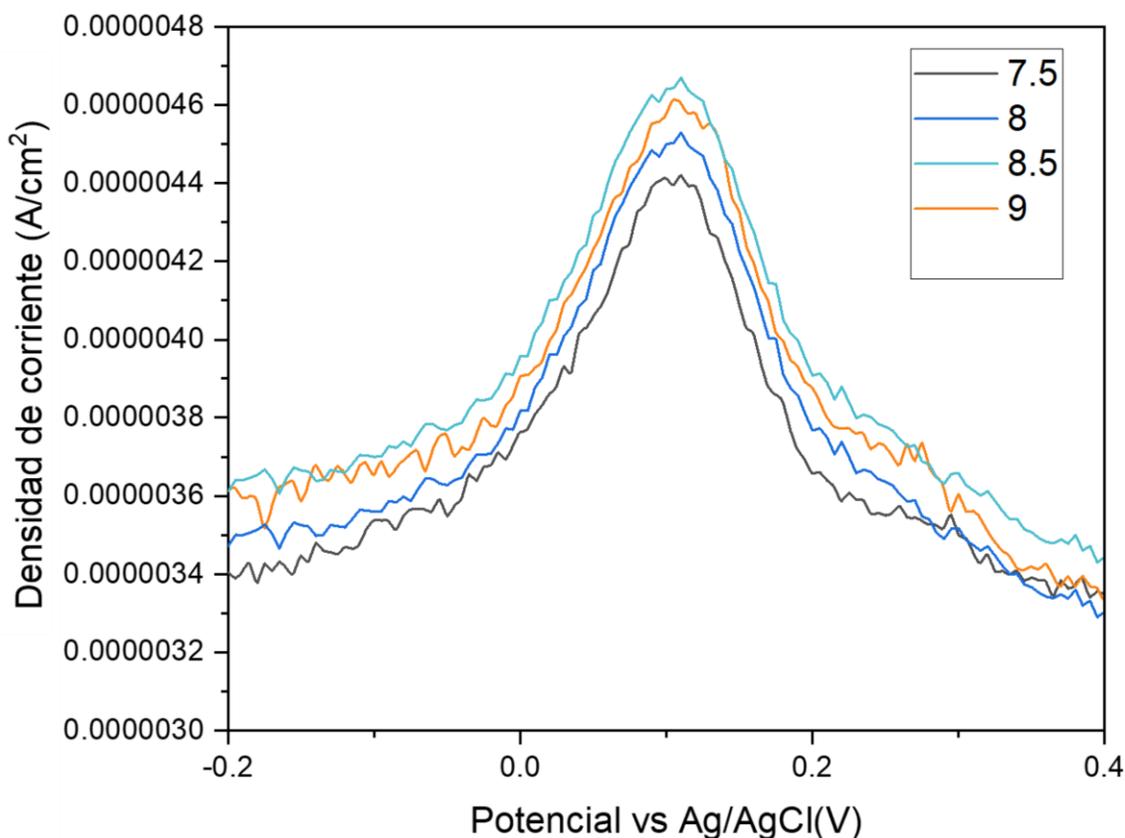


Figura 11: Voltamperograma de pulso diferencial de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa a 100Mm de sarcosina en solución a diferentes valores de pH y 2mM de ferroceno metanol

La Figura 12, consistente en los resultados de la voltametría de pulso diferencial de SOx-MWCNT a una concentración de 100nM y variaciones de temperatura en el rango de 15°C a 45°C, nos presenta un resultado muy similar al obtenido en la Figura 7 en el rango de temperaturas de 25°C a 45°C, mostrando un aumento en la densidad de corriente medida según la actividad enzimática de la SOx-MWCNT proporcional a la actividad enzimática reportada por la misma Figura 7, con la mayor densidad correspondiente al valor de temperatura más cercano a la óptima: 35°C -con 37°C siendo lo reportado por Brenda Enzymes (Matsuda et al., 1987)-. Notablemente, el complejo SOx-MWCNT presenta un aumento considerable en su capacidad de detección de densidad de corriente a los 15°C, mientras que la temperatura de 55°C propicia una abrupta caída en la densidad de corriente medida. Esto podría indicar que la afección conjunta de la temperatura y el potencial

eléctrico aplicado al complejo $\text{SO}_x\text{-MWCNT}$ tiene un efecto en la capacidad de mantener su estructura estable pasada cierta temperatura mayor a los 45°C .

En este caso, el pico de densidad de corriente está dado en un voltaje similar al potencial de la Figura 8, con un valor de $E_p = 0.11\text{V}$.

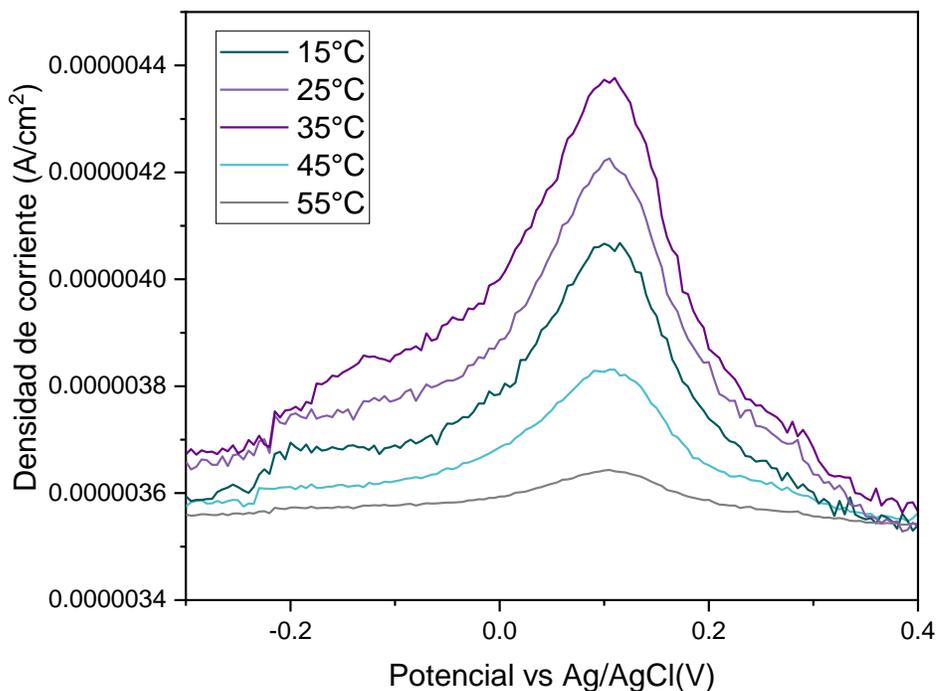


Figura 12: Voltamperograma de pulso diferencial de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa a diferentes temperaturas de sarcosina 100Mm en solución amortiguadora pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol

La Figura 13 presenta los resultados de voltametría lineal a diferentes concentraciones de sarcosina bajo las condiciones estándar usadas en todas las pruebas electroquímicas. En ella podemos observar un pico de corriente en $E_p = 0.133\text{V}$; resultado consistente con el voltaje pico de oxidación de las demás pruebas.

El efecto de la concentración es significativo dado el voltaje pico, siendo consistente con las pruebas de concentración reportadas en la Figura 4. De igual manera, podemos notar una meseta similar a la de la Figura 4, indicando que el aumento del potencial de oxidación no propicia una mayor tasa de reacción debido a la saturación de los sitios activos de la enzima SOx.

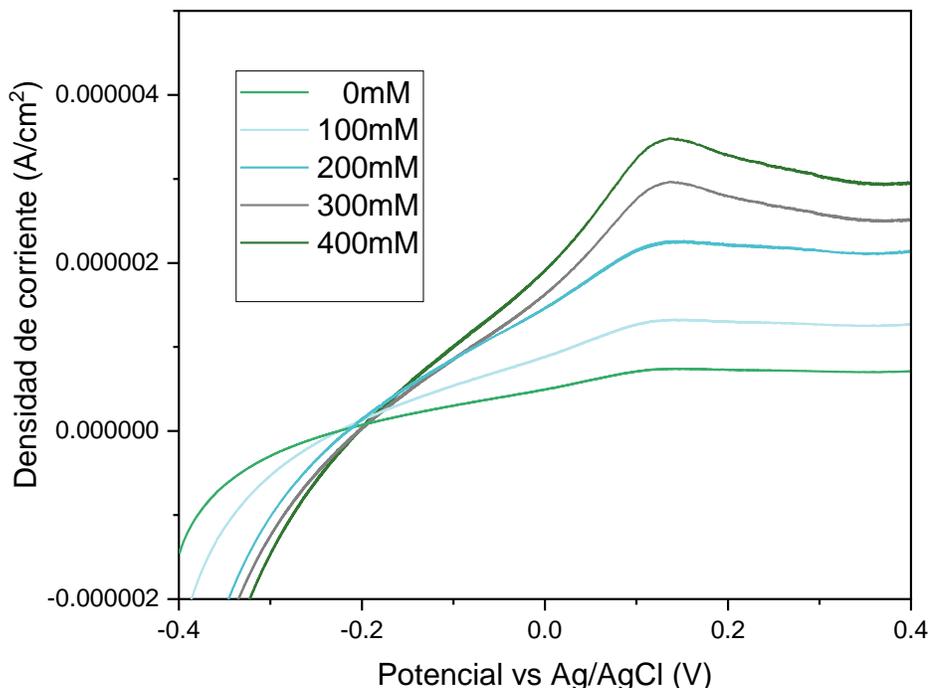


Figura 13: Voltamperograma lineal de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa a diferentes concentraciones de sarcosina en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol

La Figura 14 presenta los resultados de la cronoamperometría utilizada para la determinación del tiempo de respuesta estable del sensor, así como del coeficiente de difusión de la sarcosina hacia el electrodo.

La cronoamperometría consiste en la aplicación de un pulso escalón a la celda electroquímica, la cual responderá de manera acelerada con un incremento de corriente

instantáneo debido a la corriente capacitiva creada por el aumento repentino de voltaje. Una vez estabilizada la corriente, podemos obtener el tiempo de respuesta del sensor.

La Figura 14 muestra un tiempo de respuesta estable pasados los 100s de iniciada la reacción.

El coeficiente de difusión está dado por la ecuación de Cottrell:

$$i = \frac{nFAc_j^0\sqrt{D_j}}{\sqrt{\pi t}}$$

Ecuación 3: Ecuación de Cottrell.

Donde:

i = Corriente [A]

n = Número de electrones involucrados en la reacción

F = Constante de Faraday, 96485 [C/mol]

A = Área del electrodo en [cm²]

c_j^0 = Concentración inicial del analito [mol/cm³]

D_j = Coeficiente de difusión para el analito [cm²/s]

t = Tiempo [s]

Resolviendo para la sarcosina y con los parámetros dados:

$$D_j = \left(\frac{i\sqrt{\pi t}}{Ac_j^0 nF} \right)^2$$

Ecuación 4: Ecuación de Cottrell resuelta para D_j

$i/A = 1.864\ 055 \times 10^{-8}$ [A/cm²]

$n = 1$

$F = 96485$ [C/mol]

$c_j^0 = 1 \times 10^{-7}$ [mol/cm³]

$t = 500$ [s], dado un punto estable de la cronoamperometría

el coeficiente de difusión de la sarcosina es de $5.862\ 934 \times 10^{-9}$ [cm²/s].

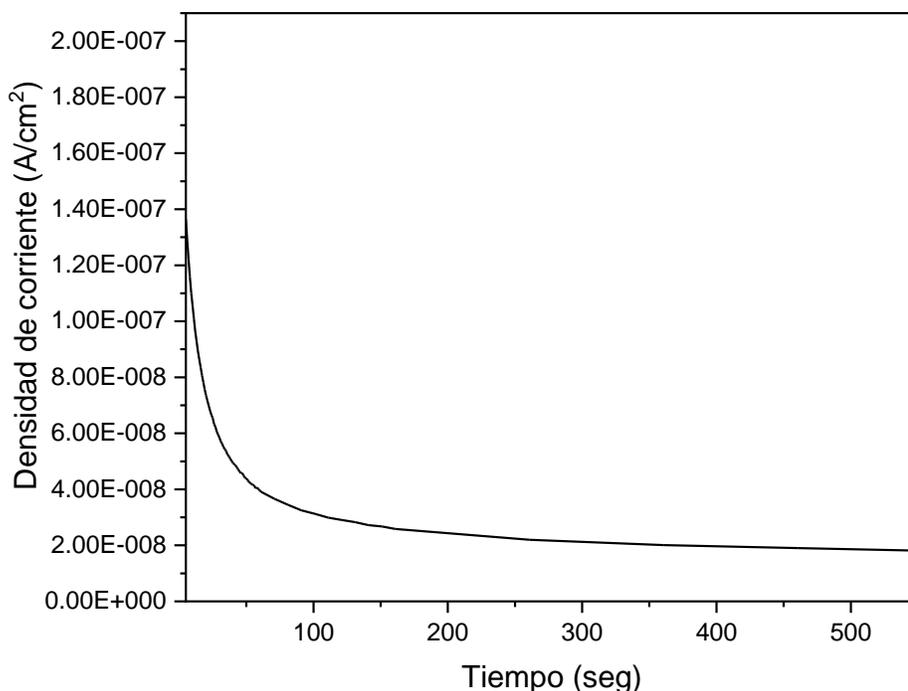


Figura 14: Cronoamperometría a 0.12V de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa con sarcosina 100Mm en solución amortiguadora pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol.

Estudios de estabilidad operacional

Se realizaron una serie de ciclos de medición por medio de voltametría de pulso diferencial, en los cuales se evaluó la densidad de corriente después de cada ciclo de medición y un posterior proceso de lavado con solución amortiguadora para retirar cualquier sustrato y producto en el electrodo. El ciclo inicial, considerado el ciclo 0, mantiene la mayor cantidad de densidad de corriente con $4.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; los ciclos subsecuentes mostraron una reducción en la capacidad de catálisis y, por ende, de la producción de corriente para su medición en el potencióstato -ilustrado en la Figura 15-. La reducción del rendimiento del bioelectrodo funcionalizado se muestra de manera más clara en la Figura 16, la cual representa la disminución porcentual por cada ciclo de medición tomando el ciclo inicial (o ciclo 0)

como el 100%. Se puede apreciar una disminución entre los rangos de 6.78-9.26%, con un promedio de pérdida de eficiencia por ciclo de 7.98%.

La pérdida de eficiencia que representa cada ciclo de medición exhorta a la búsqueda de métodos para el aumento de la recuperabilidad y regenerabilidad del bioelectrodo.

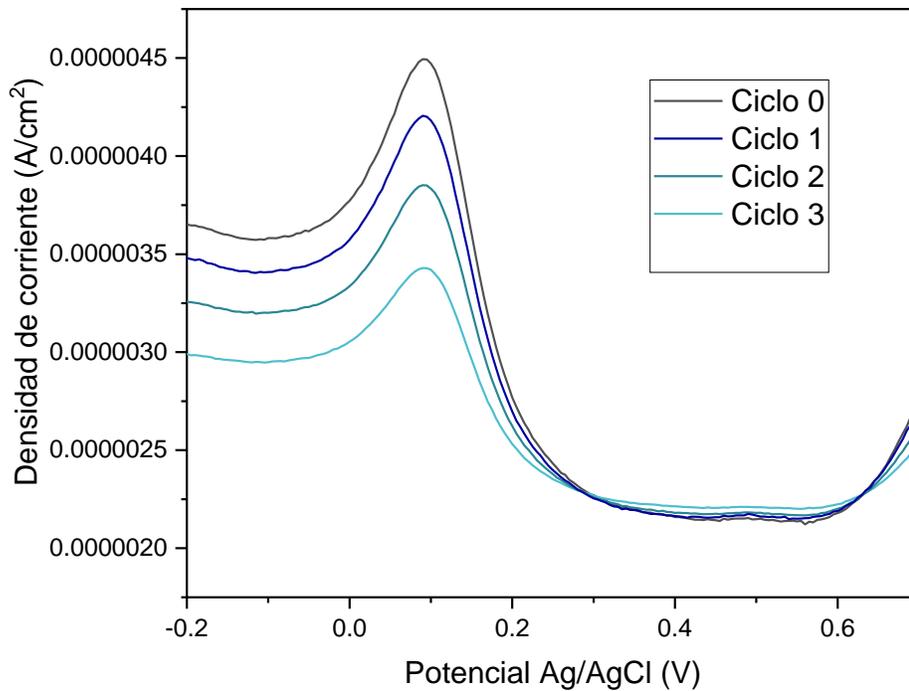


Figura 15: Voltamperograma de pulso diferencial de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa con sarcosina 100Mm en solución amortiguadora pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol, aplicando diferentes ciclos de lavado del electrodo.

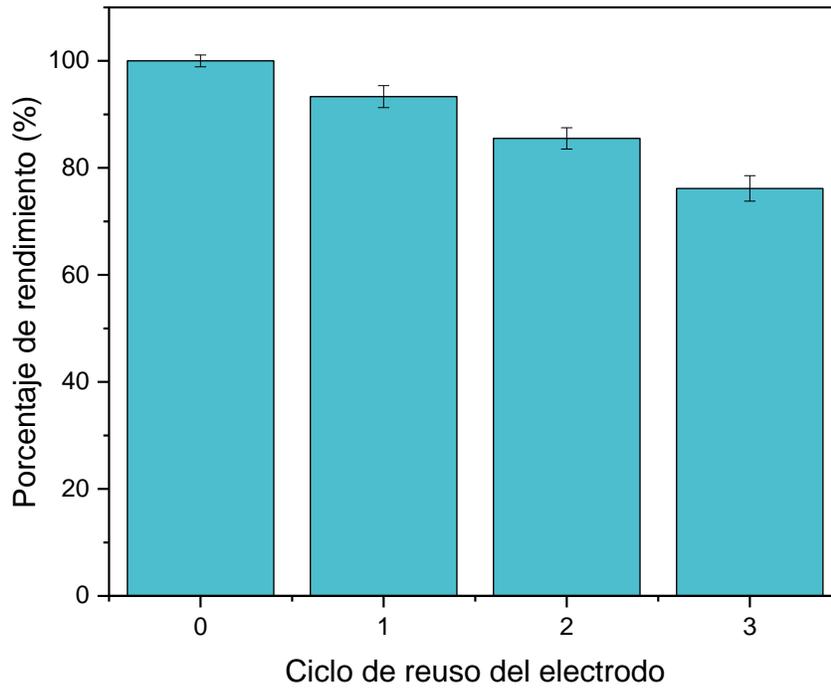


Figura 16: Evaluación del rendimiento de medición de la evaluación del electrodo de carbón vitreo modificado con nanotubos de carbón funcionalizados y sarcosina oxidasa con sarcosina 100Mm en solución amortiguadora pH 7.5 y 2mM de ferroceno metanol, aplicando diferentes ciclos de lavado del electrodo.

Trabajo Futuro

El alcance del proyecto fue el diseño y construcción de un bioelectrodo y su caracterización electroquímica; sin embargo, la meta del proyecto a largo plazo consiste en el desarrollo de un biosensor capaz de medir los niveles de sarcosina en orina.

Una situación a considerar es la variación entre respuestas de actividad enzimática a diferentes niveles de pH entre sarcosina oxidasa libre y sarcosina oxidasa inmovilizada en nanotubos de carbono multipared. La alta diferencia entre resultados puede resultar en una complicación dado el desarrollo del sensor, con algunas alternativas presentes como el control de la dieta del paciente para alterar el pH esperado, así como el pretratamiento de la muestra.

El proyecto actual no contempló la presencia de interferentes posibles en condiciones biológicas, por lo que se pretende que a corto plazo se realicen pruebas de medición en fluido simulado de orina en condiciones regulares, anormales y con presencia de interferentes biológicos para la determinación de posible inhibición de la actividad enzimática, así como los efectos de los componentes en la orina en la cuantificación de señales eléctricas.

Etapas posteriores del proyecto deberán enfocar esfuerzos en la miniaturización y portabilidad del biosensor; así como en pruebas clínicas con pacientes de control y con el padecimiento, las cuales implican un estricto control de la información de los pacientes y la aprobación pertinente por un Comité de Bioética facultado para el dictamen y seguimiento del proyecto.

Finalmente, el desarrollo de un producto conllevaría el paso por diversas etapas de pruebas in vivo y con pacientes, así como un estudio de rentabilidad y capacidades de producción.

Conclusión

La inmovilización de sarcosina oxidasa en nanotubos de carbono multipared proveyó resultados generalmente favorables y con una mejora sustancial de actividad enzimática en diferentes condiciones en comparación con la enzima libre, presentando capacidades prometedoras para el desarrollo de un sistema electroquímico miniaturizable de sensado enzimático para la detección de sarcosina.

La actividad enzimática ante distintos rangos de temperatura mostró una respuesta favorable en el rango de temperatura promedio de la orina al momento de la emisión (35.61-37.61°C), con el complejo de la enzima inmovilizada presentando una mejora significativa de actividad dada la reducción de la temperatura de reacción, aumentando considerablemente la capacidad de sensado en condiciones externas, es decir, con orina ya emitida.

El incremento en la respuesta dados el incremento en la concentración de sustrato, aunado a la linealidad de respuesta en el rango de interés para la medición de sarcosina provee un alto potencial para el uso de bioelectrodos en el biosensor electroquímico planteado.

El potencial de reutilización del bioelectrodo se ve afectado tras varios ciclos de uso y lavado, con un promedio de 7.98% de pérdida de rendimiento en cada ciclo; debido a esto, es necesario buscar alternativas para bien aumentar el índice de reutilización.

Referencias

- Abe, Y., Shoji, M., Nishiya, Y., Aiba, H., Kishimoto, T., & Kitaura, K. (2017). Reaction Mechanism of Sarcosine Oxidase Elucidated Using FMO and QM/MM Methods. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9811-9822.
- Amaya-Fragoso, E., & García-Pérez, C. M. (2021). Improving prostate biopsy decision making in Mexican patients: Still a major public health concern. *In Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*.
- Andriole, G. L., Crawford, E. D., Grubb III, R. L., Buys, S. S., Chia, D., Church, T. R., & Berg, C. D. (2009). Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *New England Journal of Medicine*, 1310-1319.
- Askari, A., Shafaghi, A., Bagherian, M., & Foroohari, A. (2005). Prevalence of hidden prostate carcinoma. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*, 53-60.
- Baelo Álvarez, M., & Martínez Pastor, F. (2013). *Manual de Seguridad y Buenas Prácticas en el Laboratorio*. Universidad de León, León.
- Barrera, E. (7 de Enero de 2018). Cáncer de próstata, el más caro para el Seguro Popular. *El Informador*.
- Becerra Hernández, A. (2017). *DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIOELECTRODO BASADO EN LA MONOAMINO OXIDASA-A, PARA LA DETECCIÓN DE SEROTONINA EN UN FLUIDO CORPORAL SIMULADO*.
- Bell, M. S., Teo, K. B., Lacerda, R. G., Milne, W. I., Hash, D. B., & Meyyappan, M. (2006). Carbon nanotubes by plasma-enhanced chemical vapor deposition. *Pure and applied chemistry*, 1117-1125.
- Beltran-Ontiveros, S. A., F.-G. M., Moreno-Ortiz, J. M., Contreras-Gutierrez, J. A., Madueña-Molina, J., & Arambula-Meraz, E. (2022). Incidence, mortality, disability-adjusted life years, and trends of prostate cancer in Mexico from 2000 to 2019: Results from the Global Burden of Disease Study 2019.
- Bianchi, F., Dugheri, S., Musci, M., Bonacchi, A., Salvadori, E., Arcangeli, G., . . . Mangia, A. (30 de 11 de 2011). Fully automated solid-phase microextraction-fast gas chromatography-mass spectrometry method using a new ionic liquid column for high-throughput analysis of sarcosine and N-ethylglycine in human urine and urinary sediments. *Analytica Chimica Acta*, 707(1-2), 197-203.
- Biavardi, E., Tudisco, C., Maffei, F., Motta, A., Massera, C., Condorelli, G. G., & Dalcanale, E. (2012). Exclusive recognition of sarcosine in water and urine by a cavitand-functionalized silicon surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2263-2268.
- Britto, P. J., Santhanam, K. S., & Ajayan, P. M. (1996). Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 121-125.

- CANIFARMA. (23 de Enero de 2018). Mueren en México más de 19 hombres al día por cáncer de próstata. *CódigoF*. Obtenido de <https://codigof.mx/mueren-en-mexico-mas-de-19-hombres-al-dia-por-cancer-de-prostata/>
- Cao, D., Ye, D., Zhang, H., Zhu, Y., Wang, Y., & Yao, X. (15 de 5 de 2011). A multiplex model of combining gene-based, protein-based, and metabolite-based with positive and negative markers in urine for the early diagnosis of prostate cancer. *Prostate*, *71*(7), 700-710.
- Cavaliere, B., MacChione, B., Monteleone, M., Naccarato, A., Sindona, G., & Tagarelli, A. (7 de 2011). Sarcosine as a marker in prostate cancer progression: A rapid and simple method for its quantification in human urine by solid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *400*(9), 2903-2912.
- Cernei, N., Heger, Z., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Babula, P., . . . Adam, V. (7 de 2013). Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker-a review. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(7), 13893-13908.
- Cernei, N., Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Hrabec, R., & Kizek, R. (2012). Sarcosine in urine of patients with prostate carcinoma. *Praktický lékař*, 444-448.
- Chaniotakis, N. A. (2004). Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 89-95.
- Chaubey, A., & Malhotra, B. (2002). Mediated biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 441-456.
- Chu, L. W., Ritchey, J., Devesa, S. S., Quraishi, S. M., Zhang, H., & Hsing, A. W. (2011). Prostate cancer incidence rates in Africa. *Prostate cancer*.
- Daniyal, M., Siddiqui, Z. A., Akram, M., Asif, H. M., Sultana, S., & Khan, A. (2014). Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9575-9578.
- Datta, S., Christena, L., & Rajaram, Y. (2 de 2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, *3*(1), 1-9.
- Djavan, B., Waldert, M., Zlotta, A., Dobronski, P., Seitz, C., Remzi, M., . . . Marberger, M. (2001). Safety And Morbidity Of First And Repeat Transrectal Ultrasound Guided Prostate Needle Biopsies: Results Of A Prospective European Prostate Cancer Detection Study. *The Journal of Urology*, 856-860.
- D'Orazio, P. (2003). Biosensors in clinical chemistry. *Clinica chimica acta*, 41-69.
- D'souza, S. F. (1999). Immobilized enzymes in bioprocess. *Current Science*, 69-79.
- Efesoy, O., Bozlu, M., Çayan, S., & Akbay, E. (2013). Complications of transrectal ultrasound-guided 12-core prostate biopsy: A single center experience with 2049 patients. *Turk Uroloji Dergisi*, *39*(1), 6-11.

- Eggs, B. (2002). *Chemical sensors and biosensors. Analytical Techniques in the Sciences*. West Sussex: John Wiley & Sons.
- Fernandez-Quilez, A., Germán Borda, M., Carreño, G. L., Castellanos-Perilla, N., Soennesyn, H., Oppedal, K., & Reidar Kjosavik, S. (2022). Prostate cancer screening and socioeconomic disparities in Mexican older adults. *Salud Pública de México*, 121-122.
- Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R. M., Barregard, L., Bhutta, Z. A., & al., e. (2017). Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden. *JAMA Oncology*, 524-548.
- Freedland, S. J., & Isaacs, W. B. (2005). Explaining racial differences in prostate cancer in the United States: sociology or biology? *The Prostate*, 243-252.
- Freedland, S. J., & Moul, J. W. (2007). Prostate specific antigen recurrence after definitive therapy. *The Journal of Urology*, 1985-1991.
- Fu, J., Reinhold, J., & Woodbury, N. W. (2011). Peptide-modified surfaces for enzyme immobilization. *PLoS One*.
- Geneva, I. I., Cuzzo, B., Fazili, T., & Javaid, W. (2019). Normal body temperature: a systematic review. *In Open forum infectious diseases*.
- Giraldo, L. F., & López, B. L. (2007). Síntesis y funcionalización de nanotubos de carbono y silicato. *Scientia et Technica*, 777-781.
- Global Market Insights. (2022). *Biosensors Market Size By Type, By Technology, By Medical Application, By End-use, Regional Outlook, Industry Analysis Report, Growth Potential, Competitive Market Share & Forecast*. Global Market Insights. Obtenido de <https://www.gminsights.com/industry-analysis/biosensors-market>
- Gosser, D. K. (1994). *Cyclic Voltammetry, Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*. VHC.
- Grieshaber, D., Mackenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8, 1400-1458.
- Griffin, J. L., & Shockcor, J. P. (2004). Metabolic profiles of cancer cells. *Nature reviews cancer*, 551-561.
- Guo, K., Ma, X., Sun, G., Zhao, Y., Li, X., Zhao, W., & Kai, L. (2006). Expression and characterization of a thermostable sarcosine oxidase (SOX) from *Bacillus* sp. in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 559-566.
- Haas, G. P., Delongchamps, N., Brawley, O. W., Wang, C. Y., & de la Roza, G. (2008). The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *The Canadian journal of urology*, 3866.

- Hassanipour-Azgomi, S., M.-H. A., Ghoncheh, M., Towhidi, F., Jamehshorani, S., & Salehiniya, H. (2016). Incidence and mortality of prostate cancer and their relationship with the Human Development Index worldwide. *Prostate international*, 118-124.
- Heger, Z. M., & Adam, V. (2016). Sarcosine up-regulates expression of genes involved in cell cycle progression of metastatic models of prostate cancer. *Plos one*, 11.
- Hsing, A. W., Tsao, L., & Devesa, S. S. (2000). International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *International journal of cancer*, 60-67.
- Ianni, M., Porcellini, E., Carbone, I., Potenzoni, M., Pieri, A. M., Pastizzaro, C. D., & Licastro, F. (2013). Genetic factors regulating inflammation and DNA methylation associated with prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 56-61.
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 56-58.
- Issaq, H., & Veenstra, T. (12 de 2011). Is sarcosine a biomarker for prostate cancer? *Journal of Separation Science*, 34(24), 3619-3621.
- Jentzmik, F., Stephan, C., Lein, M., Miller, K., Kamlage, B., Bethan, B., . . . Jung, K. (2 de 2011). Sarcosine in prostate cancer tissue is not a differential metabolite for prostate cancer aggressiveness and biochemical progression. *Journal of Urology*, 185(2), 706-711.
- Jornet-Martínez, N., Henderson, C., Campíns-Falcó, P., Daly, R., & Hall, E. (15 de 5 de 2019). Towards sarcosine determination in urine for prostatic carcinoma detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 287, 380-389.
- Journet, C., Maser, W. K., Bernier, P., Loiseau, A., de La Chapelle, M. L., Lefrant, D. S., & Fischer, J. E. (1997). Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. *Nature*, 756-758.
- Kawachi, M. H., Bahnson, R. R., Barry, M., & Busby, E. (2010). Prostate Cancer Early Detection. *National Comprehensive Cancer Network*.
- Kerr, S. J. (1972). Competing methyltransferase systems. *Journal of Biological Chemistry*, 4248-4252.
- Khan, A., Rajendiran, T., Ateeq, B., Asangani, I., Athanikar, J., Yocum, A., . . . Chinnaiyan, A. (2013). The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression. *Neoplasia (United States)*, 15(5), 491-501.
- Khan, M. S., Dighe, K., Wang, Z., Srivastava, I., Daza, E., Schwartz-Dual, A. S., & Pan, D. (2018). Detection of prostate specific antigen (PSA) in human saliva using an ultra-sensitive nanocomposite of graphene nanoplatelets with diblock-co-polymers and Au electrodes. *Analyst*, 1094-1103.
- Khazaei, Z., Sohrabivafa, M., Momenabadi, V., Moayed, L., & Goodarzi, E. (2019). Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide prostate cancers and their relationship with the human development index. *Advances in Human Biology*, 245.

- Kirsch, J., Siltanen, C., Zhou, Q., Revzin, A., & Simonian, A. (21 de 10 de 2013). Biosensor technology: Recent advances in threat agent detection and medicine. *Chemical Society Reviews*, 42(22), 8733-8768.
- Knaul, F. M., Doubova, S. V., Gonzalez Robledo, M. C., Durstine, A., Pages, G. S., Casanova, F., & Arreola-Ornelas, H. (2020). Self-identity, lived experiences, and challenges of breast, cervical, and prostate cancer survivorship in Mexico: a qualitative study. *BMC cancer*, 1-11.
- Kocarnik, J., Compton, K., & Dean, F. (2022). Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019. *JAMA oncology*, 420-444.
- Kumar, C. S. (2007). *Nanomaterials for biosensors*. John Wiley & Sons.
- Lajous, M., Cooperberg, M. R., Rider, J., Manzanilla-García, H. A., Gabilondo-Navarro, F. B., Rodríguez-Covarrubias, F. T., & Moha, A. (2020). Prostate cancer screening in low-and middle-income countries: the Mexican case. *Salud Pública de México*, 542-544.
- Lan, J., Xu, W., Wan, Q., Zhang, X., Lin, J., Chen, J., & Chen, J. (12 de 5 de 2014). Colorimetric determination of sarcosine in urine samples of prostatic carcinoma by mimic enzyme palladium nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 825, 63-68.
- Le Boucher, J., Charret, C., Coudray-Lucas, C., Giboudeau, J., & Cynober, L. (1997). Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A. *Clinical chemistry*, 1421-1428.
- Liu, T., Fu, B., Chen, J., & Li, K. (2019). An electrochemical sarcosine sensor based on biomimetic recognition. *Microchimica Acta*.
- Lucarelli, G., Fanelli, M., Larocca, A., Germinario, C., Rutigliano, M., Vavallo, A., . . . Ditunno, P. (11 de 2012). Serum sarcosine increases the accuracy of prostate cancer detection in patients with total serum PSA less than 4.0 ng/ml. *Prostate*, 72(15), 1611-1621.
- Lumb, R., Shephard, L., Bastian, I., & Fitz-Gerald, M. (2019). *TUBERCULOSIS WORK SAFE - Laboratory Safety*. Geneva, Switzerland: GLI Working Group Secretariat.
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001). Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica chimica acta*, 1-26.
- Lyons, M. E. (2008). Carbon nanotube based modified electrode biosensors. Part 1. Electrochemical studies of the flavin group redox kinetics at SWCNT/glucose oxidase composite modified electrodes.
- Matsuda, Y., Hoshika, H., Inouye, Y., Ikuta, S., Matsuura, K., & Nakamura, S. (1987). Sarcosine Oxidase Datasheet. *Purification and characterization of sarcosine oxidase of Bacillus origin*. Brenda Enzymes. Recuperado el 2022, de <https://www.brenda-enzymes.org/literature.php?e=1.5.3.1&r=392378>

- Miyake, M., Giacoia, E., Palacios, D., & Rosser, C. (8 de 2012). Research Highlights: Highlights from the latest articles in biomarkers in medicine. *Biomarkers in Medicine*, 6(4), 511-512.
- Morote, J., Rigau, M., Garcia, M., Mir, C., Ballesteros, C., Planas, J., . . . Doll, A. (12 de 2010). Behavior of the PCA3 gene in the urine of men with high grade prostatic intraepithelial neoplasia. *World Journal of Urology*, 28(6), 677-680.
- Mostad, A., & Natarajan, S. (1989). Crystal and Molecular Structure of Sarcosine. *Acta chemica Scandinavica*, 1-3.
- Mukherjee, S., Cruz-Rodríguez, O., Bolton, E., & Iñiguez-Lluhi, J. (7 de 9 de 2012). The in vivo role of androgen receptor SUMOylation as revealed by androgen insensitivity syndrome and prostate cancer mutations targeting the proline/glycine residues of synergy control motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 31195-31206.
- Narwal, V., Kumar, P., Joon, P., & Pundir, C. (1 de 6 de 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, 44-51.
- O'Fagain, C. (2003). Enzyme stabilization - recent experimental progress. *Enzyme and Microbial Technology*, 137-149.
- Otto, S. J., Moss, S. M., Mänttänen, L., Roobol, M., Zappa, M., Nelen, V., & de Koning, H. J. (2010). PSA levels and cancer detection rate by centre in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *European Journal of Cancer*, 3053-3060.
- Patel, S., Issa, M., & El-Galley, R. (3 de 2013). Evaluation of novel formula of PSA, age, prostate volume, and race in predicting positive prostate biopsy findings. *Urology*, 81(3), 602-606.
- Pei, R. J., Cheng, Z. L., Wang, E. K., & Yang, X. R. (2001). Amplification of antigen-antibody interactions based on biotin labeled protein-streptavidin network complex using impedance spectroscopy. *Biosensors & Bioelectronics*, 355-361.
- Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M., & Mucci, L. A. (2018). The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*.
- Putzbach, W., & Ronkainen, N. (2013). Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors (Switzerland)*, 13(4), 4811-4840. MDPI AG.
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 63-89.
- Real Cárabes, J. J. (27 de Enero de 2019). Fallecen 7 mil hombres anualmente por cáncer de próstata en México. Excelsior. Obtenido de <https://www.excelsior.com.mx/nacional/fallecen-7-mil-hombres-anualmente-por-cancer-de-prostata-en-mexico/1292790>

- Rebello, T. S., Pereira, C. M., Sales, M. G., 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*, 26-32.
- Rinzler, A. G., Liu, J., Dai, H., Nikolaev, P., Huffman, C. B., Rodriguez-Macias, F. J., & Smalley, R. E. (1998). Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes: Process, product, and characterization. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 67.
- Rodrigo, M. A., Strmiska, V., Horackova, E., Buchtelova, H., Michalek, P., Stiborova, M., & Heger, Z. (2018). Sarcosine influences apoptosis and growth of prostate cells via cell-type specific regulation of distinct sets of genes. *The Prostate*, 104-112.
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 1747-1763.
- Sassolas, A., Blum, L., & Leca-Bouvier, B. (5 de 2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489-511.
- Scardino, P. T., Weaver, R., & M'Liss, A. H. (1992). Early detection of prostate cancer. *Human pathology*, 211-222.
- Schröder, F. H., Hugosson, J., Roobol, M. J., Tammela, T. L., Ciatto, S., Nelen, V., & Auvinen, A. (2009). Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *New England Journal of Medicine*, 1320-1328.
- Schröder, F. H., Van Der Crujisen-Koeter, I., De Koning, H. J., Vis, A. N., Hoedemaeker, R. F., & Kranse, R. (2000). Prostate cancer detection at low prostate specific antigen. *The Journal of Urology*, 806-812.
- Secretaría de Salud. (2 de 3 de 2019). *Cáncer de próstata primera causa de muerte en hombres de edad avanzada*. Obtenido de <https://www.gob.mx/salud/prensa/073-cancer-de-prostata-primera-causa-de-muerte-en-hombres-de-edadavanzada>
- Servicio de Prevención de Riesgos Laborales. (2007). *Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla.
- Shariat, S. F., Karam, J. A., Margulis, V., & Karakiewicz, P. I. (2008). New blood-based biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer. *BJU international*, 675-683.
- Singh, B. D. (2007). *Biotechnology expanding horizons*. Kalyani.
- Song, Y. H., Shiota, M., Kuroiwa, K., Naito, S., & Oda, Y. (2011). The important role of glycine N-methyltransferase in the carcinogenesis and progression of prostate cancer. *Modern Pathology*, 1272-1280.
- Spahn, C., & Minteer, S. D. (2008). Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent patents on engineering*, 195-200.
- Sreekumar, A., Poisson, L., Rajendiran, T., Khan, A., Cao, Q., Yu, J., . . . Chinnaiyan, A. (12 de 2 de 2009). Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*, 457(7231), 910-914.

- Strasinger, S. K., & Di Lorenzo, M. S. (2014). *Urinary analysis and body fluids*. FA Davis.
- Tang, C. K., Vaze, A., Shen, M., & Rusling, J. F. (2016). High-Throughput Electrochemical Microfluidic Immunoarray for Multiplexed Detection of Cancer Biomarker Proteins. *ACS Sensors*, 1036-1043.
- Tavares, A., Silva, C., Dražić, G., Silva, A., Loureiro, J., & Faria, J. (5 de 9 de 2015). Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454, 52-60.
- Thess, A., Lee, R., Nikolaev, P., Dai, H., Petit, P., Robert, J., & Smalley, R. E. (1996). Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. *Science*, 483-487.
- Tristán-Martínez, P. D., Doubova, S. V., & Saucedo-Valenzuela, A. L. (2022). Calidad de atención en pacientes con cáncer de próstata atendidos en México. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 275-282.
- Varadan, V., Kalarickaparambil, J., & Gopalakrishnan, S. (2006). *Smart Material Systems and MEMS: Design and Development Methodologies*. West Sussex, UK: John Wiley and Sons.
- Wang, Y. C., Chen, Y. M., Lin, Y. J., Liu, S. P., & Chiang, E. P. (2011). GNMT expression increases hepatic folate contents and folate-dependent methionine synthase-mediated homocysteine remethylation. *Molecular medicine*, 486-494.
- Yen, C. H., Lin, Y. T., Chen, H. L., Chen, S. Y., & Chen, Y. M. (2013). The multi-functional roles of GNMT in toxicology and cancer. *Toxicology and applied pharmacology*, 67-75.
- Yeo, E. J., & Wagner, C. (1994). Tissue distribution of glycine N-methyltransferase, a major folate-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 210-214.
- Yousefi, M., Qujeq, D., Shafi, H., & Tilaki, K. H. (2020). Serum and urine levels of sarcosine in benign prostatic hyperplasia and newly diagnosed prostate cancer patients. *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences*.
- Zakharyuta, A., Şen, C., & Senem Avaz, M. (2016). *Laboratory Safety Handbook* (1st ed.). Istanbul.