

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

**DESARROLLO DE BIOSENSORES PARA
LA DETECCIÓN DE NIVELES DE
GALACTOSA EN EL ORGANISMO
BASADOS EN LAS PROPIEDADES
REDOX DE LA GALACTOSA OXIDASA**

Autor/es: **Lorea Isidro Álvarez**

Villaviciosa de Odón, *junio, 2022*

ANEXO IX

Título del Trabajo: Desarrollo de biosensores para la detección de niveles de galactosa en el organismo basados en las propiedades redox de la galactosa oxidasa.

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de investigación de “Bioelectrocatalisis” en el Instituto de catálisis y petroleoquímica del CSIC.



Tutor académico: Elena Pérez Izquierdo.

Tutores profesionales: Marcos Pita Martínez y Antonio López de Lacey.

Información del centro donde se ha realizado el trabajo experimental → ICP – CSIC (Instituto de catálisis y petroquímica)

La parte experimental de este trabajo se ha llevado a cabo en el Instituto de Catálisis y Petroquímica (ICP), centro que pertenece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); organismo dependiente del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MINECO).

Dentro de las ocho Áreas Científico – Técnicas en las que se divide la investigación del CSIC, el ICP pertenece al Área de Química y Tecnologías Químicas. Su propósito principal es desarrollar soluciones tecnológicas relacionadas con la catálisis que permitan mejorar la calidad de vida de las personas y aumentar la competitividad de una industria química verde.

Se busca trabajar en el desarrollo de catalizadores avanzados y en química innovadora basándose principalmente en tres líneas:

- Energía
- Protección del medio ambiente
- Síntesis selectiva de compuestos químicos

El grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo este trabajo es el perteneciente a “BioElectrocatalisis”. Fue fundado a mediados de los años 80 por el Profesor Víctor Manuel Fernández López y actualmente cuenta con Antonio López de Lacey como investigador científico (jefe de grupo) y con Marcos Pita Fernández como científico titular.

Desde su fundación se ha centrado en la caracterización de metaloenzimas redox y su integración con electrodos con diferentes aplicaciones.

Dentro de los proyectos que tiene en desarrollo el grupo de BioElectrocatalisis, este está relacionado con “Biosensores implantables a largo plazo independientes de transferencia en masa”.

Resumen

La biotecnología es una ciencia multidisciplinaria que hace uso de la biología (sistemas biológicos, organismos vivos o derivados de estos) de forma industrial o tecnológica para resolver problemas diarios del ser humano. Dentro de esta existen diferentes tipos en función de la base de estudio, siendo la roja aquella que se centra en preservar la vida humana curando, tratando o previniendo enfermedades.

La galactosemia clásica es una enfermedad hereditaria con un patrón autosómico recesivo descrita por primera vez en 1908 por Von Reus. Se caracteriza por errores en la actividad de la enzima galactosa – 1 – fosfato uridiltransferasa (GALT). Esta enfermedad tiene un gran impacto sobretodo en neonatos, llegando a ser mortal. Razón por la que es imprescindible detectar los niveles de galactosa en el organismo.

Este trabajo se desarrolla con el objetivo de modificar electrodos serigrafados de oro desechables con la enzima galactosa oxidasa, para que actúen como biosensores y detecten los niveles de galactosa en el organismo gracias a reacciones de tipo reducción – oxidación (redox).

Abstract

Biotechnology is a multidisciplinary science that makes use of biology (biological systems, living organisms or derivatives thereof) in an industrial or technological way to solve human problems. There are different types of biotechnology depending on the study base, the red one is focused on preserving human life by curing, treating or preventing diseases.

Classic galactosemia is a hereditary disease with an autosomal recessive pattern. It was described in 1908 by Von Reus. It is characterized by errors in the activity of the enzyme galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT). This disease has a great impact especially in neonates, becoming fatal. For this reason, it is essential to detect the levels of galactose in the organism.

This work is developed with the aim of modifying disposable gold screen-printed electrodes with the enzyme galactose oxidase, to act as biosensors and detect the levels of galactose in the body through reduction-oxidation (redox) reactions.

Tabla de contenido

1	Introducción	1
1.1	Galactosa	1
1.2	Metabolismo de la galactosa	1
1.3	Galactosemia	2
1.3.1	Galactosemia II (GALAC2) OMIM: #230200	3
1.3.2	Galactosemia III (GALAC3) OMIM: #230350	3
1.3.3	Galactosemia clásica o galactosemia I (GALT) OMIM: 230400	4
1.4	Formas de diagnóstico de la galactosemia	5
1.4.1	Cribado neonatal	5
1.4.2	Determinación enzimática	6
1.5	Biosensores	7
1.6	Galactosa oxidasa (GaOx)	8
2	Objetivos	9
2.1	Objetivo principal	9
2.2	Objetivos específicos	9
3	Materiales y métodos	10
3.1	Búsqueda bibliográfica	10
3.1.1	Bases de datos consultadas	10
3.2	Parte experimental	11
3.2.1	Materiales de laboratorio	11
3.2.2	Celda electroquímica	12
3.2.3	Potenciostato	13
3.3	Protocolos	14
3.3.1	Protocolo experimental con electrodos desnudos (sin modificar su superficie)	16
3.3.2	Protocolo experimental con electrodos con la superficie modificada con GaOx	16
3.3.3	Protocolo experimental con electrodos con la superficie modificada con GaOx + monocapa de ditiotreitól (DTT)	17
3.3.4	Protocolo experimental con electrodos con la superficie modificada con GaOx + monocapa de 4 – aminotiofenol (4 – ATP)	17
4	Resultados	18
4.1	Resultados bibliográficos	18
4.2	Resultados experimentales	19
4.2.1	Electrodos desnudos	19
4.2.2	Electrodos con enzima GaOx adsorbida	21
4.2.3	Electrodos con la superficie modificada con enzima GaOx + monocapa de ditiotreitól (DTT)	22
4.2.4	Electrodos con la superficie modificada con enzima GaOx + monocapa de 4 – Aminotiofenol (4 – ATP)	25
5	Discusión	27
5.1	Discusión bibliográfica	27
5.2	Discusión experimental	28
6	Conclusiones	31
7	Bibliografía	32

1 Introducción

1.1 Galactosa

Los hidratos de carbono ($C_x (H_2O)_n$) componen uno de los tres macronutrientes de la dieta humana (junto con las proteínas y las grasas). Representan del 40 al 80% del total de las calorías diarias, siendo, por tanto, una importante fuente energética (1,2). La galactosa es un monosacárido reductor epímero de la glucosa. Se trata de una aldohexosa que cuenta con dos enantiómeros, D – galactosa, y L – galactosa. Esta última no se encuentra de forma natural en los seres vivos, ya que sus células no son capaces de metabolizarla (3).

En la leche materna predominan los hidratos de carbono con respecto al resto de constituyentes, teniendo un 7,2 % de lactosa, disacárido formado por glucosa y galactosa (*figura 1*), azúcares simples que le aportan al neonato del 50% de la energía total que necesita (4). Convirtiéndose así en su principal fuente de energía por su importante papel estructural y es esencial para un correcto desarrollo temprano (5).

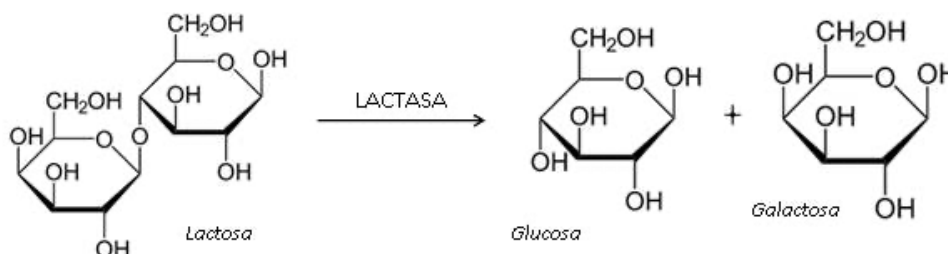


Figura 1 Esquema de la degradación de la lactosa (disacárido) en glucosa y galactosa (monosacáridos). This file is licensed under the Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license.

1.2 Metabolismo de la galactosa

La galactosa lleva a cabo su degradación a través de la ruta metabólica de Leloir desarrollada principalmente en el hígado (*figura 2*). Para ello requiere la acción previa de una enzima denominada galactosa mutarotasa (GALM), que la epimeriza y la convierte de conformación β – D – Galactopiranososa a α – D – galactopiranososa. De esta manera puede entrar en la ruta metabólica en la que se obtiene glucosa – 1 – fosfato (Glc – 1 – P). Dicho producto puede metabolizarse en glucosa – 6 – P entrando de esta forma en el proceso de glucólisis y utilizándose como sustrato energético. La vía de Leloir se basa en la acción de tres enzimas que actúan de manera consecutiva (6,7) :

- Galactoquinasa – 1 (GALK1)
- Galactosa – 1 – fosfato uridiltransferasa (GALT)
- UDP – galactosa – 4' – epimerasa (GALE)

Siguiendo otras rutas alternativas a la de Leloir, la galactosa puede degradarse siguiendo una ruta reductora convirtiéndose, en este caso, en galactitol por acción de una aldosa reductasa, o siguiendo una ruta oxidativa, convirtiéndose en galactonato gracias a la acción de una galactosa deshidrogenasa (8).

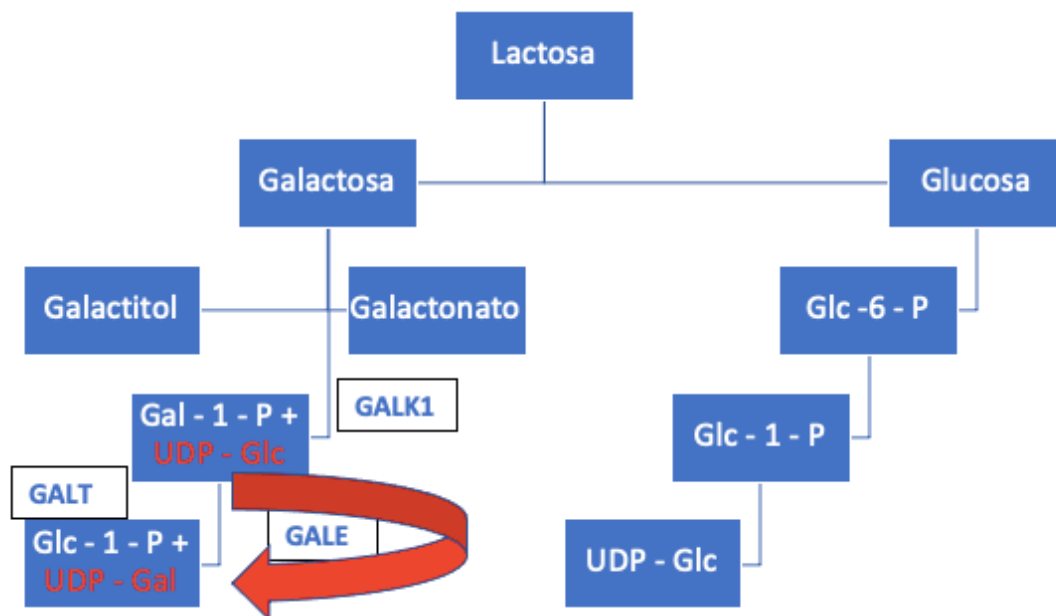


Figura 2 Representación de un esquema de la ruta de degradación desde la lactosa centrándose en las enzimas involucradas en la ruta de Leloir. (Elaboración propia).

La deficiencia de cualquiera de las tres enzimas principales en la ruta de Leloir (GALK1, GALT o GALE) puede ocasionar diferentes tipos de una enfermedad conocida como galactosemia, teniendo un mayor impacto sobre la salud la deficiencia de GALT, que produce un síndrome de toxicidad multiorgánica que suele ser letal con la ingestión continua de lactosa durante el primer mes de vida (9).

1.3 Galactosemia

La galactosemia fue descrita por primera vez en el año 1908 cuando Von Ruess detectó azúcar en la orina de un lactante que presentaba hepatomegalia (10); fue en 1917 cuando

F. Groppert la describió de forma más detallada cuando se encontró un cuadro clínico en un niño con patología más severa en la que se incluía retardo mental, ictericia, fallo en el crecimiento y excreción anormal de proteínas, además de los síntomas que detectó Von Ruess en 1908. En 1970 Luis Federico Leloir estableció la causa de la galactosemia gracias a sus estudios en la ruta metabólica de la galactosa, gracias a lo que consiguió el premio Nobel de Química (6).

Se trata de una enfermedad metabólica hereditaria que provoca una deficiencia en el metabolismo de la galactosa. Hay diferentes tipos de galactosemia en función de la enzima en la que se produce la deficiencia (error de plegamiento o de funcionalidad). El fenotipo varía desde una discapacidad casi asintomática hasta una que pone en peligro la vida del paciente (7).

1.3.1 Galactosemia II (GALAC2) OMIM: #230200

Enfermedad causada por una mutación en el gen que GALK1 situado en el cromosoma 17q24 y que afecta a la galactosa quinasa 1. Se trata de un trastorno hereditario con patrón autosómico recesivo que provoca la aparición temprana de cataratas en niños que no mantienen una dieta sin lactosa (7,11) debido a la acumulación de galactosa libre dentro del cristalino que puede metabolizar a galactitol produciendo desnaturalización y precipitación de la proteína lenticular (12).

1.3.2 Galactosemia III (GALAC3) OMIM: #230350

Enfermedad causada por una mutación en el gen de la galactosa epimerasa (GALE) en el cromosoma 1p36 (7). Inicialmente se consideró una “condición benigna” en la que los valores de GALE solo estaban modificados en glóbulos rojos y blancos. En este caso, tanto fibroblastos, hígado como linfoblastos estimulados con fitohemaglutinina demostraron niveles normales de GALE, por lo que se denominó deficiencia de epimerasa periférica. Más tarde se descubrió otro tipo de deficiencia en GALE tanto en glóbulos rojos como en fibroblastos que, a pesar de tener los niveles de GALT correctos la sintomatología era similar a la que se encontraba en la galactosemia clásica, a la que se denominó deficiencia de epimerasa generalizada (7,13).

1.3.3 Galactosemia clásica o galactosemia I (GALT) OMIM: 230400

Se trata de un trastorno hereditario de patrón autosómico recesivo (14). Es el tipo de galactosemia más comúnmente diagnosticada y posee una importante morbilidad y mortalidad neonatal que dependen de la ingestión de galactosa (15). Hay una frecuencia de 1 caso de cada 70.000 en Reino Unido, 1 caso cada 60.000 en EE. UU., y 1 caso de cada 30.000 en Irlanda. Es menos frecuente en población negra y asiática y se da en ambos sexos por igual (16). Se desarrolla por una mutación en el gen GALT situado en el locus 9p13 (gen que codifica para la galactosa 1 – fosfato uridiltransferasa). Como consecuencia de ello, la galactosa – 1 – fosfato no puede ser convertida en glucosa – 1 – fosfato. En la población caucásica la mutación p.Q188R (sustitución de un residuo de Arginina por uno de Glutamina en la posición 188) es la más común y en la población negra es la variante p.S135L (7,14).

A pesar de que la enfermedad puede aparecer *in utero* debido a que las vías metabólicas de la galactosa se desarrollan entorno a la décima semana de gestación (6), la sintomatología aparece en los primeros días del nacido, tan pronto se introduce la lactancia materna (10). Los primeros síntomas suelen presentarse en forma de rechazo al alimento y manifestaciones tóxicas generales (12). El síntoma más común es la ictericia, apareciendo en un 74% de los pacientes, pero hay otros síntomas comunes a dicha patología como pobreza en la succión en un 23%, falta de crecimiento (un 29%), vómitos (un 47%), diarrea (un 12%), hepatomegalia (un 43%), sangrado o cataratas (17).

En referencia a las posibles complicaciones a medio – largo plazo aparecen efectos a nivel del sistema nervioso central como, por ejemplo, trastornos cognitivos, teniendo un 35 – 82% de los niños un coeficiente intelectual inferior a 80, y trastornos del lenguaje y del habla en un 25 – 91%, siendo los más comunes el retraso en la adquisición del lenguaje, apraxia y dispraxia verbal (6,12). Este tipo de problemas hace que los pacientes tengan dificultad a la hora de integrarse en la sociedad, problemas de memoria y de comunicación social y menos de la mitad consiguen la independencia de sus padres. Además, también suelen aparecer síntomas psiquiátricos comunes como depresión, ansiedad y trastornos obsesivo – compulsivos (17).

Adicionalmente, son frecuentes los trastornos motores, en un 66% de los casos, siendo los más comunes temblores, distonía y ataxia y la disfunción ovárica en mujeres (90% de los casos) relacionada con el hipogonadismo hipergonadotrópico (*tabla 1*) (6,12,17).

La principal causa de las muertes relacionadas con la galactosemia se atribuye a sepsis por *Escherichia coli*, debido a que se inhibe la actividad bactericida de los leucocitos por un consumo de galactosa (17).

Síntomas a corto plazo	Ictericia	74 %
	Hepatomegalia	43 %
	Falta de crecimiento	29 %
	Vómitos	47 %
	Pobre succión	23 %
	Diarrea	12 %
Sintomatología a medio – largo plazo	Trastornos cognitivos	35 – 82 %
	Trastornos lenguaje /habla	25 – 91 %
	Trastornos motores	66 %
	Disfunción ovárica	90 %

Tabla 1 Tabla resumen de los principales síntomas a corto y a medio - largo plazo de la galactosemia clásica (Elaboración propia).

1.4 Formas de diagnóstico de la galactosemia

No existe un protocolo estándar para el diagnóstico de la galactosemia y suele basarse en la determinación de metabolitos, actividad enzimática o detección de mutaciones. El diagnóstico se suele llevar a cabo entre el día 1 y los 5 meses desde el nacimiento (12), a pesar de que es posible realizar un estudio prenatal de ADN del corion del embrión en la semana 11, donde la actividad de GALT se puede medir mediante la presencia de galactitol en el líquido amniótico (17).

Si en el análisis genético hay variaciones detectadas y estas aparecen como causantes de la enfermedad en bases de datos de variaciones genéticas y, además, los padres biológicos son portadores de una variación cada uno, no se requerirá otro análisis adicional (15).

1.4.1 Cribado neonatal

Se basa en la detección de sustancias reductoras o de galactitol en orina (prueba de Benedict) (6) o en sangre (test de Guthrie) (12). Son las pruebas más importantes para

una detección precoz debido a que se lleva a cabo durante los primeros días de vida. Sin embargo, dicho cribado tiene una utilidad limitada ya que, en caso de dar positivo, se requieren pruebas confirmatorias de la enfermedad. No es un método sensible ni específico ya que puede ser episódica, pudiendo presentar falsos negativos o falsos positivos en función del tiempo que hace que el neonato no reciba leche o de si el vómito es persistente (6,7).

1.4.2 Determinación enzimática

El método más común para confirmar la galactosemia clásica es la prueba de Beulter (figura 3) basada en una valoración directa de la GALT en eritrocitos (6,7).

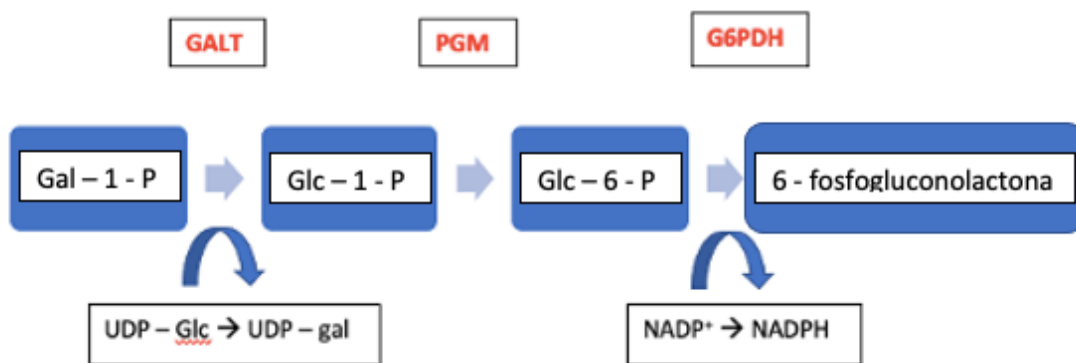


Figura 3 Esquema resumen de la reacción llevada a cabo en el método de detección de la galactosemia. (Elaboración propia basada en (7))

Los pacientes galactosémicos presentan niveles elevados de Galactosa – 1 – fosfato en los eritrocitos debido a que la actividad de GALT está disminuida y no se transforma en gluconato – 6 – fosfato. Además de requerir la actividad de GALT, se requiere una fosfoglucomutasa (PGM) y una glucosa – 6 – fosfato – deshidrogenasa (G6PDH). La G6PDH utiliza un cofactor ($NADP^+$) como agente oxidante dando lugar a un cofactor reducido ($NADPH$) que puede detectarse por fluorescencia (7).

Los pacientes de galactosemia deben ser tratados cuando tienen una actividad de la enzima GALT en los eritrocitos inferior al 10% (18).

Teniendo en cuenta las formas de diagnóstico actuales de la galactosemia y viendo su necesidad de diagnóstico temprano para evitar consecuencias letales en neonatos, el desarrollo de biosensores es primordial.

1.5 Biosensores

La definición de biosensor según la RAE es: “Dispositivo que utiliza materiales de origen biológico para detectar y cuantificar una sustancia” (19).

Se trata de un dispositivo que lleva a cabo la medición de reacciones biológicas o químicas generando señales proporcionales a la concentración de analito en la reacción y que consta de unos componentes como son: analito, bioreceptor, transductor, componente electrónico y mecanismo de visualización (*figura 4*) (20).

Presentan ciertas ventajas frente a otros tipos de sensores (20,21):

- Alta sensibilidad
- Alta selectividad
- Alta reproducibilidad
- Fácil manejo
- Bajo coste
- Corto tiempo de análisis
- Fácilmente automatizables e incorporables en sistemas microscópicos
- Obtención de resultados en tiempo real

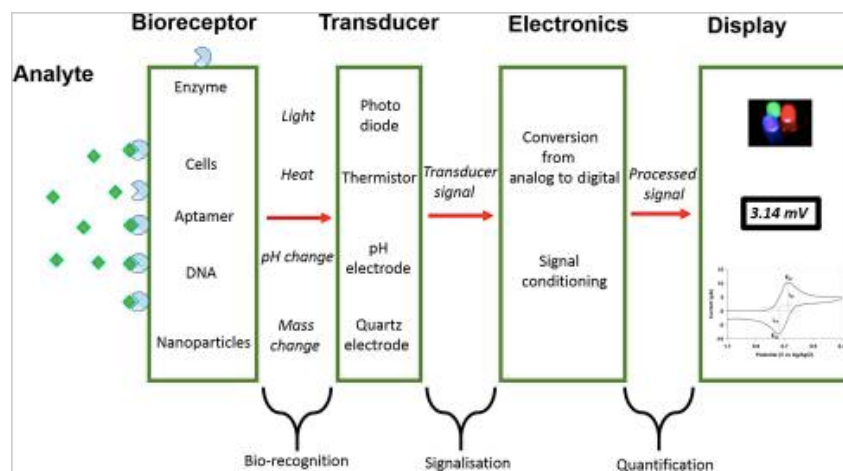


Figura 4 Esquema de los diferentes componentes que debe tener un biosensor (20).

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación que pretende desarrollar un biosensor sensible, selectivo y estable basado en la transferencia directa de electrones. Teniendo en cuenta el esquema anterior (*figura 4*), el presente trabajo contempla como

componente transductor un electrodo serigrafiado de oro desechable, el cual va a detectar las interacciones redox llevadas a cabo entre el elemento biológico (enzima galactosa oxidasa adsorbida en la superficie del oro) y los analitos, que fueron disoluciones de glucosa 0,55M y de galactosa 0,25M. El electrodo está unido a un potenciostato, y ambos van a ser los responsables de interpretar dichas interacciones transformándolas en una señal medible.

Se utilizaron tanto ditioneitol (DTT) como 4-aminotiofenol (4-ATP) como mediadores absorbidos que actúan como monocapas.

Los electrodos serigrafiados de oro utilizados son bandas cuyas dimensiones son 3,4 x 1,0 x 0,05 cm, que poseen tres tipos de electrodos diferentes que deben cumplir las siguientes características:

- Electrodo de trabajo (WE): que debe tener propiedades como conductividad eléctrica y rápida transferencia de electrones, por eso en este caso se utiliza el oro (20,22).
- Electrodo auxiliar o contraelectrodo: los cuales deben ser inertes en cuanto a las condiciones electroquímicas, y van a sufrir la misma carga que la generada en los WE debido a que son los que se encargan de cerrar el circuito, de manera que la señal percibida en el potenciostato a diferentes potenciales es la diferencia de la intensidad existente entre el WE y el CE (20,22).
- Electrodo de referencia (RE): este tipo de electrodos debe tener un potencial constante durante todo el proceso experimental independientemente de la corriente que le pase a través. Es importante que no interfiera en la reacción a estudiar (20,22).

1.6 Galactosa oxidasa (GaOx)

La galactosa oxidasa es una enzima redox cuya actividad máxima se alcanza a un pH = 7,5 (23).

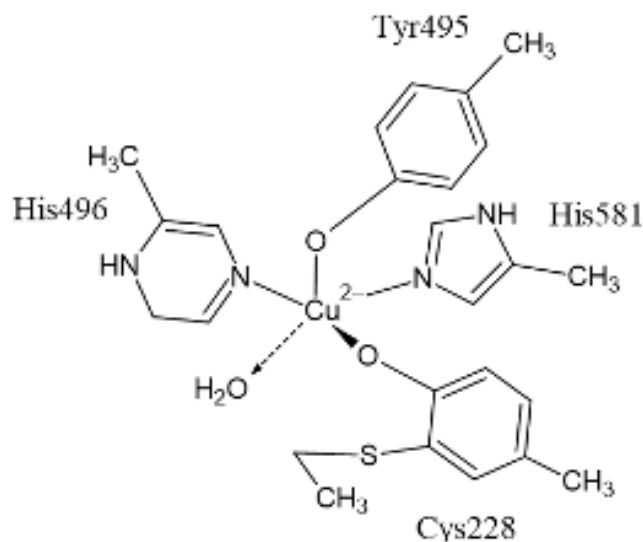
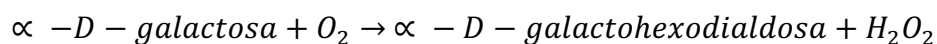


Figura 5 Centro activo de la galactosa oxidasa con sus respectivos ligandos. (Dibujo de elaboración propia de la molécula con ChemSketch)

La GaOx lleva a cabo la siguiente reacción (23):



Ecuación 1 Ecuación que muestra la reacción llevada a cabo por la galactosa oxidasa.

Por tanto, el uso de la GaOx como agente redox en la superficie del electrodo serigrafiado y la monitorización electroquímica del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) genera una respuesta analítica.

2 Objetivos

2.1 Objetivo principal

Analizar la situación actual de la galactosemia y realizar una caracterización preliminar de un biosensor para su posible uso en el diagnóstico de dicha enfermedad.

2.2 Objetivos específicos

- Revisión del estado actual del diagnóstico de la enfermedad de la galactosemia clásica.

- Acondicionamiento y caracterización preliminar de un biosensor con galactosa oxidasa inmovilizada en la superficie.

3 Materiales y métodos

3.1 Búsqueda bibliográfica

3.1.1 Bases de datos consultadas

Para llevar a cabo la búsqueda bibliográfica de este trabajo se han utilizado diferentes bases de datos disponibles.



Figura 6 Esquema de las principales bases de datos utilizadas para la búsqueda bibliográfica. Elaboración propia.

3.1.1.1 OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man ®)

Base de datos gratuita que comprende información sobre genes y fenotipos genéticos humanos que se actualiza diariamente. Las referencias en OMIM tienen información sobre todos los trastornos mendelianos conocidos y sobre más de 16.000 genes.

3.1.1.2 PubMed

Recurso gratuito que apoya la búsqueda de literatura biomédica con el objetivo de mejorar la salud. Contiene más de 33 millones de citas. Fue desarrollado y es actualmente mantenido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

3.1.1.3 Elsevier

Líder mundial en información y análisis que ayuda a los investigadores de la salud a hacer avanzar la ciencia y a mejorar los resultados necesarios. Cuenta con más de 600.000 artículos revisados. El 94% de los principales sistemas de salud (clasificados por número de camas) utilizan al menos una de las soluciones clínicas de Elsevier.

La búsqueda de los artículos se ha llevado a cabo con las siguientes palabras clave: *Galactosa; Leloir; Metabolismo; Galactosemia; Biosensores; Electroquímica.*

La selección se ha realizado por relevancia con respecto a los objetivos del trabajo citados y por año de publicación (últimos diez años a excepción de apartados con falta de bibliografía que se han utilizado años anteriores). Los idiomas considerados a la hora de escoger los artículos definitivos han sido el inglés y el castellano.

3.2 Parte experimental

3.2.1 Materiales de laboratorio

3.2.1.1 *Electrodos serigrafiados de oro desechables.*

Los electrodos que se utilizaron en la parte experimental son electrodos serigrafiados de oro desechables comprados en la casa DropSens[®] cuya sede se encuentra en Oviedo, Asturias.

Estos electrodos están principalmente diseñados para trabajar con volúmenes muy pequeños de muestra, útiles para este experimento ya que se utilizaron volúmenes de 20 μ l de enzima para modificarlos.

Este tipo de electrodos llevan incorporados tres tipos electrodos diferentes:

3.2.1.1.1 Electrodo de trabajo (WE)

En el caso de los electrodos serigrafiados desechables la superficie es rugosa, irregular y porosa ya que su producción se basa en una lámina de plástico rociada con el metal, no es una superficie de oro maciza.

Debido a la importancia de las buenas condiciones del WE en los experimentos electroquímicos, una vez que modificado y utilizado el electrodo en un experimento se desechó y se utilizaron nuevos electrodos para cada uno de los experimentos.

3.2.1.1.2 Electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE)

En este caso se utilizó el CE que está incluido en las láminas de los electrodos serigrafiados comerciales.

3.2.1.1.3 Electrodo de referencia (RE)

En este trabajo se decidió llevar a cabo todo el proceso experimental con un electrodo de referencia externo (Ag/AgCl) en lugar de utilizar el que viene implícito en el propio electrodo. Se basa en un hilo de plata de alta pureza (>99,99%). Una vez que se utiliza el electrodo de referencia se debe conservar en KCl 3M y protegido de la luz solar. El potencial del WE se mide respecto al RE, los cuales están situados lo más cerca posible; pero el circuito de la corriente es entre el WE y el CE.

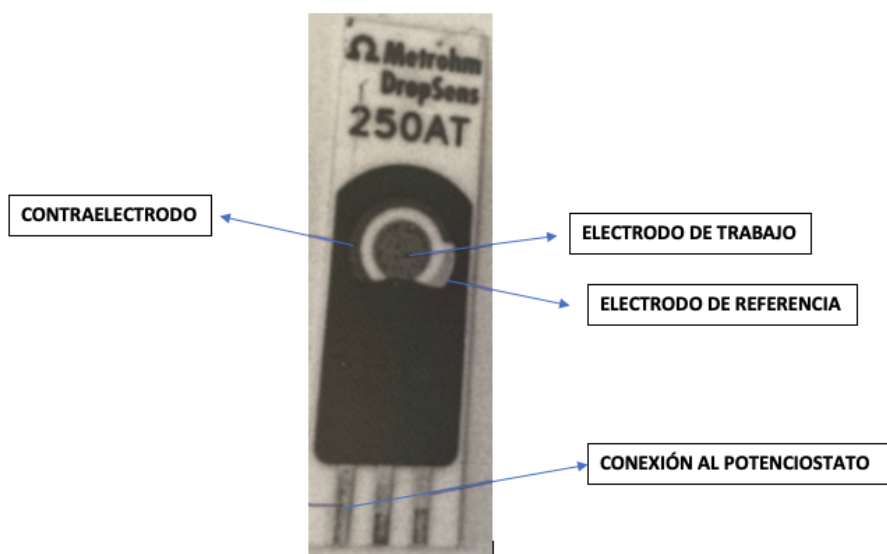


Figura 7 Imagen tomada en el laboratorio del electrodo serigrafiado de oro desechable que se utiliza en el proceso experimental. Esquema con las partes de elaboración propia.

3.2.2 Celda electroquímica

Con el objetivo de llevar a cabo las medidas de los diferentes analitos con el electrodo serigrafiado se tuvo que adaptar parte del material de laboratorio creando una “celda propia”. La celda que se utilizó es de vidrio de tres electrodos que, a diferencia de otras

celdas electrolíticas, en este caso no tenía compartimentos debido a que todos los electrodos deben estar sumergidos en la misma disolución.

El agujero de la parte superior de la celda fue en el que se situaba el conector CAC con el electrodo, y en los de alrededor se situaron: en uno el RE y en otro una aguja para inyectar N_2 en aquellos experimentos que se requería anaerobiosis (considerando anaerobiosis la inyección de N_2 durante 17 minutos en la celda electroquímica).



Figura 8 Imagen tomada en el laboratorio de la celda electroquímica adaptada y utilizada.

3.2.3 Potenciostato

Se basa en un amplificador operacional de la diferencia entre dos potenciales de entrada conectados al WE y al RE siendo dicha diferencia el potencial de salida, el cual está conectado al CE permitiendo que circule la intensidad de corriente entre WE y CE y se pueda llevar a cabo su medida (22).

En este trabajo se utilizó un potenciostato de la casa comercial Pine Instrument Company ® cuya sede está en Grove City, Pennsylvania.

Este tipo de potenciostato permite controlar el potencial que se aplica en el WE para poder medir las diferentes intensidades de corriente que se producen (amperometría).

3.3 Protocolos.

En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de las tres disoluciones que se iban a necesitar para la toma de medidas con los diferentes electrodos.

Preparación del buffer fosfato pH = 7,5

Se utilizaron 60 mL de un buffer fosfato de sodio a un pH = 7,5 (pH óptimo de la GaOx); para conseguirlo se utilizaron las proporciones indicadas en los protocolos de dos soluciones preparadas previamente en volúmenes = 500 mL. Las soluciones se llevaron a cabo con químicos comprados en Sigma – Aldrich Canada Co.® cuya sede se encuentra en Ontario.

- 16% de solución ácida → de fosfato monosódico (NaH_2PO_4) de concentración 0,1M
- 84% de solución básica → de fosfato disódico (Na_2HPO_4) de concentración 0,1M

Se obtuvieron así 500 mL de buffer fosfato que se rellenó con agua destilada hasta un volumen final de 1L.

Preparación disoluciones glucosa 0,55M y galactosa 0,25M

Las soluciones analíticas que se emplearon tuvieron un $V_f = 60$ mL, suficiente para que se cubra toda la superficie del WE una vez en el interior de la celda electroquímica. La K_m de la galactosa oxidasa con respecto a la galactosa es 110, por lo que tiene una mayor afinidad por esta que por la glucosa, cuya K_m es 550; razón por la que las soluciones eran de diferentes concentraciones.

- Solución de glucosa a una concentración 0,55M (5,94 g de glucosa)
- Solución de galactosa a una concentración 0,25M (2,7 g de galactosa)

Se llevaron a cabo toma de muestras con los mismos electrodos de trabajo, pero con diferentes modificaciones:

- Electrodos de trabajo desnudos (superficie sin modificar)
- Electrodos de trabajo con enzima GaOx adsorbida

- Electrodo de trabajo con enzima GaOx + monocapa de ditrioteitol (DTT)
- Electrodo de trabajo con enzima GaOx + monocapa de 4 – aminotiofenol (4 – ATP).

Con cada uno de los electrodos se llevaron a cabo medidas en seis escenarios diferentes:

Escenarios
Buffer fosfato pH = 7,5 + O₂
Buffer fosfato pH = 7,5 en anaerobiosis
Glucosa 0,55M + O₂
Glucosa 0,55M en anaerobiosis
Galactosa 0,25M + O₂
Galactosa 0,25M en anaerobiosis

Tabla 2 Tabla resumen de los seis diferentes escenarios a los que se someterá cada uno de los electrodos.

Lavado de la celda electroquímica

En primer lugar, antes de pasar de un escenario a otro, exceptuando el paso de buffer a la disolución de glucosa, se debía llevar a cabo un lavado exhaustivo de la celda electroquímica para evitar que contaminantes incidiesen en la toma de medidas. El proceso de lavado de la celda era siempre el mismo siguiendo los pasos:

- Enjuagado con agua
- Enjuagado con etanol (2 veces)
- Enjuagado con agua
- Enjuagado con agua destilada
- Enjuagado con buffer fosfato de sodio

Simulación de condiciones de anaerobiosis

Para pasar de la medida en condiciones de aerobiosis a condiciones en anaerobiosis se inyectó nitrógeno al interior de la celda electroquímica durante 17 minutos. El volumen en el interior de la celda debía burbujear, pero no en exceso. Las burbujas no deben tocar

la superficie del electrodo de trabajo para evitar que se estropee cuando esté la superficie del electrodo de trabajo modificada.

Valores programados en el potenciostato para la toma de medidas

<i>First conditioning potential</i>	-,2
<i>Duration</i>	0
<i>Equilibration time</i>	2
<i>Number of scans</i>	3 (con enzima 2)
<i>Start potential</i>	-,2
<i>First vertex potential</i>	.4
<i>Second vertex potential</i>	-,2
<i>Scan rate</i>	0,01 (10 mV/s)

Tabla 3 Tabla con los valores establecidos en el potenciostato para llevar a cabo la toma de medidas en los diferentes escenarios.

3.3.1 Protocolo experimental con electrodos desnudos (sin modificar su superficie)

1. Lavado de la celda electroquímica
2. Toma de medidas del buffer fosfato pH = 7,5 + O₂
3. Inyección de nitrógeno durante 17 minutos
4. Toma de medidas del buffer fosfato pH = 7,5 en anarobiosis
5. Toma de medidas de la disolución de glucosa 0,55M + O₂
6. Inyección de nitrógeno durante 17 minutos
7. Toma de medidas de la disolución de glucosa 0,55M en anaerobiosis
8. Lavado de la celda electroquímica
9. Toma de medidas de la disolución de galactosa 0,25M + O₂
10. Inyección de nitrógeno durante 17 minutos
11. Toma de medidas de la disolución de galactosa 0,25M en anaerobiosis
12. Lavado de la celda electroquímica

3.3.2 Protocolo experimental con electrodos con la superficie modificada con GaOx

Los electrodos de trabajo se modificaron con la GaOx por fisisorción o adsorción física; técnica basada en depositar la enzima sobre la superficie del electrodo de trabajo sin que

esta interfiera con el resto de los electrodos, es decir, sobre el oro. La enzima utilizada se obtenía directamente de una casa comercial. El volumen de enzima que se depositaba sobre el electrodo de trabajo eran 20 μl y la modificación se llevó a cabo durante una hora en una sala refrigerada (4° C).

Una vez pasada la hora, se retiró el excedente de enzima de la superficie del oro con buffer y se comenzó con la toma de medidas siguiendo los mismos pasos indicados en el apartado 3.3.1.

3.3.3 Protocolo experimental con electrodos con la superficie modificada con GaOx + monocapa de ditiotreitól (DTT)

La función de la monocapa de DTT es principalmente evitar la formación de dímeros en la enzima para que no se vea afectada la actividad redox de esta en presencia de las disoluciones de glucosa y de galactosa.

Para poder proceder con la modificación en primer lugar se tenían que diluir 1,54 mg de DTT en un volumen final = 10 mL consiguiendo así una disolución con una concentración de 1mM. Para esta modificación también se necesitaba un volumen final de 20 μl como en el caso anterior (apartado 3.3.2), pero siendo 10 μl de la disolución de DTT 1mM y 10 μl de enzima GaOx. Se llevó a cabo también durante una hora y en una sala refrigerada (4°C).

Una vez pasada la hora se retiró el excedente de DTT + GaOx de la superficie del electrodo de trabajo con buffer y se procedió a tomar medidas siguiendo los pasos indicados en el apartado 3.3.1.

3.3.4 Protocolo experimental con electrodos con la superficie modificada con GaOx + monocapa de 4 – aminotiofenol (4 – ATP).

En primer lugar, se llevó a cabo la disolución de 4 – ATP diluyendo 1,25 mg de 4 – ATP en un volumen final = 10 mL para conseguir una concentración de 1 mM. La modificación se hizo, al igual que con la disolución de DTT, utilizando un volumen final de 20 μl de los cuales en este caso 10 μl eran de 4 – ATP 1mM y los otros 10 μl de enzima GaOx. La modificación se llevó a cabo durante una hora en una sala refrigerada (4°C).

Una vez finalizado el tiempo de modificación, se retiró el excedente de 4 – ATP + GaOx de la superficie del electrodo de trabajo con buffer y se procedió a la toma de medidas siguiendo los pasos indicados en el apartado 3.3.1.

4 Resultados

4.1 Resultados bibliográficos

Título del artículo	Año de publicación	Idioma
Introduction to biosensors	2016	Inglés
Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios	2009	Castellano
International clinical guideline for the management of classical galactosemia: diagnosis, treatment and follow – up	2017	Inglés
Errores congénitos del metabolismo: galactosemia	2003	Castellano
Galactosemia: revisión bibliográfica	2021	Castellano
Insights into the pathogenesis of galactosemia	2003	Inglés
Galactosemia: Towards Pharmacological Chaperones	2021	Inglés
Chapter 55: Disorders of Galactose Metabolism	2015	Inglés
Sweet and sour: an update on classic galactosemia	2017	Inglés
Galactosemia clásica, deficiencia de Galactosa – 1P – Uridintransferasa, Revisión	2017	Castellano
Galactosemia: when is it a newborn screening emergency?	2012	Inglés
Physiology, Carbohydrates	2022	Inglés
Monosaccharide Diversity	2015	Inglés
Enzyme – based amperometric galactose biosensors	2017	Inglés

Tabla 4 Tabla con los artículos filtrados y elegidos para la parte de introducción excluyendo aquellos en los que no aparece año de publicación y las páginas web como RAE y OMIM.

Siguiendo los patrones de búsqueda mencionados en el apartado de métodos, se llevó a cabo una selección y lectura de los más relevantes con respecto a la información necesaria para el desarrollo del trabajo.

A pesar de establecer como requisito que fuesen artículos de los últimos diez años, en algunos contextos, como por ejemplo en la patogénesis de la galactosemia o en cuestiones generales de biosensores no se encontraron artículos tan recientes, razón por la cual se utilizan de otros años anteriores como son 2003 y 2009 (*tabla 4*).

4.2 Resultados experimentales

De todos los experimentos que se llevaron a cabo solo se obtuvieron ciertos resultados relevantes en nuestro trabajo, que son los que se muestran a continuación.

4.2.1 Electrodo desnudo

Las medidas con los electrodos desnudos (superficie no modificada) se llevaron a cabo con la intención de obtener blancos para poder analizar y comparar la respuesta que tienen este tipo de electrodos a los diferentes analitos con los que se va a trabajar antes de modificarlos con la enzima.

Los electrodos de oro suelen caracterizarse por emitir señales en forma de picos asociados a la formación y reducción de óxidos en su superficie (22). La oxidación no catalítica de la glucosa y de la galactosa puede alterar la cinética de la reacción que se esté llevando a cabo en el electrodo y afectar, por tanto, a los resultados experimentales, por lo que no son situaciones deseadas.

Conociendo este problema, para decidir qué potencial aplicar para evitar dicha oxidación, se realizaron experimentos de tres ciclos obteniendo como resultados las gráficas representadas en la figura 9.

En la figura 9A se pueden observar los tres ciclos llevados a cabo. Cada uno está representado por un color, siendo el primero la línea de color negro, el segundo la de color rojo y el tercero la azul. En este caso los potenciales que fueron aplicados viajaban desde $-0,2$ hasta $0,8$ mV.

El pico que aparece en los potenciales de 0,5 a 0,6 mV aproximadamente, llegando hasta una señal de 17 μA , implica que está comenzando a emitirse una señal de oxidación del azúcar (en este caso galactosa) aun en ausencia de la enzima.

En la figura 9B se pueden observar, al igual que en la 9A, los diferentes ciclos llevados a cabo representado cada uno de ellos por el mismo color. En este caso las gráficas se obtuvieron aplicando unos potenciales que viajaban desde $-0,2$ a $0,4$ mV y se observa una señal máxima emitida de aproximadamente $1,5$ μA a un potencial de $0,4$ mV.

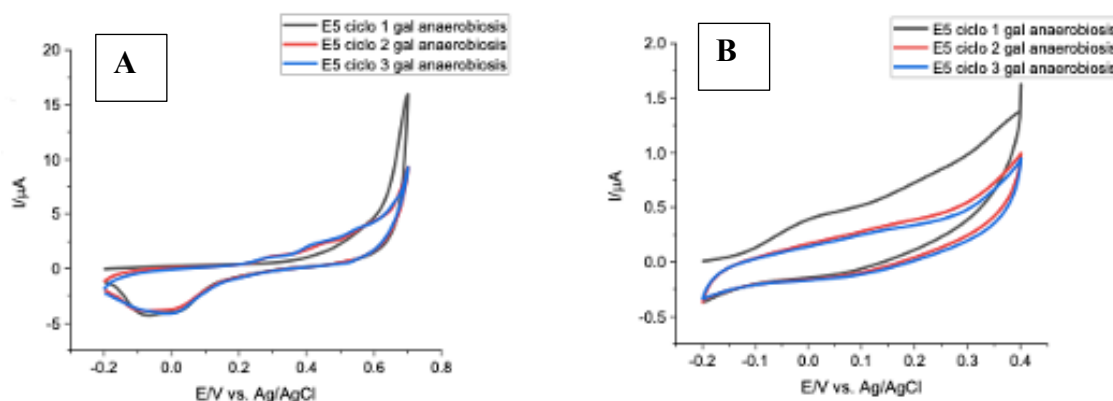


Figura 9 Comparación de los experimentos con potenciales desde $-0,2$ a $0,7$ (figura 9A) y con potenciales de $-0,2$ a $0,4$ (figura 9B).

La figura 10 muestra dos señales obtenidas por un mismo electrodo, que en este caso es el E5. Se observa la señal en presencia de oxígeno, representada por la línea negra, y en condiciones de anaerobiosis por la línea roja. Ambos casos en ausencia de analito, únicamente con buffer.

La superposición de ambas señales sobre la misma gráfica permite la comparación de estas, observándose que en caso de que aparezca oxígeno, existe un pico hacia abajo que representa la oxidación de este cuando se aplicó un potencial de $-0,2$ mV.

En caso de que los electrones se dirijan al oxígeno oxidándolo, se impide la transferencia directa de electrones entre los analitos y la superficie del electrodo en experimentos

posteriores, por lo que se esperaban resultados mejores en condiciones de anaerobiosis que de aerobiosis.

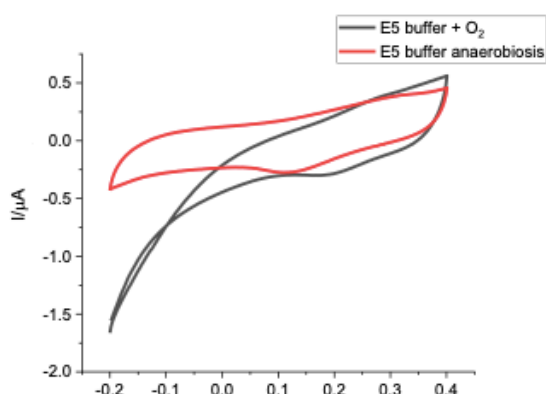


Figura 10 Comparación de la señal emitida por el electrodo 5 desnudo sumergido en buffer en condiciones aerobias (negro) y anaerobias (rojo).

4.2.2 Electrodo con enzima GaOx adsorbida

Las gráficas obtenidas en la toma de medidas tras la modificación de la superficie de los electrodos se pueden observar en la figura 11. La modificación se llevó a cabo por adsorción y con la enzima GaOx.

En la figura 11A se comparan dos señales de un mismo electrodo, en este caso el E2, y ambas en anaerobiosis. Por un lado, se muestra la señal obtenida en presencia de glucosa representada por la línea negra, donde se observa un pico que representa un proceso de oxidación llegando a valores de hasta 15 μA aproximadamente a un potencial aplicado de 0,4 mV. Y, por otro lado, se observa la señal que se obtiene en ausencia de analito, observándose que no aparece señal.

El experimento se llevó a cabo con tres electrodos diferentes, en presencia de glucosa y en anaerobiosis, como muestra la figura 11B. Aparece un E1 representado por la línea negra, y un E3, por la azul, los cuales no muestran ningún pico de oxidación, actuando en presencia de analito como si estuvieran tomándose medidas con buffer. En cambio, sí que se observa una señal representativa con el E2, que se puede distinguir de rojo.

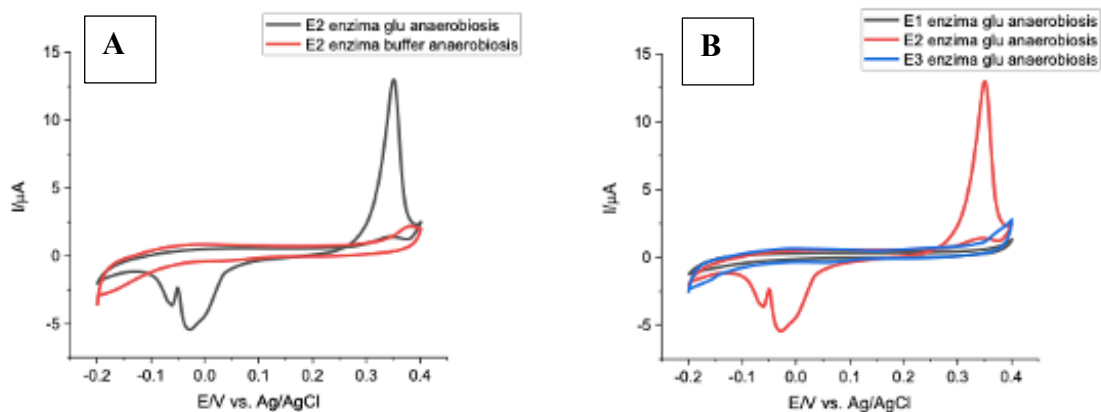


Figura 11 Comparación de las señales entre la presencia y la ausencia de glucosa (11A) y la diferencia entre los diferentes electrodos utilizados en presencia, todos ellos, de glucosa (11B).

4.2.3 Electrodo con la superficie modificada con enzima GaOx + monocapa de ditrioteitol (DTT)

Las medidas llevadas a cabo por el electrodo E1 modificado con enzima GaOx con una monocapa de DTT aparecen representadas en la figura 12.

En la figura 12A se representa la señal detectada en presencia de glucosa tanto en presencia de oxígeno (línea negra), como en ausencia (línea roja). En este caso, se observa que existe una oxidación de la glucosa en ambos escenarios a un potencial aproximado de 0,2 mV. El pico es mayor en presencia de oxígeno llegando a señales de hasta 35 μA , que en ausencia, en cuyo pico máximo se alcanzan aproximadamente 15 μA .

En la figura 12B se observa la misma comparación, pero en presencia de galactosa en lugar de glucosa, siendo también el negro el color que representa la señal en presencia de oxígeno y el rojo en anaerobiosis. Y detectándose de igual manera, una mayor señal en presencia de oxígeno, pero menor que en presencia de glucosa en ambos casos.

La señal con analitos también se comparó frente a las obtenida en presencia de buffer, representadas en las figuras 12C y 12D las que tenían condiciones de aerobiosis, y en las 12E y 12F en las que se había sometido la muestra a una inyección de N_2 durante 17 minutos para simular las condiciones de anaerobiosis.

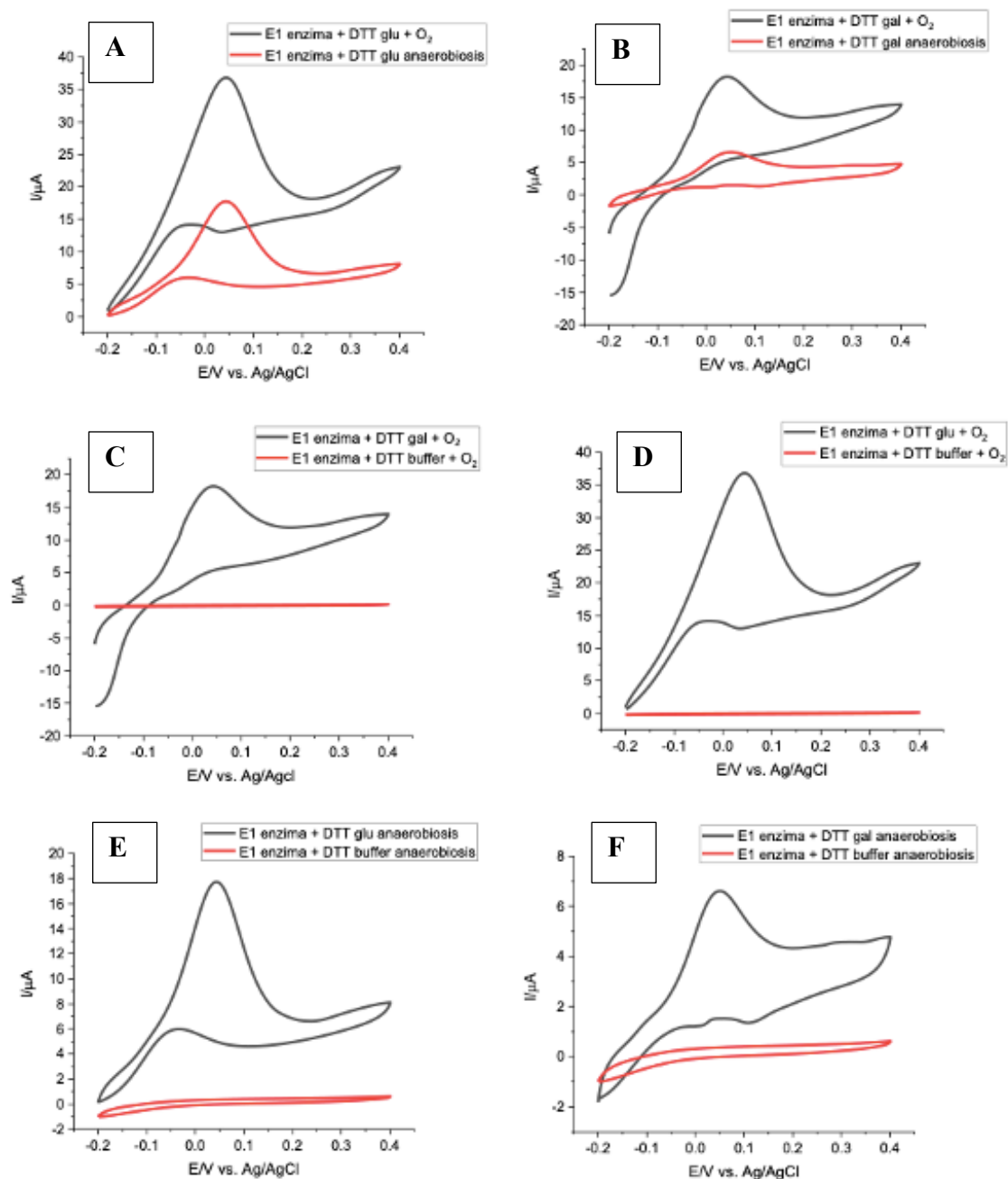


Figura 12 Gráficas en presencia y ausencia de oxígeno tanto con glucosa (figura 12A) como con galactosa (figura 12B). También aparecen las gráficas que comparan los resultados en presencia de oxígeno con glucosa (figura 12C) y con galactosa (figura D) y en el caso de ausencia de oxígeno con glucosa (figura 12E) y con galactosa (figura 12F).

Como se observa en las líneas negras de las figuras desde la 12C a la 12F, la presencia de analito, ya sea glucosa o galactosa, provoca una señal de oxidación a un potencial de 0,1 mV aproximadamente, lo que trata de una oxidación catalítica de los azúcares. En ausencia de analito (representado por las líneas en rojo) no se observa dicha señal.

En el caso en el que más señal se percibe es en el caso de presencia de oxígeno y teniendo la glucosa como analito, donde el pico llega a alcanzar los 35 μA aproximadamente (*figura 12D*).

Las señales de galactosa en aerobiosis (*figura 12C*) y de glucosa en anaerobiosis (*figura 12E*) se asemejan en valores, alcanzando una señal que oscila entre 15 – 17 μA .

La señal más leve se emite en presencia de galactosa y condiciones de anaerobiosis (*figura 12F*) teniendo como señal máxima tan solo 6 μA .

Además, cabe destacar que en el caso de la figura 12 en general aparece una mayor señal en casos de presencia de oxígeno que en casos de anaerobiosis, resultado no esperado que se asocia a que la celda electroquímica no está aislada y por lo tanto las condiciones de anaerobiosis no son estrictas. Además, las condiciones se simulan inyectando durante 17 minutos N_2 , el cual es menos denso que el O_2 , de manera que este último es más persistente, por lo que aun pretendiendo simular condiciones de anaerobiosis puede ser que estuviesen presentes trazas de O_2 .

En la figura 12 solo se muestran resultados de un electrodo a pesar de haber llevado a cabo medidas con tres diferentes. Esto se debe a que solo se observan señales de oxidación en las medidas tomadas con uno de ellos, que como se muestra en la figura 13, es el que está representado de color negro. Mientras que los otros dos, tanto el que está en color azul, como el que aparece representado por la línea roja, no muestran ninguna señal de oxidación en presencia de glucosa y oxígeno.

Se muestran únicamente la gráfica en presencia de glucosa y en condiciones de aerobiosis debido a que son las condiciones en las que el electrodo que sí que muestra un pico de oxidación, mayor señal muestra.

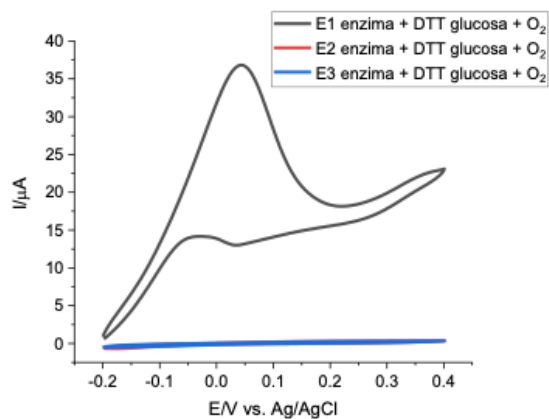
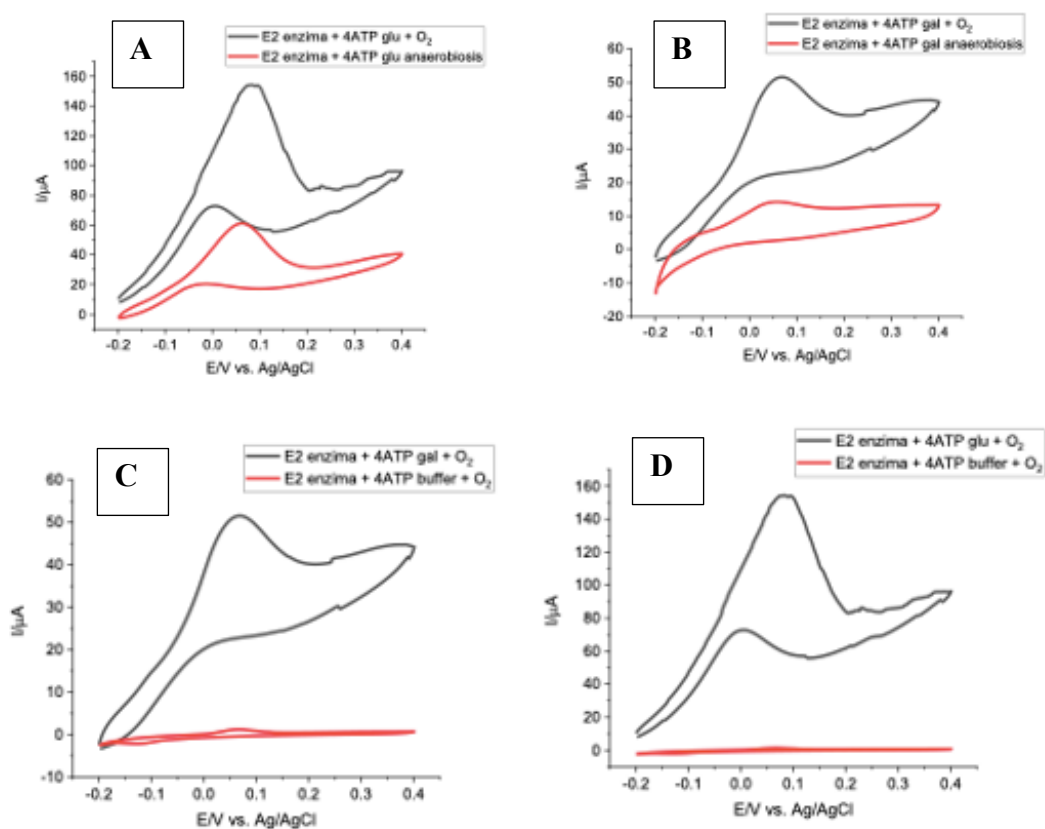


Figura 13 Señal emitida por cada uno de los electrodos que han sido modificados con GaOx + DTT donde se observa que solo aparece activo uno de ellos (línea negra).

4.2.4 Electrodo con la superficie modificada con enzima GaOx + monocapa de 4 – Aminotiofenol (4 – ATP)

En la figura 14 pueden apreciarse las señales en los diferentes escenarios reproducidos con electrodos modificados con 4 – ATP. Se puede ver que, en presencia de analitos, aparece señal de oxidación tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis.



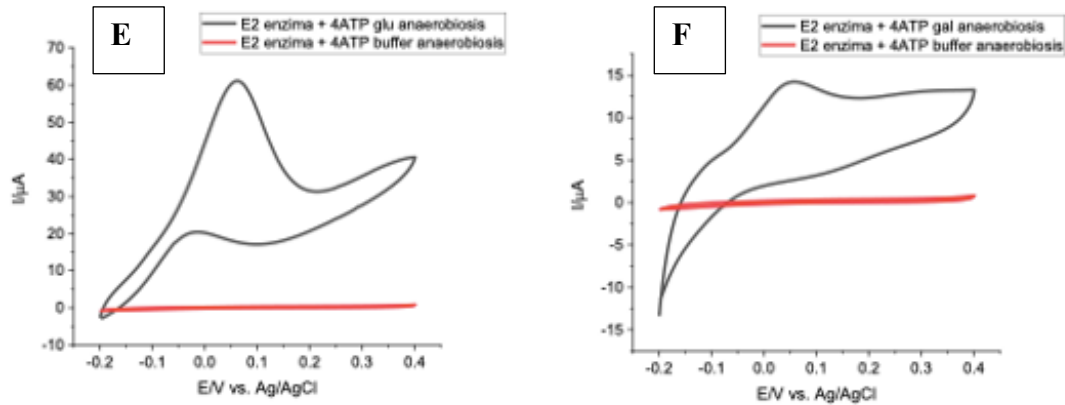


Figura 14 Gráficas en presencia y ausencia de oxígeno tanto con glucosa (figura 14A) como con galactosa (figura 14B). Comparación de los resultados en presencia de oxígeno con glucosa (figura 14C) y con galactosa (figura 14D) y en el caso de ausencia de oxígeno con glucosa (figura 14E) y con galactosa (figura 14F).

Las figuras 14A y 14B permiten la comparación entre las señales emitidas en presencia de los dos analitos tanto en presencia de oxígeno como en ausencia. Se aprecia que en ambas situaciones aparece una señal mayor en el experimento en presencia de glucosa (figura 14A) que en el de galactosa (figura 14B).

En el caso de la figura 14A, que muestra las señales en presencia de glucosa, se observa una señal de oxidación mucho mayor en el caso de presencia de oxígeno, viéndose reflejada por la línea de color negro, llegando a valores de hasta 140 μA . En cambio, en el caso de la simulación de condiciones anaeróbicas, aparece una señal máxima de alrededor de 70 μA .

La figura 14B, en cambio, permite analizar la señal emitida en presencia de galactosa, llegando la línea negra a un pico máximo de alrededor de 50 μA frente a los 10 μA de la línea roja representando el escenario de anaerobiosis.

Al llevar a cabo la comparación entre disoluciones con azúcares y la disolución buffer, en presencia de esta última no se observa señal (línea roja en las figuras 14C – 14F). En cambio, en presencia de analito (línea negra) se observan señales tanto en condiciones de aerobiosis (siendo estas los picos mayores), como en condiciones de anaerobiosis.

Por último, en la figura 15 se puede observar que el experimento se llevó a cabo con tres electrodos diferentes cada uno representado con un color. Se observa claramente que

tanto E1 (rojo) como E3 (azul) tienen una señal prácticamente idéntica y nula. En cambio, uno de los electrodos (E2), presenta señal de oxidación de la glucosa.

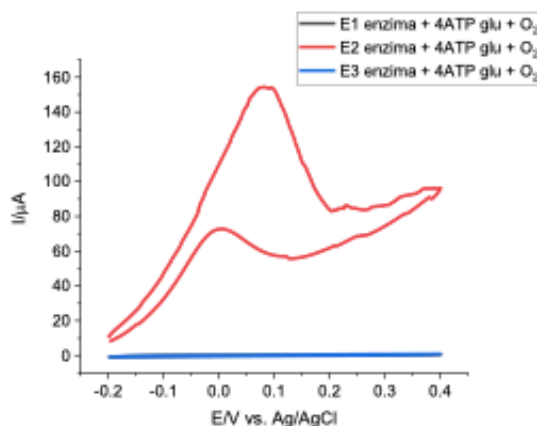


Figura 15 Señal emitida por cada uno de los electrodos que han sido modificados con GaOx + 4 - ATP donde se observa que solo aparece activo uno de ellos (línea negra).

5 Discusión

5.1 Discusión bibliográfica

Como se ha explicado en la introducción, la galactosemia, sobretodo la clásica, supone una gran amenaza para los neonatos debido a su incapacidad para digerir la galactosa presente en la leche (4).

Al no poderse degradar la galactosa, esta se acumula en grandes cantidades en el organismo ocasionando síntomas típicos a corto – medio plazo como ictericia, vómitos o diarrea, y otros a largo plazo que en algunos casos son letales.

Haciendo frente a este problema actual, se plantea el desarrollo de un método novedoso de detección de los niveles de galactosa en neonatos para el diagnóstico de la enfermedad, a pesar de que en la actualidad ya existen otras técnicas para el diagnóstico (tabla 5).

En el caso del análisis genético y del cribado neonatal, como se explica en la introducción, se requieren pruebas confirmatorias de que realmente se trata de un paciente galactosémico (6,7,15).

Método diagnóstico	Título artículos	Autores	Año	Referencia
Análisis genético	Insights into the pathogenesis of galactosemia.	Leslie N	2003	(15)
Cribado neonatal	Galactosemia Clásica, deficiencia de Galactosa – 1P – Uridintransferasa. Revisión.	Roa L, Rosas F, Uribe Ardila A.	2017	(6)
	Galactosemia: Towards Pharmacological Chaperones	Banford S, McCorvie T, Timson D.	2021	(7)
Determinación enzimática	Galactosemia Clásica, deficiencia de Galactosa – 1P – Uridintransferasa. Revisión.	Roa L, Rosas F, Uribe Ardila A.	2017	(6)
	Galactosemia: Towards Pharmacological Chaperones	Banford S, McCorvie T, Timson D.	2021	(7)

Tabla 5 Resumen de las técnicas de diagnóstico de la galactosemia existentes en la actualidad.

A pesar de existir diferentes métodos de diagnóstico se defiende el desarrollo de un biosensor por cuestiones relacionadas con una sostenibilidad económica, usando una sola técnica en lugar de varias. Pero sobretodo, por una sostenibilidad social, mejorando la calidad de vida del paciente (solo se somete a una prueba) y, como en su mayoría son neonatos, de los progenitores. Permite el diagnóstico rápido y temprano y, además, en un hipotético caso de implantación, serviría para detectar los niveles de galactosa a lo largo de la vida del paciente, no únicamente en el momento del diagnóstico.

5.2 Discusión experimental

Como se puede observar en la imagen 9A en caso de utilizar potenciales que viajen desde $-0,2$ a $0,8$ mV se obtiene una señal de oxidación de la galactosa en potenciales alrededor

de 0,5 mV aun en ausencia de enzima galactosa oxidasa. Como lo que se busca con los electrodos desnudos es encontrar los blancos para que la única reacción que se lleve a cabo sea la de la enzima, se decidió que los potenciales que se utilizarían en el trabajo serían de $-0,2$ a $0,4$ mV (figura 9B), ya que el pico disminuía considerablemente y así poder evitar dicha oxidación, ya que si no los resultados con enzima inmovilizada en la superficie del electrodo no serían válidos.

Como se observa en la figura 10, en condiciones de presencia de oxígeno a un potencial de $-0,2$ mV se observa una oxidación del oxígeno existiendo el riesgo de que los electrones se dirijan a este oxidándolo e impidiendo la transferencia directa de electrones entre los analitos y la superficie del electrodo.

En este caso la oxidación del oxígeno da como resultado peróxido, compuesto que es inhibidor de la GaOx (24), por lo que se esperan mejores resultados en condiciones de anaerobiosis que en condiciones de aerobiosis a lo largo del trabajo.

En la figura 11A se muestran las señales obtenidas en anaerobiosis comparando el efecto de la glucosa con respecto a la ausencia de esta. A pesar de que todo el trabajo está enfocado en la detección de la galactosa para evitar los efectos letales de la galactosemia en neonatos, se han obtenido resultados más relevantes utilizando glucosa como analito, razón por la que son las gráficas que se muestran en el apartado de resultados. Esto se puede deber a un error al llevar a cabo las disoluciones de analito, habiendo cometido el error de dejar muy diluida la galactosa.

El potencial al que se espera que aparezca la oxidación catalítica de la glucosa es de $0,05$ a $0,2$ mV aproximadamente (25), por lo que al obtener la señal en $0,4$ mV se determinó que se correspondía a la oxidación no catalítica de la glucosa.

Como no es lo que se desea en el trabajo, se decidió modificar la superficie de los electrodos con DTT y con 4 – ATP esperando una respuesta diferente evitando que la enzima dimerice gracias a la formación de puentes disulfuro y no se vean comprometidas sus propiedades redox (22).

De esta manera, se obtienen los resultados de las figuras 12 (fruto de la modificación con DTT) y 14 (electrodos modificados con 4 – ATP) donde se observan picos de oxidación de glucosa en potenciales aproximados a $0,1$ mV, atribuyéndose por tanto la actividad de dicha oxidación a la enzima GaOx.

En la figura 12 se observa una señal mayor en aerobiosis que en anaerobiosis, resultado que, tras la obtención de los resultados con los blancos, no se esperaban. Estos resultados pueden atribuirse a dos motivos, el primero es que la celda electroquímica que se utilizó no era la específica para este tipo de trabajo, sino que se modificó el material de laboratorio tapando con tapones de goma los agujeros cuando se simulaba anaerobiosis, por lo que puede ser que la celda no estuviese totalmente aislada y no se cumpliesen las condiciones de anaerobiosis.

El otro motivo posible a la obtención de datos no esperados es que las condiciones de anaerobiosis se intentaban conseguir inyectando N_2 durante 17 minutos y que este, por presión expulsase el O_2 del interior de la celda electroquímica, pero el N_2 , con una densidad de $1,25 \text{ kG/m}^3$, es menos denso que el O_2 con una densidad de $1,429 \text{ kG/m}^3$ (26), por tanto, puede ser que al ser más denso, el oxígeno persistiese y no fuesen suficientes 17 minutos para conseguir que las condiciones de anaerobiosis.

Si se comparan los resultados obtenidos con la monocapa de DTT (*figura 12*) y los obtenidos con la monocapa de 4 – ATP (*figura 14*) se observa fácilmente que las señales son mucho mayores en caso de realizar esta última modificación. En el caso de los experimentos con 4 – ATP se llega a señales (en presencia de glucosa y oxígeno) de hasta $150 \mu\text{A}$ frente a los $40 \mu\text{A}$ que se consiguen con la modificación con DTT. Esto puede deberse a que el 4 – ATP es un gran bloqueante evitando uniones inespecíficas de la enzima, siendo mejor que otros (como puede ser el DTT) por su alta conductividad y por la presencia de anillos aromáticos, que además de interactuar entre sí confiriendo estabilidad, su deslocalización electrónica provocan un buen bloqueo (27). Por tanto, tanto DTT como 4 – ATP sirve para que no se desnaturalice la enzima (debido a que se observan señales de oxidación de azúcares por parte de esta cuando aparecen dichas monocapas), pero cabe destacar que presenta mejores resultados la monocapa de 4 – ATP.

Hay tres figuras que representan la comparación entre las actividades de los tres electrodos utilizados en el experimento concreto: figura 11B (solo con GaOx adsorbida), figura 13 (GaOx + DTT) y figura 15 (GaOx + 4 – ATP). Se observa que en los tres casos solo presenta actividad uno de los electrodos. Esto se puede atribuir a diferentes causas:

- La enzima no se obtuvo nueva para el presente trabajo. Se llevaron a cabo multitud de experimentos con ella con lo que ello supone (descongelación – congelación).

Por tanto, los resultados tan desiguales podrían deberse a que la enzima estuviese contaminada o que hubiese sufrido pérdida de actividad.

- El método de inmovilización de enzima que se lleva a cabo en el presente trabajo es la adsorción, para el cual es muy importante el tamaño, la densidad, la porosidad y la forma del electrodo de trabajo (28).

La fabricación de los electrodos serigrafiados de oro desechables consiste en la deposición de una tinta de oro sobre la placa del electrodo utilizando una plantilla con la geometría deseada para el electrodo de trabajo (29). Teniendo en cuenta el método de fabricación, puede ser que no todos los electrodos tuviesen las mismas propiedades de superficie, característica imprescindible para la reproducción de resultados en este tipo de modificación enzimática.

6 Conclusiones

1. La galactosemia en la actualidad, especialmente la clásica (Galactosemia I) supone una gran amenaza para neonatos. Se debe llevar a cabo un diagnóstico precoz para evitar consecuencias en ocasiones letales.
2. Teniendo en cuenta las técnicas de diagnóstico actuales, los biosensores tienen un gran potencial clínico porque supondría una mejora en la sostenibilidad social y económica.
3. Las condiciones del experimento, como por ejemplo qué bloqueante que utilizar para evitar que la enzima dimerice en la superficie del electrodo o las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis son una decisión importante para el análisis de los resultados.
4. Los electrodos serigrafiados de oro desechables no sirven para llevar a cabo experimentos en los que se requiera cierta reproductividad de los resultados debido a que, por la técnica de fabricación, las superficies de los electrodos de trabajo no son homogéneas. Por tanto, no se pueden sacar conclusiones relevantes en cuanto a la fabricación de biosensores debido a que los resultados no son representativos.

7 Bibliografía

1. Holesh JE, Aslam S, Martin A. Physiology, Carbohydrates . Treasure Island (FL): StatPearls . 2022.
2. Seeberger, Peter H. Monosaccharide Diversity [Internet]. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY); 2015. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/28876863>
3. Conte F, van Buuringen N, Voermans NC, Lefeber DJ (2021). Galactose in human metabolism, glycosylation and congenital metabolic disease.
4. Lukito W, Malik SG, Surono IS, Wahlqvist ML. From “lactose intolerance” to “lactose nutrition”.
5. Berry GT. Galactosemia: when is it a newborn screening emergency? *Mol Genet Metab.* 2012;7–11.
6. Roa L, Rosas F, Uribe Díaz S, Uribe Ardila A. Galactosemia Clásica, deficiencia de Galactosa-1P-Uridintransferasa, Revisión. *Revista Semilleros Med.* 2017 Aug 1;11:77–86.
7. Banford S, McCorvie TJ, Pey AL, Timson DJ. Galactosemia: Towards Pharmacological Chaperones. *J Pers Med [Internet].* 2021 Feb 7;11(2):106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33562227>
8. Coelho AI, Rubio-Gozalbo ME, Vicente JB, Rivera I. Sweet and sour: an update on classic galactosemia. *J Inherit Metab Dis [Internet].* 2017/03/09. 2017 May;40(3):325–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28281081>
9. Berry GT. Chapter 55 - Disorders of Galactose Metabolism. In: Rosenberg RN, Pascual JM, editors. *Rosenberg’s Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition) [Internet].* Fifth Edition. Boston: Academic Press; 2015. p. 615–26. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124105294000553>
10. Carrillo Estrada Ú, Barrios García B, Valdés Moreno A. Galactosemia. Diagnóstico precoz mediante estudio enzimático. *Rev Cubana pediatría* v75 n3 Ciudad de La Habana jul - sept 2003.
11. A. McKusick V, L. Kniffin C. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (R). Johns Hopkins University, Baltimore. MD. MIM Number: 230200: May 2020: World Wide Web
URL:<https://www.omim.org/entry/230200?search=galactosemia&highlight=%28galactosaemia%7Cgalactosemia%29>.
12. de Tecnologías Sanitarias I de E. Cribado neonatal de la galactosemia clásica. Revisión sistemática.
13. A. McKusick V. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (R). Johns Hopkins University, Baltimore. MD. MIM Number: 23035 : March 2022 : World Wide Web
URL:<https://www.omim.org/entry/230350?search=Galactosemia&highlight=%28galactosaemia%7Cgalactosemia%29>.
14. A. McKusick V, Cassandra L. Kniffin. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (R). Johns Hopkins University, Baltimore. MD. MIM Number: 230400 : March 2022 : World Wide Web
<https://www.omim.org/entry/230400?search=Galactosemia&highlight=%28galactosaemia%7Cgalactosemia%29>.

15. Leslie ND. INSIGHTS INTO THE PATHOGENESIS OF GALACTOSEMIA. Annual Review of Nutrition [Internet]. 2003;23(1):59–80. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073135>
16. Alberto Ponton R. Errores congénitos del metabolismo: galactosemia. Dialnet. 2003.
17. Godoy - Salgado C, Sabillón - Mendoza A, Zárate - Mondragón F, Toro - Monjaraz E, Cadena - León J, Ignorosa - Arellano K, et al. Galactosemia: revisión de la bibliografía. Acta pediatr Mex . 2021;27–43.
18. Welling L, Bernstein LE, Berry GT, Burlina AB, Eyskens F, Gautschi M, et al. International clinical guideline for the management of classical galactosemia: diagnosis, treatment, and follow-up. J Inherit Metab Dis [Internet]. 2016/11/17. 2017 Mar;40(2):171–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27858262>
19. REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: Diccionario de la lengua española, 23.^a ed., [versión 23.5 en línea]. <<https://dle.rae.es>>.
20. Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. Essays Biochem [Internet]. 2016 Jun 30;60(1):1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27365030>
21. Jiménez C C, E. León D. Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. Visitae Revista de la facultad de química farmacéutica. 2009;
22. Pita M, Lopez de Lacey A. Capítulo 17 Métodos electroanalíticos. Madrid; 2012.
23. Kanyong P, D Krampa F, Aniweh Y, A Awandare G. Enzyme - based amperometric galactose biosensors: a review. 2017.
24. Kosman DJ. Galactose oxidase. Copper Proteins and Copper. 2018;
25. Osornio Villa A. Oxidación electroquímica de glucosa con nanopartículas de oro soportadas en pasta de grafito/carbon (AuNPs/C). [Santiago de Querétaro]: Cideteq; 2017.
26. Valvias [Internet]. [cited 2022 May 20]. Available from: <http://www.valvias.com/prontuario-propiedades-materiales-densidad-gases.php>
27. Santiago Rodríguez EJ. Desarrollo de un genosensor electroquímico para la detección del gen 16S rRNA de Legionella pneumophila. 2014;
28. Cebrián Cabo S. Nuevos métodos y soportes para la inmovilización de enzimas. 2020;
29. Electrodo serigrafiado como plataforma analítica [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://quimicosonador.wordpress.com/2012/03/23/electrodos-serigrafiados-como-plataforma-analitica/>