

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Desarrollo de un biosensor óptico a partir de sistemas metálicos nanoestructurados para la detección in vitro de Leishmaniasis

Yuly Andrea Prada Vargas

Magister en Química

Tesis de Investigación para optar al título de Doctor en Química

Director(es)

Enrique Mejía Ospino, PhD en Química

John Castillo León, PhD en Química

Codirector

Rafael Cabanzo Rodríguez, Magister en Física

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Doctorado en Química

Bucaramanga

2021

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Dedicatoria

A mis padres y a mi abuela por su amor incondicional y por apoyar la realización de todos mis sueños.

La ciencia es encantadora y prodigiosa como el arte, y así como el arte debe estar bellamente escrita.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Agradecimientos

Al profesor Enrique Mejía por ser mi mentor durante mi formación académica y profesional, por su confianza, dedicación, motivación y optimismo al dirigir mi tesis doctoral, aportando significativamente en la construcción de muchos conocimientos de forma integral.

Al profesor John Castillo León por dirigir y dar sus aportes al desarrollo de este trabajo, por su motivación constante para cumplir satisfactoriamente los objetivos.

Al profesor Rafael Cabanzo por acogerme en su grupo de investigación desde el inicio de mi formación académica, por sus aportes y consejos en el desarrollo experimental.

A la Dra. Fanny Guzmán por su tiempo y constante acompañamiento desde mi maestría hasta hoy, reforzando continuamente mis conocimientos en síntesis de péptidos.

A la Dra. Claudia Ortiz por reservarme siempre un espacio en su grupo de investigación de Bioquímica y Microbiología (GIBIM) y facilitarme todo lo que ha estado a su alcance.

A la Prof. Laura M. Lechuga por aceptar la realización de mi estancia doctoral en su grupo de Nanobiosensores y aplicaciones biomédicas (NanoB²A) en el ICN2. Complementando mi formación doctoral y brindando todo el apoyo posible a la culminación de esta.

A la Dra. María Soler del NanoB²A, por su tiempo y dedicación durante mi estancia doctoral. Por su disposición y optimismo en la escritura y publicación del artículo.

A COLCIENCIAS por otorgarme el beneficio de la Beca de Doctorados Nacionales en el marco de la convocatoria 647.

A mis compañeros del LEAM, especialmente a Ian Soler, Ximena Ramírez, Ximena Calderón, Brayan Arenas, Sandra Herrera, Cindy Romero y Jennifer Ruiz por los días de esparcimiento, risas y compartir el vaso de café en medio de los experimentos algunas veces extenuantes.

A Gloria Vargas, por toda su confianza y motivación para sobresalir aun cuando las situaciones no eran favorables.

A Keyla Ortiz, por una bonita amistad que se forjó en los Laboratorios y su ánimo para conmigo.

A Paola Andrea Sarmiento, por su energía, su acompañamiento y su apoyo incondicional en la culminación de mis propósitos.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Tabla de Contenido

	pág.
Introducción	17
1. Generalidades: Antecedentes, Diagnóstico y Detección de la Leishmaniasis	20
1.1 Antecedentes en la Detección y Diagnóstico de Leishmaniasis	23
2. Diseño y síntesis de péptidos homólogos a las lectinas (PepHLec) para el reconocimiento de glicoproteínas secretadas por parásitos de Leishmania.....	27
2.1 Rol del sistema inmunitario en la infección por Leishmaniasis.....	30
2.2 Gliconjugados mayoritariamente secretados en la infección por Leishmania	31
2.3 Familia de proteínas de las Lectinas	34
2.4 Estrategias bioinformáticas y de métodos computacionales para el diseño de secuencias peptídicas basadas en proteínas.....	35
2.4.1 Herramientas y algoritmos aplicados al análisis secuencial	36
2.5 Afinidad y Parámetros Cinéticos en la Interacción de Pares Moleculares (PepHLec-Target) Determinado por Resonancia Plasmónica Superficial (SPR)	41
2.6 Síntesis química de péptidos	42
2.7. Metodología en el diseño y síntesis de péptidos	45
2.7.1 Diseño bioinformático de péptidos homólogos a las lectinas	45
2.7.2 Dinámica Molecular (MD)	46
2.7.3 Síntesis de péptidos cortos basados en las lectinas	46
2.7.4 Purificación y caracterización de los péptidos sintéticos.....	47
2.7.4.1 Desalinización.....	47
2.7.4.2 Purificación en columnas C-18.....	47
2.7.4.3 Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC).. ..	47
2.7.4.4 Espectrometría de masas.....	48

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

2.7.4.5 Dicroísmo circular..	48
2.7.5 Determinación de los parámetros cinéticos empleando la técnica de Resonancia Plasmónica Superficial (SPR)	48
2.7.5.1 Biofuncionalización de los chips de Au con los PepHLec2854, PepHLec2855 y PepHLec2856.....	49
2.7.5.2 Determinación de parámetros cinéticos y constantes de afinidad de los PepHLec frente al PPG y la sAP.....	51
2. 8 Análisis de resultados del diseño y síntesis de los PepHLec	52
2.8.1 Análisis bioinformático de moléculas secretadas por Leishmania: sAP y PPG	52
2.8.2 Diseño racional de los PepHLec	54
2.8.3 Análisis por Dinámica molecular de la interacción entre los PepHLec y los targets (sAP y PPG).....	56
2.8.4 Síntesis de péptidos en fase sólida	61
2.8.5 Determinación de las constantes cinéticas y la afinidad de los péptidos sintéticos por la sAP y el PPG	63
2.9 Conclusiones del diseño y síntesis de los PepHLec.....	69
3. Síntesis y Caracterización de AuNC fluorescentes basados en PepHLec.....	70
3.1 Nanoclusters de metales nobles	71
3.1.1 Comportamiento optoelectrónico de AuNC	73
3.1.2 AuNC fotoluminiscentes.....	75
3.2 Síntesis de AuNC fluorescentes	78
3.2.1 Síntesis por Reducción Química	80
3.2.2 Ataque químico a nanoparticulas.....	82
3.2.3 Agregación de complejos de Au(I) tiolados	83

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

3.3 AuNC basados en péptidos y proteínas.....	85
3.3.1 Síntesis de AuNC mediados por proteínas.....	85
3.3.2 AuNC basado en péptidos.....	91
3.4 Metodología de la síntesis “in situ” de AuNC basados en los PepHLec	98
3.4.1 Variación de Algunos Parámetros en la Síntesis de AuNC@PepHLec.....	100
3.4.1.1 Efecto de la concentración de HAuCl ₄	100
3.4.1.2 Efecto de la Relación molar de Péptido respecto a los iones Au ³⁺	100
3.4.1.3 Efecto en la relación volumétrica del agente reductor (NaBH ₄) respecto a los iones Au ³⁺	101
3.4.2 Determinación de propiedades fisicoquímicas de AuNCs.....	101
3.4.2.1 Análisis del comportamiento plasmónico por espectroscopía UV-Vis.	102
3.4.2.2 Análisis de las propiedades fotoluminiscentes por espectroscopía de fluorescencia.	102
3.4.2.3 Análisis de tamaño hidrodinámico por dispersión de la luz en modo dinámico (DLS)..	103
3.4.2.4 Determinación del Potencial Zeta de los AuNC@PepHLec.	104
3.4.3 Estudio de la Estructura Atómica y Molecular de los AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855.....	105
3.4.3.1 Análisis por espectroscopía Raman intensificada por efecto de superficie (SERS).....	105
3.4.3.2 Análisis por espectroscopía de fluorescencia de Rayos X.....	107
3.4.3.3 Elucidación de la estructura molecular empelando espectrometría de masas.	108
3.4.4 Determinación del tamaño y morfología de los AuNC@PepHLec2854 por Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM)	109
3.5 Análisis de Resultados de la Síntesis de AuNC Usando los PepHLec.	111
3.5.1 AuNC@PepHLec.....	111
3.5.2 Propiedades optoelectrónicas de los AuNC basados en PepHLec.....	119

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

3.5.2.1 Análisis del comportamiento plasmónico de AuNC por UV-Vis.....	119
3.5.2.2 Análisis de las propiedades fotoluminiscentes de los AuNC@PepHLec.....	122
3.5.3 Análisis Estructural, Atómico y Molecular de los AuNC basados en PepHLec	125
3.5.3.1 Análisis por espectroscopía fotoelectrónica de Rayos X de los AuNCs.	125
3.5.3.2 Análisis por espectroscopia Raman intensificada por efecto de superficie (SERS).....	128
3.5.3.3 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF..	131
3.5.4 Determinación del tamaño y la forma de los AuNC@PepHLec2854 por TEM	135
3.6 Conclusiones de la Síntesis de AuNC@PepHLec.	136
4. Evaluación de AuNC fluorescentes basados en PepHLec como un biosensor óptico para Leishmaniasis	138
4.1 Biosensor.....	139
4.1.1 Biosensores ópticos.....	140
4.1.2 Biosensores basados en fluorescencia	142
4.1.3 Características de un biosensor óptico.....	144
4.1.4 Transferencia de energía de resonancia Föster (FRET).....	145
4.1.5 Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS).....	146
4.1.6 Análisis del tiempo de vida media de la fluorescencia	146
4.1.7 Cambio de polarización o anisotropía de fluorescencia	147
4.2 Biosensores ópticos a partir de nanoestructuras.....	147
4.3 Antecedentes en la Detección de Leishmaniasis Usando Nanoestructuras.....	150
4.4 Metodología para la Evaluación de los AuNC@PepHLec2854 como un Biosensor Óptico para la Detección de Leishmaniasis.....	158
4.4.1 Análisis de las propiedades luminiscentes de los AuNC en presencia de PPG y sAP comerciales	158

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

4.4.2	Análisis de los AuNC@PepHLec2854 frente sueros sanguíneos de ratón	159
4.5	Análisis de Resultados de los AuNC@PepHLec2854 como un Biosensor Óptico.	160
4.5.1	Biosensado de sAP y PPG Comerciales.	160
4.5.2	Evaluación de los AuNC@PepHLec2854 como un Biosensor para la Detección de Leishmaniasis en muestras de Suero Sanguíneo de Ratón	165
5.	Conclusiones.	168
	Referencias Bibliográficas	170
	Apéndices.....	204

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Lista de Tablas

	pág.
Tabla 1. Métodos clínicos para la detección de Leishmaniasis.	24
Tabla 2. Listado del grupo de proteínas lectinas reportadas en la base de datos: Protein Data Bank usadas para diseñar la secuencia primaria de los péptidos sintéticos.	45
Tabla 3. Péptidos homólogos a las lectinas resultado del diseño bioinformático.....	56
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de péptidos diseñados a partir de un conjunto de 16 secuencias de proteínas perteneciente a la familia de Lectinas.	56
Tabla 5. Parámetros cinéticos y afinidad entre los PepHLec y la sAP.	66
Tabla 6. Parámetros cinéticos y afinidad entre los PepHLec y la PPG.	66
Tabla 7. Modos vibracionales observados en el análisis Raman de los PepHLec2854 y y el efecto SERS en las nanoestructuras AuNC@PepHLec2854.....	130
Tabla 8. Modos vibracionales observados en el análisis Raman de los PepHLec2855 y el efecto SERS en las nanoestructuras AuNC@PepHLec2855.....	130

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Lista de Figuras

	pág.
Figura 1. Ciclo de vida de los parásitos del género <i>Leishmania</i> tras la infección por picadura de un mosquito flebótomo portador de los promastigote en su tracto digestivo.	21
Figura 2. Glucoconjugados secretados por parásitos del género <i>Leishmania</i> durante la infección por leishmaniasis.	32
Figura 3. Representación de la estructura del LPG de un parásito <i>Leishmania</i> con sus 4 dominios.	33
Figura 4. Visualización del modelamiento la conformación 2D predominante en las: i).Fosfatasas ácidas; ii).Proteofosfoglicanos cuyas estructuras fueron extraídas de la Protein Data Bank con códigos ID 2SO4 y 1XKU respectivamente usando el software Pymol.....	34
Figura 5. Alineamiento de secuencias de proteínas identificadas como AAB24882 y AAB24881	37
Figura 6. Esquema de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS) por la estrategia del grupo FMoc empleada en la síntesis de los PepHLec.....	44
Figura 7. Esquema de biofuncionalización la de las superficies sensoras de oro nanoestructurado y análisis de la sAP y PPG empelando la técnica de SPR.	50
Figura 8. Alineamiento de múltiple de 18 secuencias de fosfatasas acidas secretadas parásitos <i>Leishmania</i>	52
Figura 9. Alineamiento múltiple de 4 proteofosfoglicanos identificados en parásitos <i>Leishmania</i>	53

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 10. Regiones conservadas de glicoproteínas secretadas por parásitos del género Leishmania	54
Figura 11. Mapas de frecuencia de contacto de los PepHLec con la sAP	58
Figura 12. Mapas de frecuencia de contacto de los PepHLec con el PPG	59
Figura 13. Modelamiento de la interacción de los PepHLec con la sAP y el PPG	60
Figura 14. Espectros de dicroísmo circular de la tendencia de las estructuras secundarias de cada PepHLec	62
Figura 15. Sensogramas ajustados para determinar los parámetros cinéticos y constantes de afinidad de los PepHLec con la sAP y PPG	64
Figura 16. Escala de tamaño de las nanoestructuras metálicas.	72
Figura 17. Diagrama de Jablonski donde se representan las transiciones electrónicas asociadas a los fenómenos de luminiscencia.....	76
Figura 18. A) Diagrama de niveles de energía de orbitales de Kohn-Shan modelado para Au ₂₅ NC tiolados. B) Espectro UV-Vis calculado de Au ₂₅ NC tiolados.....	77
Figura 19. Diagrama esquemático de las estrategias sintéticas para la síntesis de AuNC.	80
Figura 20. Síntesis de AuNC por agregación de complejos Au(I)-Tiolato usando un hidrogel polimérico de quitosano como microreactor.	85
Figura 21. Modelo de la formación de AuNC en solución acuosa a partir de BSA.....	87
Figura 22. Espectros de absorción de los AuNC de diferentes tamaños preparadas a partir del tripéptido GSH variando el pH y reducción con CO.....	94
Figura 23. Síntesis de AuNC basado en PepHLec,.....	98

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 24. Efecto SERS de una AuNP con un péptido	106
Figura 25. Método preparativo para análisis por STEM.....	111
Figura 26. Espectros UV-Vis de AuNC@PepHLec2854 con diferentes concentraciones del precursor de Au.	113
Figura 27. Espectros UV-Vis de AuNC@PepHLec2854 sintetizados a partir del PepHLec2854 con variación de la relación volumétrica del agente reductor.	114
Figura 28. Espectros de Emisión de AuNC@PepHLec2854 sintetizados con diferentes volúmenes de NaBH ₄ (~50μM).....	115
Figura 29. Espectros de Emisión de AuNC@PepHLec2854 sintetizados con diferentes relaciones molares del PepHLec2854:Au ³⁺	118
Figura 30. Espectros UV-Vis de los AuNC sintetizados con cada uno de los PepHLec bajo los mismos parámetros.	120
Figura 31. Espectros de Emisión de AuNC sintetizados con cada uno de los PepHLec bajo las mismas condiciones de síntesis.	123
Figura 32. Espectros XPS de alta resolución de para la región del Au 4f de AuNC sintetizados usando PepHLec.....	127
Figura 33. Espectros SERS de AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855	129
Figura 34. Espectros de masa MALDI-TOF de AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855	132
Figura 35. Micrografías de AuNC@PepHLec2854 tomadas en un microscopio TEM.....	135

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 36. Esquema de los componentes principales para el análisis de la señal de fluorescencia en un bioensayo	143
Figura 37. Apagamiento de la señal de emisión de fluorescencia por la interacción entre AuNC con un apagador.....	149
Figura 38. Comportamiento de la emisión de fluorescencia de AuNC@PepHLec2854 con la adición de sAP y PPG a diferentes concentraciones.	161
Figura 39. Evaluación de los AuNC@PepHLec2854 como un sistema de sensado de Leishmaniasis en suero sanguíneo de ratón infectado.....	166

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. <u>C</u> ondiciones óptimas para la inmovilización de los PepHLec en un chip de Au para el análisis por SPR.	204
Apéndice B. <u>A</u> nálisis con CDPro usando dos algoritmos matemáticos para determinar la tendencia en la conformación estructural de los PpepHLec.	205
Apéndice C. <u>S</u> ensogramas correspondientes a cada una de las etapas de inmovilización de los PepHLec sobre la superficie sensora de un chip de Au obtenidos por la técnica SPR.	206
Apéndice D. <u>E</u> nsayo de especificidad de los PepHLec empleando BSA en el análisis por SPR sobre un chip de Au funcionalizados con cada uno de los péptidos en ensayos independientes.	207
Apéndice E. <u>T</u> amaño de partícula de los PepHLec determinado por la técnica de DLS.	208
Apéndice F. <u>D</u> eterminación del potencial Zeta de los AuNC@PepHLec	210
Apéndice G. <u>E</u> spectros XPS de las componentes: C1s, S2p+Si y S2p, de los AuNC@PepHLec2854....	211
Apéndice H. <u>R</u> egresión lineal de la respuesta como emisión de fluorescencia de los AuNC@PepHLec2854 respecto a la concentración de sAP en un rango de concentraciones de 5,2-104 nm empleada en la determinación del límite mínimo de detección.	212

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Resumen

Título: Desarrollo de un biosensor óptico a partir de sistemas metálicos nanoestructurados para la detección in vitro de Leishmaniasis*

Autor: Yuly Andrea Prada Vargas**

Palabras Clave: biosensores, nanoclusters de oro, péptidos, fosfatasa acida, proteofosfoglicano, leishmaniasis.

Descripción: Estudios recientes han demostrado que la nanoestructura de oro de tamaño subnanométrico (0,5-2 nm) exhibe propiedades fotoluminiscentes resultantes del confinamiento cuántico de electrones distribuidos en superficies. Estas propiedades son el resultado de finas agregaciones de átomos de oro protegidos con biomoléculas como proteínas, cadenas de ADN y péptidos ricos en residuos de cisteína. Curiosamente, diseñamos péptidos homólogos al dominio conservador de lectinas, que puede reconocer glicoconjugados de Leishmania. Los péptidos se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida múltiple utilizando la metodología del grupo fmoc en medio ácido. Finalmente, el péptido se purificó mediante HPLC. La masa molecular de este péptido fue confirmada por MALDI-TOF y para verificar la estructura de la α -hélice usamos dicroísmo circular. En este trabajo, describimos un método de sonicación fácil y rápido para la síntesis de AuNC con 3.0 nm de tamaño hidrodinámico y fotoemisión a 635 nm utilizando el péptido sintético PepHLec2854 como plantilla. Las interacciones entre el péptido y los nanoclusters de oro se confirmaron mediante fotoemisión de rayos X y espectroscopía Raman. En particular, a partir de los espectros ultrafinos que se muestran en el análisis MALDI-TOF. Finalmente, evaluamos el AuNC@PepHLec2854 como un biosensor óptico basado en espectroscopia de fluorescencia y la señal de fluorescencia de sAP y PPG. Observamos el aumento de la fluorescencia en presencia de sAP proporcional a la concentración. Esto puede sugerir que existe una fuerte interacción entre sAP y AuNC@PepHLec2854, por lo tanto, el aumento de la intensidad de la fluorescencia puede estar relacionado con el mecanismo de asociación que tiene lugar cuando la molécula diana es detectada por AuNC@PepHLec2854. Este estudio es el primer paso hacia la fabricación de un biosensor óptico basado en AuNC funcionalizados con péptidos sintéticos para detectar biomoléculas como la fosfatasa ácida y los proteofosfoglicanos que son secretados por los parásitos Leishmania.

* Tesis Doctoral

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Doctorado en Química. Director: Enrique Mejía Ospino. Doctor en Química. Director: John Castillo León. Doctor en Química. Codirector: Rafael Cabanzo. Magister en Física.

Abstract

Title: Development of an optical biosensor based on nanostructured metal systems for the in vitro detection of Leishmaniasis*

Author(s): Yuly Andrea Prada Vargas**

Key Words: biosensors, gold nanoclusters, peptides, acid fosfatase, proteophosphoglycans, leishmaniasis.

Desciption: Recent studies have shown that sub-nanometric (0.5-2 nm) size gold nanostructure exhibits photoluminescent properties resulting from the quantum confinement of electrons distributed on surfaces. Such properties are the result of fine aggregations of gold atoms protected with biomolecules such as proteins, DNA strands, and peptides rich in cysteine residues. Interestingly, we design peptides homologous to the conservative domain of lectins, which can recognize glycoconjugates from Leishmania. Peptides were synthesized by multiple solid-phase syntheses using fmoc group methodology in an acid medium. Finally, the peptide was purified by HPLC. The molecular mass of this peptide was confirmed by MALDI-TOF and to verify the α -helix structure we use Circular Dichroism. In this work, we described an easy and fast sonication method for the synthesis of AuNC with 3.0 nm of hydrodynamic size and photoemission at 638 nm using the synthetic peptide PepHLec2854 as a template. Interactions between the peptide and gold nanoclusters were confirmed by X-ray Photoemission and Raman Spectroscopy. Notably, from the ultrafine spectra shown in the MALDI-TOF analysis. Finally, we evaluated the AuNC@PepHLec2854 as an optical biosensor based on fluorescence spectroscopy and the fluorescence signal of sAP and PPG. We observed the enhanced fluorescence in presence of sAP proportional to the concentration. This can suggest that there is a strong interaction between sAP and AuNC@PepHLec2854, therefore, the increase of the fluorescence intensity can be related to the association mechanism that takes place when the target molecule is sensing by the AuNC@PepHLec2854. This study is the first step towards the fabrication of an optical biosensor based on AuNC functionalized with synthetic peptides for sensing biomolecules such as acid phosphatase and proteophosphoglycans which are secreted in abundance by parasites Leishmania.

* Doctoral Thesis

** Science Faculty. Chemistry school. Doctoral in Chemistry. Director: Enrique Mejía Ospino. PhD in Chemistry. Director: John Castillo León. PhD in Chemistry. Codirector: Rafael Cabanzo. Msc in Physic.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Introducción

Las leishmaniasis es un conjunto de enfermedades parasitarias causadas por parásitos del género *Leishmania* contraídos tras la picadura flebótomos hembras infectados, la cual está ampliamente distribuida en regiones tropicales del África Oriental, Mediterráneo, Asia Central, Brasil y Colombia, estimándose que alrededor de 12 millones personas se encuentran infectadas, de los cuales entre 20.000 a 30.000 son fatales, por lo cual es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad con un alto índice de morbilidad y mortalidad. Estas afecciones inciden principalmente en poblaciones rurales, con problemas de malnutrición y pacientes inmunosuprimidos. La epidemiología de la leishmaniasis depende de la especie del parásito, de los flebótomos transmisores, de las características ecológicas donde se transmite y del sistema inmunitario de la población. Los síntomas más comunes son la aparición de úlceras a nivel cutáneo y en mucosas, inflamación del hígado y el bazo, entre otras afecciones sistémicas que resultan fatales (Elmahallawy et al., 2014). Los tratamientos terapéuticos existentes son muy agresivos y con baja eficiencia, por lo cual la prevención y control de las leishmaniasis depende exclusivamente de un diagnóstico oportuno. Actualmente, la detección del parásito tiene lugar por observación en el microscopio del cultivo celular de muestras extraídas desde biopsias del hígado, ganglios linfáticos, úlceras y tejido cutáneo con un 60-85% de sensibilidad; sin embargo, este tipo de muestreo se asocia a hemorragias fatales, procedimientos tediosos y dolorosos para los pacientes (Nogueira & Teófilo, 2012). Otros métodos con mayor sensibilidad (90-98%) se basan en la detección de antígenos y proteínas expresados empleando por pruebas de ELISA, PCR y Western Blot, los cuales son muy costosos, el tiempo de tratamiento de la muestra tarda entre dos y tres semanas y en algunos casos tienen

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

lugar la detección cruzada con otras enfermedades como tuberculosis, tripanosomiasis y toxoplasmosis (Aizpurúa Sánchez, 2010; de Paiva Cavalcanti, Felinto de Brito, de Souza, de Miranda Gomes, & Abath, 2009; Fonseca, Capó de Paz, López, & Gutierrez, 2011).

En la última década, el avance científico ha permitido la creación y desarrollo de nuevos métodos de detección basados en biosensores. La inclusión de nanoestructuras en este tipo de sistemas ha brindado niveles de detección más bajos, mayor especificidad y accesibilidad a dianas biológicas antes improbables (Ligler, 2009; Luna, Oliveira, Nogueira, & Andrade, 2014; Narla, Pinnamaneni, Nie, Li, & Sun, 2014; Yijia Wang, Bai, Wen, Zhang, & Wang, 2015). Como resultado del direccionamiento y la funcionalización de la superficie de estas nanoestructuras en su mayoría metálicas, se ha logrado reconocer virus, células cancerígenas, y microorganismos patógenos, así como la detección un gran número de moléculas secretadas por dichos agentes durante la infección.

El uso de diferentes técnicas espectroscópicas y electroquímicas ha permitido construir sensores para detectar cambios en el ambiente químico producto de la interacción target -nanoestructura a través de la señal espectroscópica o electroquímica medida en instrumentos analíticos (J. Huang, Gao, Jia, Kim, & Li, 2014; Yuanyuang Li, Schluesener, & Xu, 2010; Ligler, 2009; J. M. Liu, Chen, & Yan, 2013). Sin embargo, en cuanto a la leishmaniasis los estudios en biosensores siguen siendo escasos, la mayoría de ellos de tipo electroquímico por medidas de impedancia electroquímica y por uso de electrodos de vidrio recubiertos de nanopartículas metálicas, Por lo tanto, es necesario que los ambientes sean oxido-reductores (Yijia Wang et al., 2015). Recientes estudios han demostrado que las propiedades foto-luminiscentes de nanopartículas (NPs), nanocluster (NCs) y puntos cuánticos (QDs) metálicos pueden ser modificadas (intensificación o apagamiento) por la

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

interacción con otros metales, anticuerpos, proteínas, fosfolípidos y otras biomoléculas (Wei, Lu, Chen, & Chen, 2011b; Lei Zhang et al., 2012; Y. Zhang, Jiang, & Wang, 2015). Esta modificación superficial de las NPs puede ser medida empleando espectroscopía de fluorescencia que puede alcanzar niveles de detección a concentraciones cercanas a 10^{-8} g/mL (Ray, Szymanski, & Lakowicz, 2009).

En esta tesis doctoral, se diseñaron y sintetizaron dos sistemas nanoestructurados fotoluminiscentes basado en péptidos sintéticos y nanoclusteres de oro (AuNCs) para el biosensado de fosfatasa ácida (sAP) y proteofosfoglicanos (PPG) secretados por parásitos del género *Leishmania*. La detección de estas moléculas fue posible debido a los cambios generados en la señal de fluorescencia generada por la interacción entre el target y la nanoestructura que permitió la detección del parásito en suero sanguíneo de ratón infectado, empleando espectroscopia de fluorescencia. Con el fin de otorgar especificidad en el sistema de detección, los AuNC fueron obtenidos a partir de los péptidos homólogos a las lectinas lo cual les confirió la capacidad de reconocer los targets seleccionados en este estudio con niveles de mínimos de detección en el rango nanomolar.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

1. Generalidades: Antecedentes, Diagnóstico y Detección de la Leishmaniasis

Las leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por un protozoo del género de *Leishmania*, transmitida por la picadura de insectos dípteros denominados *Phlebotomus* originarios de África, Asia y por el género *Lutzomyia* en América del sur y América central. *Leishmania* es un protozoo flagelado de la familia *trypanosomatidae* en la cual existen más de 30 especies de las cuales 25 son capaces de causar leishmaniasis en el ser humano (Savoia, 2015).

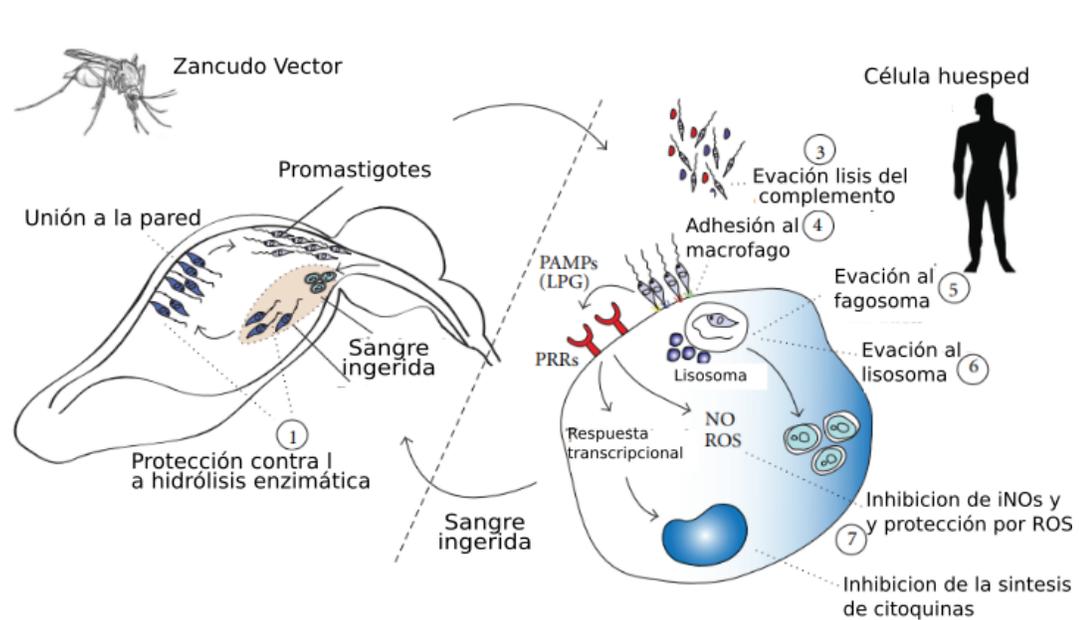
La figura 1, muestra las dos formas morfológicas principales del ciclo de vida de los parásitos *Leishmania*: **i)** promastigote flagelado, que se replican y desarrolla en el intestino del vector flebótomo, y el **ii)** amastigotes redondeado, que viven y se multiplican dentro de los macrófagos del hospedador vertebrado. El establecimiento de la infección comienza con la inoculación de promastigote metacíclico durante la picadura del vector en el hospedador vertebrado. Desde el sitio de la herida, los parásitos encuentran una variedad de células tipos que incluyen neutrófilos, células de Langerhans y dendríticas, queratinocitos y macrófagos tisulares los cuales tienen como propósito ser la célula anfitriona de "primer contacto".

En última instancia, las formas metacíclicas de parásitos se internalizan y diferencian intracelularmente para dar lugar a la forma de amastigotes que se multiplican dentro de las vacuolas del macrófago, y finalmente se liberan después de la lisis, diseminándose a otras células no infectadas.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 1.

Ciclo de vida de los parásitos del género Leishmania tras la infección por picadura de un mosquito flebótomo portador de los promastigote en su tracto digestivo.



Nota. Adaptado al traducir las leyendas al idioma español desde Luis H. Franco y colaboradores (Franco, Beverley, & Zamboni, 2012).

La leishmaniasis es una zoonosis que afectan a los seres humanos y otros mamíferos en las regiones tropicales y subtropicales de la cual se conocen tres formas de la enfermedad: Leishmaniasis Cutánea (LC), Leishmaniasis Mucocutánea (LM) y Leishmaniasis Visceral (LV) y su aparición depende de la especie del parásito que se contrae. Es una de las enfermedades infecciosas de mayor incidencia en las regiones tropicales de Suramérica, África y Asia Central afectando a cerca de 98 países de acuerdo con la distribución de su vector de propagación que tras la picadura introducen los parásitos de *Leishmania spp* infectando los macrófagos del huésped (Bejarano et al., 2015). Según cifras de la OMS, se presentan 12 mil millones de casos de infección, sumado a los casos asintomáticos no reportados. Las lesiones tras la infección son de tipo cutánea, mucosa y visceral cuyo periodo de incubación varía para cada caso. La leishmaniasis

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

cutánea comprende un periodo entre 3-6 semanas después de la picadura y tiene la incidencia más alta en la población mundial con cerca de 1 millón de casos anuales, siendo Colombia y Brasil los países en Latinoamérica con mayor incidencia. Este tipo de leishmaniasis puede evolucionar a una leishmaniasis mucocutánea o cicatrizar ya sea espontáneamente o como respuesta a un tratamiento (Scott & Novais, 2016). Para la leishmaniasis visceral a la cual se le atribuyen los 300.000 casos restantes, tiene mayor índice de mortalidad y su periodo de incubación varía de 3-9 meses, afectando principalmente a países como Bangladesh, Brasil, India y Sudán (Alvar et al., 2012; WHO, 2015).

La susceptibilidad a la leishmaniasis es general y el factor más importante en la inmunidad es la aparición de una respuesta celular adecuada y rápida, la cual no es favorecida considerando que la población sobre la cual prevalece esta enfermedad se encuentra en zonas rurales y son poblaciones sin cubrimiento total de necesidades básicas como salud y alimentación. Los reservorios involucrados en la transmisión y la diseminación de la enfermedad incluyen a mamíferos silvestres como osos perezosos, osos hormigueros, rata silvestre y animales domésticos como el perro e incluso el hombre que actúa como foco de contagio. La movilidad y migración de individuos infectados hacia las ciudades ha contribuido al aumento de los nuevos casos y a la aparición de especies de *Leishmania* consideradas silvestres en las ciudades. En Colombia, no existe un registro ni control estricto de la enfermedad pese a su importancia global. La deficiencia en el diagnóstico y detección antes de la aparición de los síntomas más severos dificultan el acceso al tratamientos adecuado y oportuno, esto sumado a que la especie involucrada en

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

la infección determina el tipo de leishmaniasis desarrollada convirtiéndose esta enfermedad en un problema de salud pública (Salud, 2006; Zambrano-Hernandez et al., 2015).

1.1 Antecedentes en la Detección y Diagnóstico de Leishmaniasis

Hasta la fecha, no existe una vacuna disponible contra la leishmaniasis. Sin embargo, un estudio reciente predijo la estructura 3D de una vacuna candidata contra LV causada por *Leishmania donovani* basada en VC1/C2 modelada usando dinámica molecular acoplada a receptores TLR-2 y TLR-4 (Singh, Pritam, Banerjee, Singh, & Singh, 2020). Por tanto, un diagnóstico precoz y preciso de la enfermedad es fundamental para la administración oportuna del tratamiento y la reducción de la carga infecciosa (Can et al., 2016; Savoia, 2015). Es importante destacar que, debido a la distribución geográfica y sociológica de la incidencia de leishmaniasis, es esencial desarrollar nuevas pruebas de diagnóstico que puedan implementarse como dispositivos de punto de atención (POC) y aplicarse para análisis de detección de rutina (Ashrafmansouri, Sarkari, Hatam, Habibi, & Abdolahi Khabisi, 2015; Soler, Huertas, & Lechuga, 2019). El amplio espectro de manifestaciones clínicas de la LC complica su diagnóstico oportuno. Actualmente, los métodos estándar para el diagnóstico de LC incluyen la microscopía y el cultivo microbiológico del parásito, los cuales requieren laboratorios centralizados, personal altamente especializado y hasta varios días para brindar resultados concluyentes (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015a). La detección de LC mediante pruebas serológicas en sangre muestra una sensibilidad muy baja debido a una respuesta humoral deficiente del sistema inmunológico (Romero et al., 2005). Esto se debe a que el efecto inmunológico en humanos es inducido por la forma del parásito amastigote (fase reproductiva) y no por el promastigote (fase infecciosa), que infecta las células macrófagas inmediatamente después del contagio (Soulat & Bogdan, 2017). También se han desarrollado ensayos clínicos dirigidos a secuencias génicas del parásito mediante la técnica de

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como pruebas inmunoquímicas dirigidas a antígenos de la membrana celular, como Kalazar Detect e IT-LEISH para VL, basados en la proteína recombinante de *Leishmania*. K39 y prueba cutánea de Montenegro (MTS) para LC (Herrera et al., 2019; Reiter-Owona et al., 2016). Otros candidatos para la detección de leishmaniasis son las glicoproteínas de membrana gp63, gp70 y gp72 que son específicas del género *Leishmania* y han mejorado la sensibilidad y especificidad de las pruebas ELISA (Ibarra-Meneses, Moreno, & Carrillo, 2020). En la Tabla 1, se muestran los métodos disponibles para la detección de leishmaniasis, la mayoría de ellos de tipo serológicas e inmunohistoquímicas.

Tabla 1.

Métodos clínicos para la detección de Leishmaniasis.

Ensayo	% Sensibilidad	% Selectividad	Ventajas	Desventaja
Anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA) (Can et al., 2016; Sarkari, Ashrafmansouri, Hatam, Habibi, & Khabisi, 2014)	80-95	77-99	Aplicable en infección temprana e indetectable 9-8 meses de superada.	Preparación exhaustiva de la muestras y equipo sofisticado
ELISA (Elmahallawy et al., 2014; Reiter-Owona et al., 2016; Sarkari et al., 2014)	80-95	70-90	Usada como prueba preliminar. Procesamiento de varias muestras	Respuesta cruzada con otras enfermedades como tuberculosis, trypanosomiasis y toxoplasmosis.
KATex (Hatam, Ghatee, Hossini, & Sarkari, 2009; Júnior et al., 2015)	47-95	82-100	Muestras de fácil acceso	Aplicado solo para antígenos presentes en orina para LV

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Western Blot (Ashrafmansouri et al., 2015)	90-98	98-100	Respuesta a diferentes antígenos de <i>Leishmania</i>	Elevado costo y tiempo en el tratamiento de muestra. Equipamiento sofisticado.
Test de aglutinación directa (DAT) (Hatam et al., 2009)	85-100	91-100	Test rápido	Costoso, Dificilmente aplicable en zonas endémicas por la inestabilidad del antígeno

Como se muestra en la tabla, los métodos clínicos para la detección del parásito se basan principalmente la producción de anticuerpos que el parásito induce por diferentes mecanismos de la respuesta inmunitaria del huésped (Franco et al., 2012). Adicionalmente, las técnicas de inmunoensayo y PCR disponibles para la detección de anticuerpos y ADN respectivamente representan un alto costo, tiempos de análisis largos y un pretratamiento exhaustivo de las muestras por lo cual no se dificulta su aplicación a volúmenes grandes de la población bajo riesgo y sospecha (Can et al., 2016; Reiter-Owona et al., 2016).

En este sentido, los componentes de la membrana celular que principalmente son lipofoglicanos (LPG) juegan un rol muy importante en la respuesta inmune y por tanto en su detección. Los disacáridos presentes en estas cadenas de glicanos son el antígeno de presentación primaria, los cuales son abundantes en la fase de promastigotes y cuya presencia varía drásticamente en los amastigotes de acuerdo con la especie de *Leishmania*. La estructura de los LPG que está conformada por el glicosilfosfatidilinositol (GPI) como molécula de anclaje seguida por una cadena fosforilada de un tetrasacárido; a este último es atribuida la actividad antigénica

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

(Forestier, Gao, & Boons, 2014; McConville, Schnur, Jaffe, & Schneider, 1995). Los tetrasacáridos contienen principalmente uniones Gal-(1→4)-Man y son de gran interés para la investigación y experimentación de posibles vacunas y sistemas de detección del parásito (Caparrós et al., 2005). Desde 2009, las investigaciones publicadas por Bárbara Padilla y colaboradores reportan el rol de las lectinas de unión a manosa (MBL de sus siglas en inglés: *Manosa binding lectin*) en la respuesta inmune frente a las enfermedades parasitarias con alta especificidad. Las MBL se unen selectivamente a la superficie de los parásitos por reconocimiento de los polisacáridos tanto en helmintos como protozoarios actuando como mediadoras de fagocitosis. De este modo, otros resultados divulgados por Santos y colaboradores mostraron que una MBL podía unirse a un carbohidrato específico de la *Leishmania braziliensis* activando la vía del complemento y que sus niveles elevados en el suero sanguíneo estaban correlacionados con el desarrollo de LV (Santos et al., 2001).

El diagnóstico de las diferentes manifestaciones de la Leishmaniasis ha avanzado paralelamente con la comprensión de los diferentes mecanismos de interacción entre las diferentes especies de parásitos con las células huésped y los procesos de señalización y respuesta inmune involucrados. El avance de las ciencias de forma interdisciplinaria ha permitido la combinación de estrategias y conocimientos de diferentes campos como la nanotecnología, la proteómica y glicómica para brindar alternativas novedosas en desarrollo de métodos diagnósticos y de detección basado en nanosensores para identificar parásitos y otros microorganismos patógenos.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

2. Diseño y síntesis de péptidos homólogos a las lectinas (PepHLec) para el reconocimiento de glicoproteínas secretadas por parásitos de Leishmania

Los péptidos homólogos son un grupo de biomoléculas obtenidas por métodos químicos desde un fragmento o región de una proteína previamente secuenciada. Los péptidos homólogos tienen un amplio interés biomédico ya que pese a ser secuencias más pequeñas que van de 9 a 25 aminoácidos pueden exhibir y conservar la función biológica por un blanco o diana biológica específica de la proteína natural (Díez et al., 2007). Esta capacidad es el resultado de un diseño racional de la estructura primaria que inicia con el conocimiento de la “relación estructura-actividad” (Q-SAR) (Bash, 2015; Brogden, 2011; Maupetit, Derreumaux, & Tufféry, 2010) implícita en los dominios o regiones conservados de polipéptidos y proteínas que están involucrados en diversos procesos biológicos como la señalización y regulación celular, la neurotransmisión y la respuesta inmune. La capacidad de estos péptidos para reconocer con alta afinidad y especificidad el blanco de interés deriva entonces en encontrar la secuencia aminoacídica mínima que contenga los residuos claves responsables del efecto biológico. Este proceso permite reducir la complejidad estructural que se tiene en una proteína natural y puede incluir una serie de modificaciones químicas, cambios o inserciones de otros aminoácidos para mejorar la estabilidad proteolítica, la reactividad, la biodisponibilidad, otorgar una conformación 2D y flexibilidad para satisfacer el ensamblaje espacial con su par molecular o reconocimiento de un *target*. El diseño racional requiere el uso de herramientas bioinformáticas y de dinámica molecular con el fin de modelar, predecir e incrementar la probabilidad de que la interacción entre el péptido sintético y las moléculas de interés.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Recientes investigaciones demuestran que el desarrollo de nuevas estrategias para la obtención de péptidos basados en Q-SAR y en estrategias bio-computacionales es indispensable tanto para la síntesis de nuevos fármacos como para el entendimiento de las vías de señalización celular y la comprensión de las interacciones de pares moleculares tipo ligando-receptor en sistemas vivos también es una estrategia efectiva y audaz para el descubrimiento de nuevos blancos biológicos en el diagnóstico de enfermedades, y la obtención de bioreceptores sintéticos en el campo de los biosensores para el reconocimiento selectivo de bacterias, hongos, células patógenas y parásitos; ya sea por detección directa o por el sensado de marcadores moleculares, metabolitos u otras moléculas asociadas a la enfermedad o infección.

En esta investigación, se obtuvo tres péptidos sintéticos con una longitud de 14-18 residuos capaces de reconocer fosfatasa ácida (sAP) y proteofosfoglicanos (PPG), dos glicoconjugados importantes durante la infección por leishmaniasis. Los péptidos diseñados con una alta homología a las lectinas lograron retener la función natural de dicha familia de proteínas para reconocer glucanos del tipo Manosa-Galactosa presente en la estructura de la sAP y el PPG blancos de este estudio.

La manosa, la galactosa y la N-glucosamina constituyen los arreglos de glicosaminoglicanos más abundantes en las glicoproteínas de la superficie celular del parásito *Leishmania* como los Lipofosfoglicanos, Proteofosfoglicanos y la fosfatasa ácida, esta última es la molécula mayoritariamente secretada por estos parásitos. Estas moléculas han sido clave en la comprensión de los mecanismos de la infección y son blanco de investigación en el desarrollo de vacunas y nuevos métodos de diagnóstico.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

El diseño de los PepHLec inició con el análisis racional para la selección de 42 secuencias de las lectinas reportadas en la base de datos del Protein Data Bank (PDB, disponible en <https://www.rcsb.org/>). Posteriormente, se emplearon las herramientas bioinformáticas como: **i)** el alineamiento básico local (BLAST) para comparar y seleccionar secuencias similares con un 90% de homología, y **ii)** el alineamiento múltiple de secuencias usando el Algoritmo del ClustalW2 (Disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para determinar y analizar los dominios y regiones conservadas en el conjunto de proteínas seleccionadas. Una vez determinados los dominios, se extrajeron secuencias con un máximo de 18 residuos aminoacídicos. Algunos de estos péptidos fueron modificados de forma racional en alguno de sus aminoácidos para mejorar la estabilidad e hidrofobicidad. Paralelamente, usando las mismas herramientas bioinformáticas se identificaron y analizaron las regiones conservadas de secuencias del PPG y la sAP provenientes de diferentes especies de *Leishmania* que han sido reportadas en la base de datos UniProt (Disponible en <https://www.uniprot.org/>).

Finalmente, se realizó un modelamiento molecular empleando los servidores CABS-DOCK y GalaxyPepDock, de libre acceso (Disponibles en: <http://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSdock> y <https://omictools.com/galaxypepdock-tool>, los cuales permitieron realizar el acoplamiento molecular basado en la optimización de la energía y la similitud de la interacción entre los PepHLec y los regiones conservadas de proteofosfoglicanos y fosfatasa ácidas secretadas. Concluido el diseño, se realizó la síntesis química de los péptidos por la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) empleando la estrategia del grupo Fmoc. Posteriormente se realizó la purificación y caracterización de dichos péptidos. En este capítulo se describen detalladamente cada uno de los pasos metodológicos y se presentan los hallazgos y resultados más importantes de esta investigación.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

2.1 Rol del sistema inmunitario en la infección por Leishmaniasis

Constantemente, el ser humano y muchas otras especies se encuentran expuesto a microorganismos y agentes exógenos, siendo el sistema inmune la primera línea de contención que discrimina los agentes potencialmente patógenos y genera una respuesta apropiada para eliminarlos sin deteriorar su propio sistema. La inmunidad se compone de: **i)** un sistema innato constituido por las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos y células dendríticas), proteínas circundantes del sistema de complemento y citoquinas, entre otras; **ii)** un sistema adaptativo, que sugiere una defensa más sofisticada y específica que brinda una memoria inmunológica, la cual induce la generación anticuerpos y linfocitos T (Aizpurúa Sánchez, 2010; de Paiva-Cavalcanti et al., 2015b). Es importante mencionar que la respuesta innata influye en la respuesta adaptativa, siendo los macrófagos y las células dendríticas las responsables de esta conexión, los cuales son los responsables de reconocer los patrones moleculares asociados a los patógenos que se encuentran presentes en las superficies de los microorganismos como bacterias, virus y parásitos. Entre estos patrones se encuentran carbohidratos, lípidos, RNA de virus, lipofosfosacárido (LPS) y glicoproteínas que desencadenan diferentes vías de señalización para iniciar la respuesta (Szöör, 2010).

La infección por *Leishmania* involucra procesos de adherencia y entrada de los promastigotes (fase infectiva) al macrófago a través de interacciones específicas con el lipofosfoglicano (LPG), la glicoproteína 63 (gp63) y los proteoglicanos (PG) presentes en la superficie del parásito, que se unen a los receptores de manosa (MR) presentes en membrana del macrófago y a los receptores de complemento (RC) (Franco et al., 2012; Rogers, 2012). Una vez fagocitados, el promastigote se transforma en amastigote (fase

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

reproductiva) y se multiplica al interior de las vacuolas de la célula huésped hasta que el macrófago no puede contener más a los parásitos y muere, liberando los amastigotes que infectarán a otros macrófagos. En este sentido, los parásitos del género *Leishmania* han desarrollado evolutivamente mecanismos de evasión al inhibir la función de los macrófagos y alterar las vías de señalización necesaria para inducir una respuesta antigénica del sistema adaptativo, disminuyendo la generación de anticuerpos como se ha observado en pacientes con leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucocutánea de acuerdo con la especie de *Leishmania* adquirida. Esto último, dificulta aún más el diagnóstico de leishmaniasis por las técnicas de inmunoensayo como ELISA y Western Blot que están basadas en la detección de anticuerpos (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015b; Romero et al., 2005).

2.2 Gliconjugados mayoritariamente secretados en la infección por *Leishmania*

Los glicoconjugados son un grupo de biomoléculas de alto peso molecular compuestas por arreglos glicosoaminoglicanos (GAGs) algunas veces fosforilados como los LPG, y otros unidos covalentemente a una proteína como es el caso de los PPG y las sAP ricas en serina y treonina. En la fase de promastigote los glicoconjugados están uniformemente distribuidos sobre las superficies del parásito conformando una barrera altamente hidrofílica con un espesor de aproximadamente 15 nm debido a la longitud de las cadenas de los polisacáridos presentes en el LPG y varios cientos de nanómetros de extensión debido a la longitud de los mPPG (T. Ilg, Stierhof, Wiese, Overath, & McConville, 1994). Estas moléculas presentan gran variabilidad y diversidad estructural y se encuentran distribuidos en la superficie celular de células animales y de microorganismos. Dada la abundancia y la variabilidad estructural de estas biomoléculas son consideradas de vital importancia en la interacción de parásito con las células del huésped. En ese caso, se ha

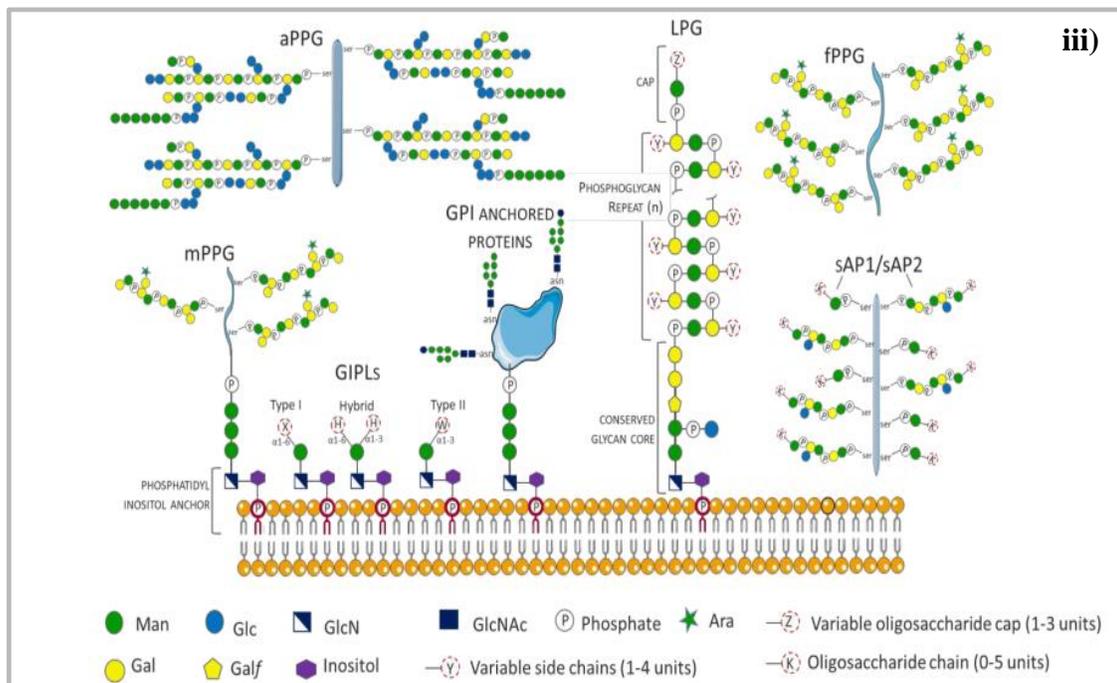
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

determinado la implicación de los LPG en múltiples procesos que favorecen la virulencia.

En la figura 2, se presentan los componentes de la membrana celular del parásito.

Figura 2

Glucosilfosfolipidos secretados por parásitos del género Leishmania durante la infección por leishmaniasis.



Nota. **i)** Fase infectiva (Promastigote). **ii)** Fase reproductiva dentro de los macrófagos (Amastigotes). mPPG: Proteofosfoglicanos transmembrana; LPG: Lipofosfoglicanos; PG: Proteoglicanos; fPPG: Proteofosfoglicanos filamentosos; sAP: Fosfatasa ácida. **iii)** Distribución de los Componentes de membrana en parásitos *Leishmania* (Merida-de-Barros, Chaves, Belmiro, & Wanderley, 2018; Monge-Maillo & López-Vélez, 2013).

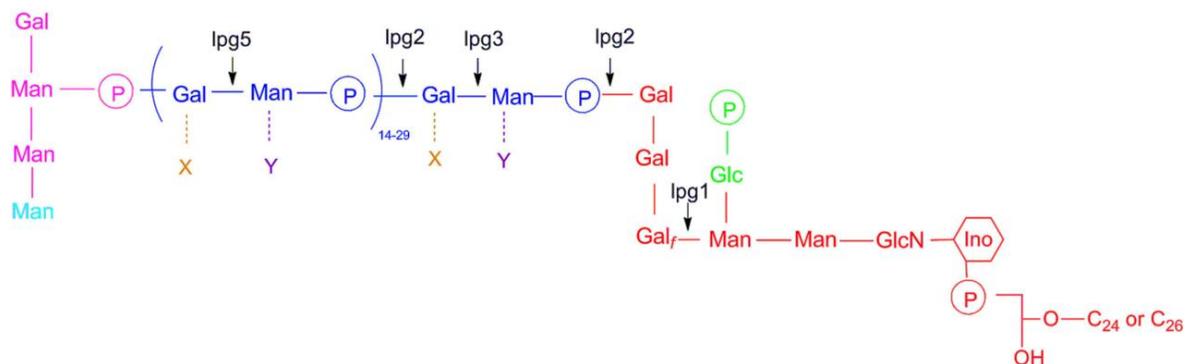
Los LPG de *Leishmania* son macromoléculas complejas compuestas por 4 dominios distintos: **i)** una cadena alifática saturada de entre C₂₄₋₂₆ anclada al glicosilfosfatidil-inositol (GPL) de la membrana con **ii)** terminaciones de di, tri y tetrasacáridos manosa-galactosa en combinaciones variadas; **iii)** un núcleo de heptasacáridos entre

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

galactopiranosas, galactofuranosas, manosidas y residuos de glucosamina unidas a inositol y iv) una cadena lineal de fosfoglicano conformada de 15-40 unidades de fosfodisacáridos del tipo (Gal β 1-4Man α 1-PO $_4$) unida al núcleo de polisacáridos (Forestier et al., 2014).

Figura 3.

Representación de la estructura del LPG de un parásito *Leishmania* con sus 4 dominios.



Nota. En Rojo: el anclaje al GPI y el núcleo de glucanos. En Azul: La cadena lineal de fosfoglicanos. En Rosado: La capa terminal de oligosacáridos (di, tri o tetra). En celeste: Residuo presente o ausente de acuerdo con la especie. X y Y representan residuos de manosa, glucosamina y galactosa variables de acuerdo con la especie.

En cuanto a los PPG de membrana, son una familia distintiva de glucoproteínas ancladas al GPI con un dominio estructural similar al del LPG. Los PPG son expresados en la superficie del parásito en su estadio de promastigote, pero en menor proporción que los LPG. El PPG más abundante y caracterizado de *Leishmania* es una glucoproteína de la membrana plasmática conocida como gp63 con una expresión de cerca de 5×10^5 copias/célula (Ejazi et al., 2018). Sorprendentemente, los cambios en los glicoconjugados de la superficie de *Leishmania* varían drásticamente en todo el ciclo de vida del parásito; en la fase reproductiva, en estadio de amastigotes dentro de la célula huésped, la expresión del LPG disminuye y en contraste los PPG son altamente expresados para permitir la supervivencia al interior del macrófago (Rogers, 2012). Es muy importante mencionar que los PPG en los amastigotes son producidas preferiblemente de forma libre y excretadas al exterior en lugar de estar asociadas a la membrana.

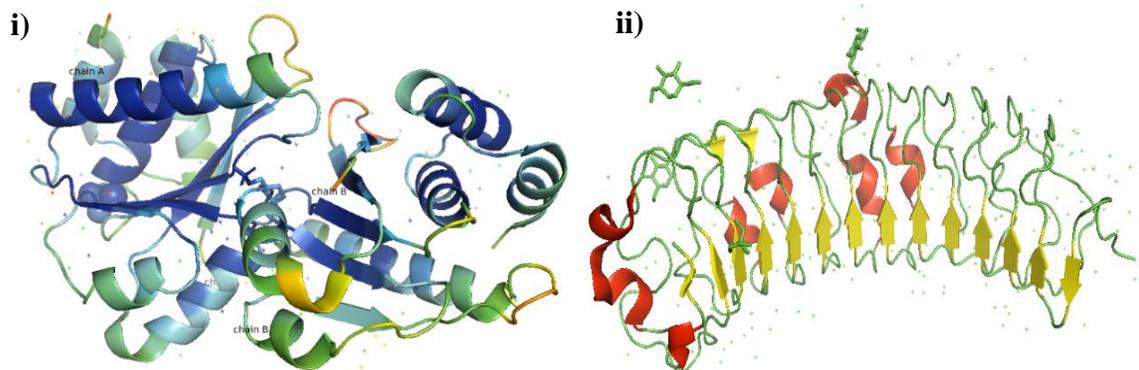
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Se ha determinado que en especies como *L. mexicana*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. donovani*, *L. major*, los PPG secretados durante estadios tempranos de la infección juegan un rol importante en la reducción de la actividad leishmanicida del macrófago ya que interactúan con proteínas de unión a manosa (MBP) y lectinas actuando como activadores de la cascada del complemento (Rogers, 2012).

Por otra parte, se ha investigado que otras glicoproteínas como las sAP del parásito interfieren drásticamente en los procesos de fosforilación durante la respuesta inmune contribuyendo a la virulencia del parásito. Dichos arreglos de carbohidratos varían significativamente de un organismo a otro, siendo los parásitos *Leishmania* propensos a producir repeticiones del tipo (Gal-Man-PO₄) predominantemente (Thomas Ilg, Demar, & Harbecke, 2001) como se observa en el modelamiento presentado en la figura 4.

Figura 4.

Visualización del modelamiento la conformación 2D predominante en las: *i*). Fosfatasas ácidas; *ii*). Proteofosfoglicanos cuyas estructuras fueron extraídas de la Protein Data Bank con códigos ID 2SO4 y 1XKU respectivamente usando el software Pymol



2.3 Familia de proteínas de las Lectinas

Las lectinas constituyen una familia de glicoproteínas no inmunológicas cuya función es unirse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sea de forma libre o

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

presentes en estructuras más complejas (Andrade & Saraiva, 1999; Ielasi et al., 2016). Estas proteínas constituyen un grupo muy importante de proteínas con un interés que va en aumento debido a que participan en procesos relacionados con la respuesta inmune e inmunosupresión en enfermedades parasitarias, SIDA y tuberculosis; y están involucradas en la efectividad de terapias antivirales en pacientes con VIH. Las lectinas de unión a manosa (MBL), son lectinas séricas de cadenas múltiples que tiene un rol importante en la inmunidad innata. Estas proteínas son un objetivo molecular a la hora de modificar o frenar la progresión de la leishmaniasis debido a su posible efecto potenciador sobre las infecciones con patógenos intracelulares como *Leishmania* (Aizpurúa Sánchez, 2010; Santos et al., 2001). Las MBL se unen a los carbohidratos presentes en muchos patógenos, incluida *Leishmania* actuando como opsonina y “ante-anticuerpo” para otorgando protección antes del establecimiento de adaptaciones a la respuesta inmune (Padilla-Docal, Dorta-Contreras, Bu-Coifui, & Callol-Barroso, 2009).

2.4 Estrategias bioinformáticas y de métodos computacionales para el diseño de secuencias peptídicas basadas en proteínas.

La bioinformática es un área emergente que ha sido aplicada en múltiples disciplinas y ciencias básicas porque permite la recopilación, almacenamiento, organización, análisis y distribución de información relativa a datos y procesos biológicos que involucran a macromoléculas como DNA, ARN y proteínas. La aplicación de dichas herramientas requiere el conocimiento previo de las secuencias de las macromoléculas, la filogenética e identificación de genes codificantes y el manejo de algoritmos bajo parámetros específicos que permitan entender y analizar la relación entre la estructura y la función de dichas macromoléculas. A través de estrategias bioinformáticas se ha logrado elucidar nuevas proteínas tanto estructural como secuencialmente usando como plantilla otras proteínas conocidas, diseñar y descubrir nuevos

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

medicamentos, alinear secuencias para estudios comparativos, predicción de conformaciones espaciales de las proteínas, detección temprana de enfermedades por el análisis de marcadores genéticos y moleculares, y en el diseño de péptidos más pequeños que mantengan la funcionalidad biológica de muchas proteínas para poder ser obtenidos por medios químicos y satisfacer una aplicación inmediata en diferentes campos de la bioquímica y la medicina. Todo esto se ha hecho posible gracias a la creación y alimentación continua de bases de datos que almacena la información, y permiten la manipulación por parte de los usuarios alrededor del mundo; estas bases de datos están asociadas a softwares y algoritmos informáticos para analizar y organizar la información. Estas bases de datos pueden ser clasificadas en: i) Primarias o también llamadas bases de Almacenamiento que contienen los datos derivados de la experimentación subida por los investigadores, tales como secuencias de nucleótidos y proteínas, ejemplos de estas son la *GenBank* que contiene información genética de diferentes especies, la *Protein Data Bank* (PDB) que contiene las secuencias aminoácidos y estructuras tridimensionales de proteínas y glucoproteínas. ii) Secundarias, que incluyen resultados de análisis de los datos contenidos en las bases primarias, están altamente depuradas y comprenden una combinación de múltiples algoritmos para interpretar y obtener nuevos datos de carácter público como *InterPro* donde se almacenan familias de proteínas con sus dominios y motivos ya determinados; UniProt Knowledgebase que contiene información secuencial y funcional de proteínas; *EnsEMBL* que almacena variantes, funciones de regulación y focalización de secuencias de genomas completos, entre otras.

2.4.1 Herramientas y algoritmos aplicados al análisis secuencial

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

La búsqueda y análisis de la similitud en las secuencias de proteínas es el primer paso para identificar secuencias homologas en cualquier análisis de proteínas. La homología se define como el grado de coincidencia/similitud de la secuencia de aminoácidos de dos o más debido a un mismo origen evolutivo (Waterhouse et al., 2018). En este sentido, el uso de programas y algoritmos que lleven a cabo esta búsqueda de identidades o discrepancias rápidamente, es imprescindible y se hace necesario alinear las secuencias de modo que se pueda realizar una comparación y resaltar las regiones similares, las cuales podrían indicar una relación funcional o evolutiva entre las proteínas analizadas (Kelsey C. Martin Mhatre V. Ho, 2012). En estos alineamientos, las secuencias se describen con las letras que corresponden al código alfabético de los aminoácidos que las constituyen como se ejemplifica en la figura 5.

Figura 5

Alineamiento de secuencias de proteínas identificadas como AAB24882 y AAB24881

```

AAB24882      TYHMCQFHCRVYVNNHSGEKLYECNERSKAFSCPSHLQCHKRRQIGEKTHEHNQCGKAFPT 60
AAB24881      -----YECNQC GKAF AQHSSLKCHYRTHIGEKPYECNQC GKAFSK 40
                **** :  *** :  * * : ** * : **** . : * ***** . .

AAB24882      PSHLQYHERTHTGKPYECHQCQAFKCSLLQRHKRTHHTGKPYE-CNQC GKAF AQ- 116
AAB24881      HSHLQCHKRTHHTGKPYECNQC GKAF SQHGLLQRHKRTHHTGKPYMNVINMVKPLHNS 98
                **** * : ***** : **** : * : . ***** : * : :

```

Nota. Las secuencias fueron extraídas de la base de datos GeneBank.

En este alineamiento de dos secuencias (AAB24882 y AAB24881) se observa que en las filas de la matriz se insertan espacios para que las zonas similares se alineen de forma paralela guardando la misma posición. Si las dos proteínas provienen de un ancestro común, los aminoácidos no coincidentes pueden interpretarse como mutaciones o sustituciones y los espacios como inserción o deleciones derivadas de mutaciones evolutivas cada uno de los linajes que conllevó a la divergencia. Los aminoácidos similares y las sustituciones de aminoácidos con propiedades química similares en una región de la secuencia indican que dicha región tiene

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

importancia estructural y/o biológica funcional. Cuando las secuencias son cortas se pueden alinear manualmente como es el caso de péptidos de menos de 50 residuos, sin embargo, para las proteínas se tienen secuencias extremadamente largas y variadas lo cual es una tarea manual muy extenuante y que requiere mayor experticia y tiempo por parte del usuario. De este modo, el conocimiento ha sido aplicado a la construcción de algoritmos que produzcan alineamientos de alta calidad y en menor tiempo. Estos alineamientos se dividen en tres categorías: **i)** Alineamiento global, que consiste en alinear las secuencias de interés en la totalidad de su longitud; por lo cual es una estrategia usada cuando las proteínas son similares y aproximadamente del mismo tamaño. **ii)** Alineamiento local, se emplea para identificar regiones en dos secuencias muy largas con una amplia divergencia. **iii)** Alineamiento múltiple, es una extensión de los alineamientos anteriores donde se incorporan más de dos secuencias al mismo tiempo y se emplea para la identificación de regiones conservadas en un conjunto de secuencias que evolutiva están relacionadas (Gao, Sherman, Luo, Bowie, & Zhu, 2009; Pearson, 2013; Yun Wang et al., 2019). Dichas regiones conservadas son utilizadas para construir árboles filogenéticos, para localizar sitios activos catalíticos, sitios de reconocimiento celular y molecular en familias de proteínas y para determinar la relación entre función-estructura (Afzelius et al., 2001). En general, estos algoritmos empleados para el alineamiento suelen estar albergados en la misma base de datos y cuando son ejecutados se asigna una puntuación a las coincidencia de aminoácidos y una penalización a los huecos incluidos para mejorar la coincidencia por lo cual estos análisis secuenciales arrojan una puntuación (*score*) que está relaciona la calidad del alineamiento y la homología entre las secuencias (Madeira et al., 2019). Entre los algoritmos mayoritariamente empleados se encuentran el BLAST, SPI-BLAST,

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

CLUSTAL W, PFMFind, entre otros (Camacho et al., 2009; Larkin et al., 2007; Stheven Altschul, Thomas Madden, Alejandro Schaffer, Jinghui Zhang, Aheng Zhang, Webb Miller, 1997; Stojmirović, Andreae, Boland, Jordan, & Pestov, 2013)

Por otra parte, para poder comprender la estructura, la función y los procesos biológicos se ha hecho necesario el uso de los métodos teóricos como simulaciones y modelamientos que complementen los resultados experimentales. La secuenciación y elucidación una única estructura en una biomolécula no da información del movimiento espacial o de las interacciones que tienen lugar con otras moléculas ligando en un proceso determinado. En consecuencia, la simulaciones de Dinámica Molecular (MD) han sido empleadas para la comprensión de dichas interacciones entre las macromoléculas y los ligandos que no pueden ser observadas y estudiadas por los métodos espectroscópicos debido a la complejidad de las señales y datos obtenidos, y por el intervalo de tiempo en que transcurren y se alcanza el equilibrio, generalmente en el rango de los nanosegundos (Bueren-Calabuig, 2014). En este sentido, los datos computacionales pueden ser analizados con mayor claridad haciendo uso de métodos estadísticos y otras herramientas computacionales de procesamiento para ayudar a predecir resultados experimentales de forma confiable lo cual finalmente se traduce en ahorro de recursos necesarios en la experimentación y el tratamiento de los desechos generados. La MD consisten en la resolución de ecuaciones de movimiento de los componentes de un sistema a lo largo del tiempo, que en el caso de las biomoléculas a groso modo, se refiere a la secuencia primaria de aminoácidos en una posición inicial y que dada la flexibilidad de su estructura esta puede tomar un número de poses que finalmente conforman lo que se conoce como “trayectoria del sistema” y que estará relacionada con la energía del sistema (Herrera-Nieto, Pérez, & De Fabritiis, 2020). Como ejemplo, se puede considerar la elucidación de la estructura secundaria de una proteína donde se toman los

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

aminoácidos como componentes fundamentales y se usa la interacción posible entre ellos para dar origen a las conformaciones posibles y finalmente la trayectoria. Para mayor nivel de precisión, esta misma simulación pueden tomarse los átomos en cada aminoácido, y así sucesivamente para lograr ultra precisión a nivel cuántico se llega a considerar el movimiento de los electrones en el sistema de interés; teniendo presente la que el costo computacional es proporcional al tamaño del sistema estudiado y a la precisión (Mollica et al., 2012).

La MD es usada en el modelamiento de proteínas a partir de su secuencia, en la simulación de su dinámica bajo parámetros de temperatura, presión y concentraciones dadas, en el análisis de trayectorias en función de la estabilidad en solventes diferentes, y para analizar las interacciones que tienen lugar con diferentes ligandos, en la búsqueda de nuevos fármacos, y para la comprensión del reconocimiento molecular y celular que tiene lugar en los diferentes procesos biológicos (Tuckerman & Martyna, 2000). Los resultados de dichas simulaciones permiten obtener estructuras que minimizan la energía del sistema, lo cual se ve reflejado en la optimización de la geometría y distribución espacial, arroja valores de la energía libre debidos a cambios conformacionales durante la inserción de ligandos en un receptor, diferencia cada una de las energía libres asociadas a un cambio estructural, permiten modelar el paso de las moléculas a través de las membranas (Cheng, Benson, Rivera, & Kuczera, 2006; General, Dragomirova, & Meirovitch, 2011; La, Biggin, Tieleman, & Sansom, 1999; Pedone et al., 2005; Senthilkumar et al., 2016).

Un estudio recientemente publicado muestra los resultados obtenidos en el diseño de una vacuna contra la leishmaniasis visceral con una cobertura del 99.4 % de la población. La estructura 3D fue predicha por la combinación de un análisis de la homología

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

de los eptopes clase I y II de proteínas antigénicas secretadas por *L. donovanni* y métodos de dinámica, y acoplamiento molecular usando el los servidores del PathDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) y ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/home.php>) (Singh et al., 2020).

2.5 Afinidad y Parámetros Cinéticos en la Interacción de Pares Moleculares (PepHLec-Target) Determinado por Resonancia Plasmónica Superficial (SPR)

La técnica SPR juega un papel destacado en la caracterización de interacciones biomoleculares debido a su capacidad para detectar y monitorear eventos de unión molecular en tiempo real sin el uso de etiquetas. Se empleó un montaje de SPR hecho por el grupo de la profesora Laura Lechuga en el NanoB2A del ICN2 (Peláez et al., 2018) que funciona con una configuración de *Kretschmann* para el análisis y la determinación de las afinidades de unión y los parámetros cinéticos de las interacciones entre las proteínas diana y los nuevos péptidos (Roy et al., 2019; Sparks, Jenkins, & Fratti, 2019).

El principio de funcionamiento del sensado por SPR se basa en la alta sensibilidad de un campo plasmónico evanescente generado en la interfaz de una capa metálica nanométrica (es decir, 50 nm de oro) y el medio dieléctrico cuando la luz incide en un ángulo específico. Es una técnica espectroscópica que estudia las oscilaciones colectivas de los electrones localizados y confinados en una superficie metálica ultra-delgada o en una nanopartícula, como resultado de su interacción con la radiación; a dicho fenómeno se le conoce como “plasmón resonante” (Soler, Estevez, Moreno, Cebolla, & Lechuga, 2016). Estos plasmones superficiales tienen un campo electromagnético superficial evanescente asociado que presenta su máxima intensidad en la superficie y decae hacia el interior del dieléctrico de acuerdo con la longitud de onda del campo incidente, de las propiedades ópticas del metal y de los cambios en el índice de refracción efectivo

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

del medio en contacto con el metal. Esta dependencia de las condiciones de excitación de los plasmones ha permitido que esta técnica sea empleada para detectar cambios superficiales en una interfase, así como determinar las cinéticas de absorción en función del índice de refracción en tiempo real.

Una de las ventajas más notables de SPR es que no requiere el marcaje del target por lo cual es ampliamente utilizada en el desarrollo de biosensores. La estrategia utilizada fue la formación del acoplamiento de amina covalente entre la N-hidroxisuccinimida (activada por el grupo NHS) de una monocapa autoensamblada (SAM) de alcanotiol y el grupo amina primaria presente en cada cadena peptídica (Monfregola, Vitale, Amodio, & De Luca, 2009). Para facilitar la distribución homogénea de la monocapa de péptido en la superficie y minimizar los problemas de impedimento estérico, se utilizaron alcanetioles hidroxilados como espaciador lateral en el SAM.

2.6 Síntesis química de péptidos

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) es en la actualidad uno de los métodos más sencillos y eficientes para obtener secuencias peptídicas de hasta 50 aminoácidos, disminuyendo el rendimiento de síntesis en la medida que aumenta el número de residuos. Esta metodología descrita inicialmente por Merrifield se basa en el anclaje de un aminoácido desde su extremo C-terminal a los sitios activos de un soporte polimérico inerte al medio de reacción (Merrifield, 1997). Dentro de los soportes o resinas más comunes se encuentran la 4-metilbencilhidrilamina (MBHA) y la hidroximetilfenilacetamidometil (PAM). El crecimiento de la cadena se lleva a cabo adicionando uno a uno los aminoácidos correspondientes. La elongación de la cadena tiene lugar desde el extremo C-terminal al N-terminal, siendo la adición del siguiente aminoácido sobre el grupo α -amino del residuo

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

previamente enlazado (Williams, 1997). Los aminoácidos se encuentran debidamente protegidos en sus cadenas laterales para asegurar la formación del enlace peptídico evitando posibles productos secundarios.

Esta síntesis cuenta con dos estrategias diferentes, una de ellas emplea el *ter*butoxi-carbonil y benzil (Boc/Bzl) como protectores de grupo α -amino y de cadenas laterales respectivamente. Y en la segunda se usan los grupos: 9-fluorometoxicarbonil (FMoc) como grupo protector del α -amino y *terc*-butil (tBu) como protector de cadenas laterales. En ambos casos el grupo protector del α -amino se elimina antes de unir el siguiente aminoácido. La estrategia Boc/Bzl se lleva a cabo en medio ácido mientras que la FMoc/tBu se realiza en medio básico (Andreu, 1994; Navarrete, 2007).

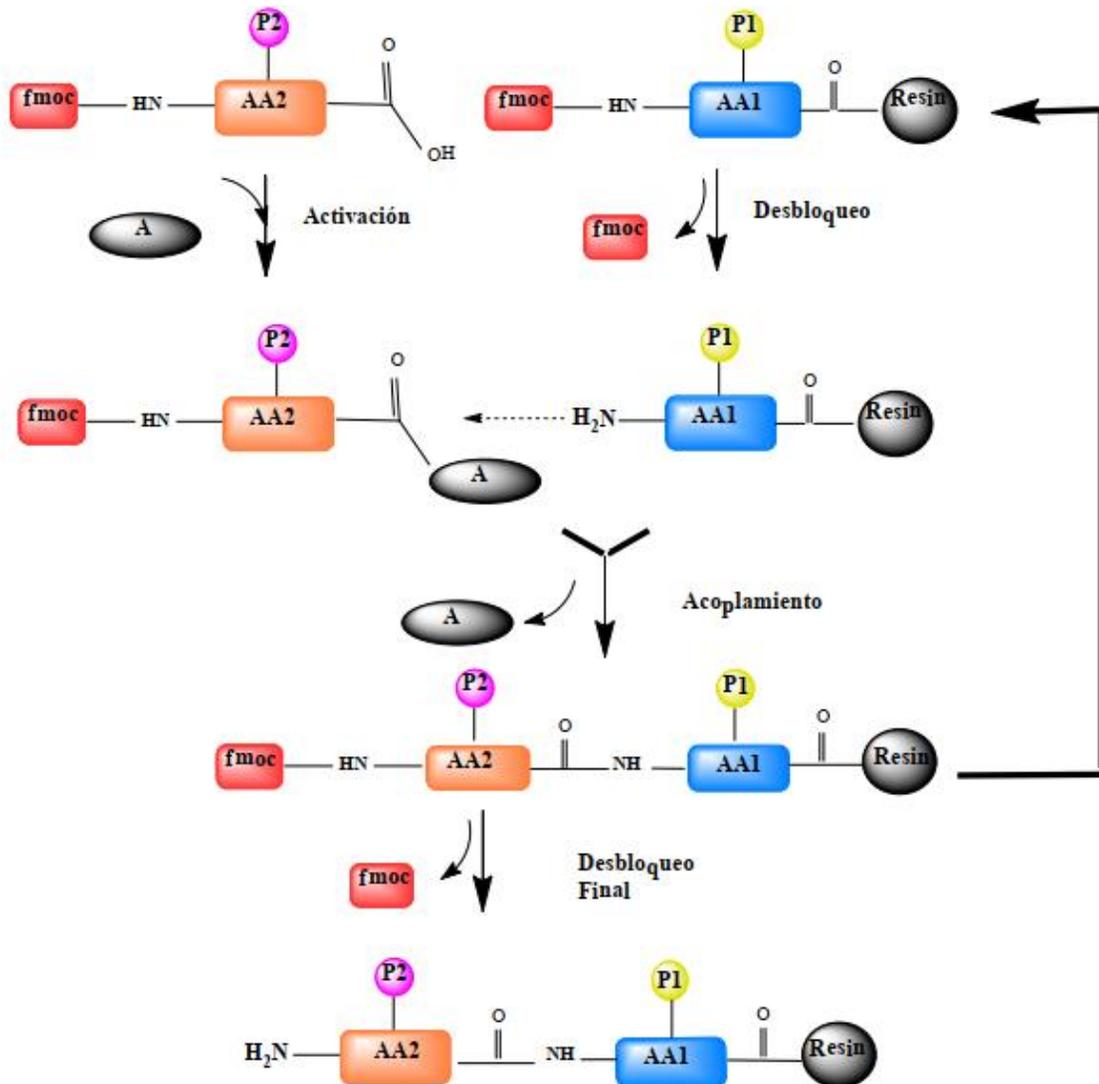
Para la formación del enlace peptídico se requiere la previa activación del grupo α -carboxilo que se adicionara a la cadena, distinguiéndose así diferentes aditivos para el acoplamiento como la *N,N*-diciclohexilcarbodimida (DCC) que es quizás el agente activador más empleado, seguido de la *N,N*-diisopropilamina (DIPEA).

Por otra parte, se distinguen otros grupos de reactivos que son adicionados durante el acoplamiento, generalmente benzotriazoles como: el tetrafluoroborato de *O*-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (TBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), hexafluorofosfato de *O*-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU) y el 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HoAT), que se usan para evitar la racemización y acelerar la reacción al convertir al carboxilato formado una especie altamente reactiva (Jones, 2002; Albericio, 1997). Una vez concluida la síntesis del péptido de interés se procede a desanclar el péptido desde la resina y a eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales; esto se lleva a cabo en un mismo paso realizando una hidrólisis ácida. En la figura 6 se presenta el esquema general de la síntesis de péptidos en fase sólida.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 6

Esquema de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS) por la estrategia del grupo FMoc empleada en la síntesis de los PepHLec.



Nota. Tomado de Jenniffer Cruz (Cruz; 2012)

Para el caso de la estrategia fmoc/tBu se emplea ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de triisopropilsilano (TIS) y 1,2-etanoditiol (EDT). Estos dos últimos reactivos se conocen como *scavengers* y cumplen la función de captar las especies generadas en la

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

desprotección, generalmente carbocationes que eventualmente pueden reaccionar con las cadenas laterales ya desprotegidas (Guzmán & Barberis, 2007).

2.7. Metodología en el diseño y síntesis de péptidos

2.7.1 Diseño bioinformático de péptidos homólogos a las lectinas

Para el diseño bioinformático se seleccionó un grupo de 15 secuencias de proteínas lectinas capaces de reconocer los glucósidos que incluyeran arreglos de Manosa-Galactosa reportadas en la base de datos abierta: Protein Data Bank disponible en la web (<https://www.rcsb.org/>). Los ID PDB de dichas proteínas son listados a continuación en la en la tabla 2 y la información de su peso molecular, numero de residuos aminoacídico y número de cadenas.

Tabla 2.

Listado del grupo de proteínas lectinas reportadas en la base de datos: Protein Data Bank usadas para diseñar la secuencia primaria de los péptidos sintéticos.

PDB ID	Cantidad de AA	PM (kDa)	N° de Cadenas
1CIW	944	102,57	1
1CQ9	944	101,22	1
1CR7	1888	203,46	1
1QF3	944	101,99	1
1RIR	944	111,55	1
2DHI	952	13,61	1
2DV9	944	102,78	1
2DVA	944	103,00	1
2DVB	944	102,52	1
2DVD	944	102,97	1
2DVF	994	101,97	1
2DVG	944	102,29	1
2DVP	944	102,59	1
2TEP	944	102,11	1

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

1BZW	928	100,57	1
------	-----	--------	---

2.7.2 Dinámica Molecular (MD)

Se utilizó el servidor CABS-Dock (<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSdock>) para estudiar la interacción proteína-péptido. Para el desempeño de la simulación dinámica, los algoritmos encontraron el sitio de unión con total flexibilidad espacial de cada uno de los péptidos y disminuyeron la fluctuación en la estructura de la proteína sin un conocimiento *a priori* del sitio de unión (Blaszczyk, Ciemny, Kolinski, Kurcinski, & Kmiecik, 2019). Para evaluar los resultados se utilizó el valor RMSD, que se define como la desviación cuadrática media de la interacción péptido-proteína (Sargsyan, Grauffel, & Lim, 2017). Para seleccionar los mejores modelos, los mapas de contacto se calcularon con un valor de distancia de corte de 4.5 Å para cada complejo péptido-target.

2.7.3 Síntesis de péptidos cortos basados en las lectinas

Las secuencias correspondientes a PepHLec2854 (HYSRTENMGTSNAC), PepHLec2855 (KTFLKICKRPYVPSEP) y PepHLec2856 (INKQGDVTVLSNGNTQLT) se sintetizaron mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) siguiendo la metodología fmoc. Brevemente, los bloques de construcción de péptidos se cargaron en resina Rink amide 4MBHA (sustitución de 0,55 mmol / g; 100 mg por bolsita de té) seguido de enlace de cadena a través del acoplamiento de L-aminoácidos protegidos con fmoc entre el residuo C-terminal y la resina (Guzmán & Barberis, 2007). Los aminoácidos se acoplaron usando una mezcla del L-aminoácido, hexafluorofosfato de O- (Benzotriazol-1-il) -N, N, N', N'-tetrametiluronio (HBTU) o, oxima y N-etildiisopropilamina (DIEA) en esta relación 5: 5: 5: 7,5 respectivamente durante más de 3 horas. Los grupos protectores

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

fmoc se eliminaron con piperidina (20% v/v en una solución de Tween 20 al 0,01% v/v). Todas las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo en dimetilformamida. Los péptidos se escindieron y los grupos protectores de la cadena lateral se eliminaron utilizando un cóctel que contenía ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano (TIS) y agua (relación 95: 2,5: 2,5). Por último, los péptidos se precipitaron con éter dietílico frío, se centrifugaron tres veces y el sedimento se disolvió en agua antes de la liofilización (Haney, Nazmi, Lau, Bolscher, & Vogel, 2009; Prada et al., 2016). Los péptidos brutos se purificaron mediante RP-HPLC en una columna preparativa Zorbax C-18 (7,0 μm ; 21,5 x 250 mm) usando un gradiente del 30% al 70% de acetonitrilo (ACN) (Mobil fase A: H₂O, 0,001% TFA y B: ACN, 0,001% TFA).

2.7.4 Purificación y caracterización de los péptidos sintéticos

2.7.4.1 Desalinización. Los péptidos fueron desalinizados empleando una columna preparada a partir de una pipeta *pasteur* previamente cargada con lana de vidrio y el gel Sephadex G10 o Sephadex G15 de acuerdo con el peso molecular de cada péptido. La columna fue equilibrada con agua desionizada durante 30 min. Aproximadamente 2.0 mg-mL⁻¹ de péptido fueron eluidos con 2.0 mL de agua y posteriormente recolectados a la salida de la columna.

2.7.4.2 Purificación en columnas C-18. Esta técnica preparativa consistió en la elución de los péptidos de acuerdo con su hidrofobicidad (afinidad) empleando una micro columna Sepack C-18 usando como eluyente una mezcla ACN/H₂O con un flujo constante. Los porcentajes de la mezcla trabajados fueron 10%, 20%, 30%, 50%, 70% y 100% v/v.

2.7.4.3 Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC). Los péptidos sintéticos fueron analizados en una columna preparativa Vydac C-18 (250mm x10mm) en fase reversa RP-HPLC con una fase móvil constituida por: (A) H₂O con 0.01% de Ácido trifluoroacético (TFA) y (B) Acetonitrilo (ACN) con 0.01% v/v TFA. Se utilizó un método isocrático 70:30 de ACN-TFA

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

y H₂O-TFA respectivamente durante 15 min; volumen de inyección 40 µL; detección UV a 220 nm. Los resultados obtenidos permitieron analizar el grado de pureza de cada uno de los péptidos sintéticos.

2.7.4.4 Espectrometría de masas. Los espectros de masas se registraron utilizando un espectrómetro MALDI TOF/TOF UltrafleXtreme (*Bruker Daltonics*). Los ensayos se llevaron a cabo por el modo de desorción/ionización láser asistida por una matriz (MALDI) con detector de tiempo de vuelo (TOF) en modo reflectrón. La matriz fue preparada con solución saturada de 1mg/mL de HCCA en una mezcla de ACN: H₂O (50:50) y 0.01% v/v TFA. En este caso, 1.0 µL de cada péptido fue dispuesto en medio de una doble capa de matriz de 1.0 µL, cada capa sobre cada spot del target y se dejaron secar para finalmente ser analizadas.

2.7.4.5 Dicroísmo circular. El análisis por dicroísmo circular se llevó a cabo a temperatura ambiente en celdas lavadas con nitrógeno y usando un espectropolarímetro Jasco J-815 del Núcleo de Biotecnología de Curauma, Valparaíso en el Laboratorio de Síntesis de Péptidos de la Dra. Fanny Guzmán Quimbayo.

Los espectros se tomaron en un intervalo de longitud de onda entre 195-240 nm usando una celda rectangular con paso óptico de 0,1mm. Cada espectro fue obtenido como un promedio de tres barridos tomados a una velocidad de 20 nm/min, con un ancho de banda espectral de 1 nm. El perfil de DC fue tomado a 200 µL de disolución acuosa del péptido a una concentración de 0.1 mM en: a) H₂O y b) 30% v/v TFE. Adicionalmente, se realizó un análisis de DC Pro empleando dos algoritmos diferentes para determinar teóricamente el porcentaje de estructuras 2D propensa en cada secuencia de péptidos.

2.7.5 Determinación de los parámetros cinéticos empleando la técnica de Resonancia Plasmónica Superficial (SPR)

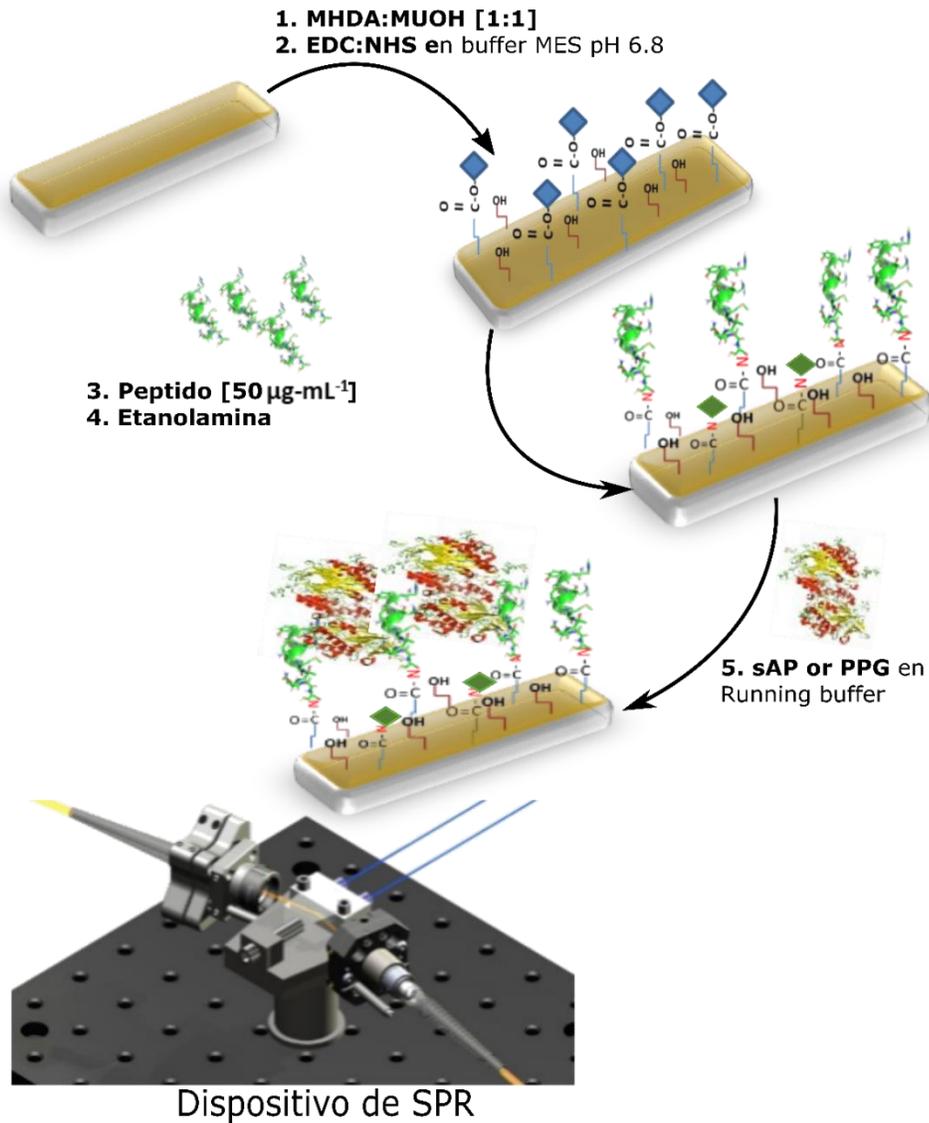
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

2.7.5.1 Biofuncionalización de los chips de Au con los PepHLec2854, PepHLec2855 y PepHLec2856. El chip sensor se basó en una capa de oro ultrafina (50 nm de grosor) depositada sobre un portaobjetos de vidrio previamente recubierto de titanio (2,0 nm de grosor). Los chips sensores se lavaron con acetona, isopropanol y agua desionizada sumergiéndolos a temperatura de ebullición. Posteriormente, se secaron con N₂ y se colocaron en un limpiador de ozono (BioForce Nanoscience, EE. UU.) durante 40 min. Se preparó una monocapa autoensamblada (SAM) de forma “*ex-situ*” utilizando una mezcla de alcanetioles funcionales, ácido mercaptohexadecanoico (MHDA) y mercaptoundecanol (MUOH) en una proporción 1:1 y una concentración total de 250 µM en etanol, donde el sensor sumergido fue incubado durante la noche (Soler et al., 2016). Luego, los sensores nanoplasmonicos se enjuagaron con etanol y se secaron con N₂. La activación del grupo carboxílico se realizó mediante la formación de ésteres de carbodiimida utilizando una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) (0,2 M/0,05 M) en solución de 2-(N-ácido morfolino) etanosulfónico (MES) (100 mM; pH 6,8) durante 30 min. Posteriormente, cada péptido (PepHLec2854, PepHLec2855 y PepHLec2856) se inmovilizó covalentemente en un chip sensor de oro utilizando una solución de péptido de 50 µg·ml⁻¹ en tampón MES (50 mM; pH 7,0) mediante incubación durante la noche para asegurar una alta densidad de bioreceptor en la superficie del chip del sensor. Finalmente, se añadió etanolamina (1 M; pH 8,5) para desactivar el grupo carboxílico no reactivo. Los chips del sensor se enjuagaron con agua MilliQ y se secaron con N₂ como es esquematizado en la figura 7.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 7

Esquema de biofuncionalización la de las superficies sensoras de oro nanoestructurado y análisis de la sAP y PPG empelando la técnica de SPR.



Previamente al ensayo, se establecieron condiciones óptimas de pH del buffer de corrida de acuerdo con la estabilidad tanto de los péptidos y de cada uno de los targets, la relación de tioles para la biofuncionalización, y la concentración de péptido empleado para

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

garantizar la formación de una monocapa homogénea en las superficies como es mostrado en el Anexo A.

2.7.5.2 Determinación de parámetros cinéticos y constantes de afinidad de los PepHLec frente al PPG y la sAP. Se realizaron diluciones seriadas cada uno de los targets (sAP y PPG), los cuales se analizaron en experimentos separados para cada PepHLec inmovilizado en el sensor de Au, sin exceder la concentración de saturación del ligando en la superficie. En el caso de sAP, el rango de concentraciones inyectadas fue de 5,2 a 104 nM en un buffer MES 10 mM a pH 6,5. En cuanto al PPG, se inyectó en concentraciones entre 3,0 a 58 nM usando un buffer acetato 10 mM a pH 4,5. La solución buffer empleada para diluir cada target fue la misma que se usó como fase móvil durante cada experimento. La velocidad de flujo se fijó a $30 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ mantenido durante 15 min como se recomienda en la literatura (Zong et al., 2016). La etapa de regeneración se llevó a cabo de modo que todos los péptidos unidos a cada target lograron disociarse por completo utilizando 5,0 mM de NaOH a un flujo de $30 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 2 min. Los sensogramas adquiridos se ajustaron a un modelo de interacción de unión de un solo sitio (1:1) utilizando el software GraphPrism (Versión 9.0). Mediante este modelo se asumió que la formación de los complejos PepHLec-sAP y PepHLec-PPG no está limitada por el transporte de masa, ya que durante el ensayo por SPR se logra mantener una concentración constante de cada uno de los targets durante el flujo continuo de la fase móvil. Por lo tanto, en el análisis cinético las constantes de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se calcularon a partir de la gráfica de $\Delta\lambda_{\text{SPR}}$ versus concentración. En consecuencia, la constante de disociación de equilibrio (K_D), conocida como afinidad, se determinó a partir de la relación $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Además, el valor de Chi^2 fue reportado para indicar la confianza de ajuste.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

2. 8 Análisis de resultados del diseño y síntesis de los PepHLec

2.8.1 Análisis bioinformático de moléculas secretadas por *Leishmania*: sAP y PPG

Las secuencias de proteínas de la sAP y los PPG informados por los parásitos *Leishmania ssp* fueron seleccionaron en Uniprot (Disponible en: www.uniprot.org/). Aproximadamente doce secuencias de sAP y cuatro secuencias de PPG con hasta un 60% de identidad fueron analizadas y alineadas utilizando las herramientas BLAST y Clustal Omega (Disponibles en la Base de Datos Uniprot) para encontrar un dominio conservador en un análisis bioinformático independiente muestra en las Figura 8-9.

Figura 8

Alineamiento de múltiple de 18 secuencias de fosfatasa acidas secretadas parásitos *Leishmania*

<u>A4HQG6</u>	A4HQG6_LEIBR	1	-----MVQVAHRHGARSALVDDNATQICGTVPYCGEL	32
<u>A4HQG9</u>	A4HQG9_LEIBR	1	MASKLLRVLATALLVAAAVSVDARLVVRMVQVAHRHGARSALVDDNATQICGTVPYCGEL	60
<u>A0A0885333</u>	A0A0885333_9TRYP	1	MASKLLRVLATALLVAAAVSVDARLVVRMVQVAHRHGARSALVDDNATQICGTVPYCGEL	60
<u>Q25336</u>	Q25336_LEIME	1	MASRLVRVLAAMLVAAAVSVDARFVVRMVQVVHRHGARSALIDDNTTEICGTLYPCGEL	60
<u>Q25332</u>	Q25332_LEIME	1	MASRLVRVLAAMLVAAAVSVDARFVVRMVQVVHRHGARSALIDDNTTEICGTLYPCGEL	60
<u>E9AU82</u>	E9AU82_LEIMU	1	-----MVQVVHRHGARSALIDDNTTEICGTLYPCGEL	32
<u>Q00839</u>	Q00839_LEIDO	1	MASKLIRVLAALLVAAAVSVDARLVVRMVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	60
<u>Q00838</u>	Q00838_LEIDO	1	MASKLIRVLAALLVAAAVSVDARLVVRMVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	60
<u>A4ICA5</u>	A4ICA5_LEIIN	1	MASKLIRVLAALLVAAAVSVDARLVVRMVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	60
<u>A0A381MXW3</u>	A0A381MXW3_LEIIN	1	-----MVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	32
<u>A0A1E1J8F9</u>	A0A1E1J8F9_LEIGU	1	MASKLLRVLATALLVAAAVSVDARLVVRMVQVAHRHGARSALVDDNATQICGTVPYCGEL	60
<u>E9BV33</u>	E9BV33_LEIDB	1	MASKLIRVLAALLVAAAVSVDARLVVRMVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	60
<u>A0A381MXL3</u>	A0A381MXL3_LEIIN	1	-----MVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	32
<u>Q9GZC3</u>	Q9GZC3_LEIDO	1	MASKLIRVLAALLVAAAVSVDARLVVRMVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	60
<u>A4ICA2</u>	A4ICA2_LEIIN	1	MASKLIRVLAALLVAAAVSVDARLVVRMVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	60
<u>Q9GZC2</u>	Q9GZC2_LEIDO	1	MASKLIRVLAALLVAAAVSVDARLVVRMVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	60
<u>A0A075IPV3</u>	A0A075IPV3_LEIDO	1	MASKLIRVLAALLVAAAVSVDARLVVRMVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	60
<u>E9BV30</u>	E9BV30_LEIDB	1	MASKLIRVLAALLVAAAVSVDARLVVRMVQVVHRHGARSALINDNTTEICGTLYPCGEL	60
			****.*****:.*.*:*****	
<u>A4HQG6</u>	A4HQG6_LEIBR	33	TDEGVEMVRAIGKFARGRYNDPSLVESPLFPSTRYNSVYTRSTDTQRTIQSATAFLHG	92
<u>A4HQG9</u>	A4HQG9_LEIBR	61	TDEGVEMVRAIGKFARSRYNDPSLVESPLFPSTRYNSVYTRSTDTQRTIQSATAFLHG	120
<u>A0A0885333</u>	A0A0885333_9TRYP	61	TDEGVEMVRAIGKFARSRYNDPSLVESPLFPSTRYNSVYTRSTDTQRTIQSATAFLHG	120
<u>Q25336</u>	Q25336_LEIME	61	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNLSLVESPLFPSTRYNSVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	120
<u>Q25332</u>	Q25332_LEIME	61	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNLSLVESPLFPSTRYNSVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	120
<u>E9AU82</u>	E9AU82_LEIMU	33	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNLSLVESPLFPSTRYNSVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	92
<u>Q00839</u>	Q00839_LEIDO	61	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNDLSLVESPLFPSTQYNSLVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	120
<u>Q00838</u>	Q00838_LEIDO	61	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNDLSLVESPLFPSTQYNSLVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	120
<u>A4ICA5</u>	A4ICA5_LEIIN	61	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNDLSLVESPLFPSTQYNSLVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	120
<u>A0A381MXW3</u>	A0A381MXW3_LEIIN	33	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNDLSLVESPLFPSTQYNSLVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	92
<u>A0A1E1J8F9</u>	A0A1E1J8F9_LEIGU	61	TDEGVEMVRAIGKFARSRYNDPSLVESPLFPSTRYNSVYTRSTDTQRTIQSATAFLHG	120
<u>E9BV33</u>	E9BV33_LEIDB	61	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNDLSLVESPLFPSTQYNSLVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	120
<u>A0A381MXL3</u>	A0A381MXL3_LEIIN	33	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNDLSLVESPLFPSTQYNSLVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	92
<u>Q9GZC3</u>	Q9GZC3_LEIDO	61	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNDLSLVESPLFPSTQYNSLVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	120
<u>A4ICA2</u>	A4ICA2_LEIIN	61	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNDLSLVESPLFPSTQYNSLVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	120
<u>Q9GZC2</u>	Q9GZC2_LEIDO	61	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNDLSLVESPLFPSTQYNSLVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	120
<u>A0A075IPV3</u>	A0A075IPV3_LEIDO	61	TGEGVEMVRAIGEFARSRYNDLSLVESPLFPSTQYNSLVYTRSTHTQRTIQSATAFLRG	120
<u>E9BV30</u>	E9BV30_LEIDB	61	TGEGVEMVRAIGESPHLHPFAVTQDWSLPLT-----	93
			*.*****:.*.*:*****	

Nota. Las secuencias fueron identificadas y reportadas en la base de datos Uniprot. Consultada en enero de 2019.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 9.

Alineamiento múltiple de 4 proteofosfoglicanos identificados en parásitos Leishmania

```

TR|A4HM86|A4HM86_LEIBR APSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSAPSSSS-SSAPSSSSS 2267
TR|A4HM87|A4HM87_LEIBR APSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSS 1030
TR|E9AEM8|E9AEM8_LEIMA APSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPS---- 1834
TR|E9AEM9|E9AEM9_LEIMA APSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSS 2574
          ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

TR|A4HM86|A4HM86_LEIBR APSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSS 2327
TR|A4HM87|A4HM87_LEIBR APSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSS 1090
TR|E9AEM8|E9AEM8_LEIMA -----SSSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSS 1883
TR|E9AEM9|E9AEM9_LEIMA APSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSS 2634
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

TR|A4HM86|A4HM86_LEIBR APSSSSSSAPSSSSS-----APSSS-----SSAPS-SSSSAPSSSSSSAPSS 2368
TR|A4HM87|A4HM87_LEIBR APSSSSSSAPSSSSS-----APSSS-----SSAPS-SSSSAPSSSSSSAPSS 1116
TR|E9AEM8|E9AEM8_LEIMA APSASSSSAPSSSSS-----APSSS-----SSAPS-SSSSAPSSSSSSAPSS 1911
TR|E9AEM9|E9AEM9_LEIMA APSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSTAPSASSSSAPSSSSSSAPLASSSSAPSS 2694
          ***:***** ** :*****

TR|A4HM86|A4HM86_LEIBR SSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSSSAPSSSSS----- 2423
TR|A4HM87|A4HM87_LEIBR SSSAPSSSSSSAPFSSSSAPSSSSSSAPS----- 1145
TR|E9AEM8|E9AEM8_LEIMA SSSAPSASSSSAPSSSSS-----APSASSSSAPSS 1941
TR|E9AEM9|E9AEM9_LEIMA SSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSSSSSSAPSASSSSAPSS 2754
          *****:***** *****

```

Nota. Las secuencias fueron identificadas y reportadas en la base de datos Uniprot. Consultada en enero de 2019.

A partir de los resultados de Clustal Omega de la sAP secretada por *Leishmania* reportados en Uniprot, seleccionamos la región correspondiente a MVQVVHRHGARSALNDNTTEICGTLYPE (Code Job Uniprot: /www.uniprot.org/align/A20190117216DA2B77BFBD2E6699CA9B6D2DEC41) se seleccionó la región para la PPG correspondiente a 1030-1450 del proteofosfoglicano reportado en Uniprot con el ID: A4HM87 como una región más conservadora por las únicas cuatro secuencias informadas (Code Job Uniprot: www.uniprot.org/align/A201909186746803381A1F0E0DB47453E0216320D05A710T.aln).

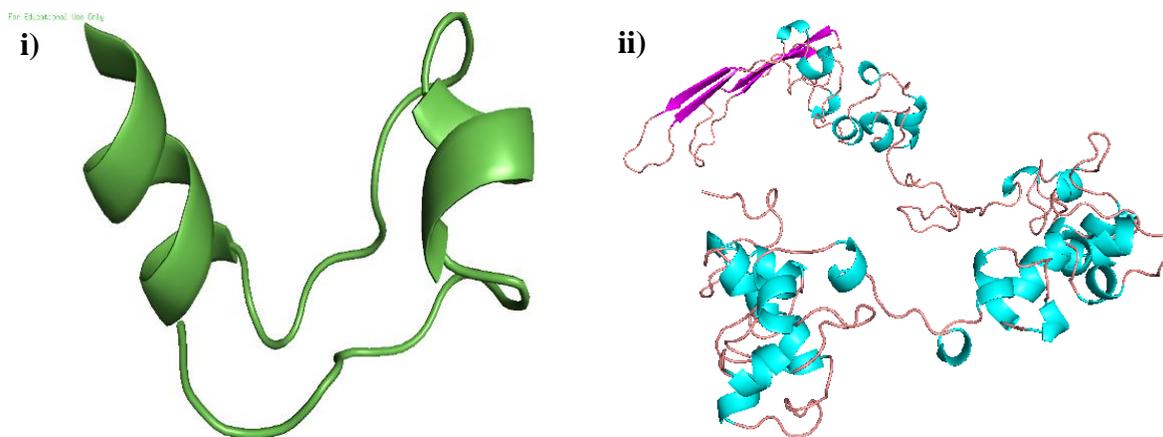
Los dominios conservados encontrados en sAP y PPG son aquellas regiones de aminoácido escogidas para que ocurra la interacción con los PepHLec diseñados previamente. La identificación de estas regiones asegura una mayor probabilidad de que los PepHLec puedan

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

reconocer cualquier sAP o PPG secretado por un amplio número de especies de *Leishmania*. Posteriormente, los modelos nativos para las regiones conservadoras tanto sAP como PPG se obtuvieron del servidor web GalaxyWEB (<http://galaxy.seoklab.org/>), lo que permitió realizar la predicción, el refinamiento y la optimización de la estructura de la proteína basada en la plantilla de proteína al recalificar los resultados de HHsearch como se muestra en la figura 10.

Figura 10

Regiones conservadas de glicoproteínas secretadas por parásitos del género Leishmania



Nota. Secuencias reportadas en Uniprot. **i)** Región de 31 aminoácidos del dominio conservado de fosfatasas ácidas secretadas por *Leishmania* correspondiente a MVQVVHRHGARSALNDNTTEICGTLYPE adoptado una conformación alfa-hélice. **ii)** Dominio conservado en los PPG identificados para *Leishmania* con 378 residuos aminoacídicos ricos en serina, los cuales adoptan conformaciones alfa-hélice y beta-plegadas.

2.8.2 Diseño racional de los *PepHLec*

El diseño racional de los péptidos se basó en el dominio conservado de lectinas específicas para el reconocimiento de carbohidratos de la superficie celular del tipo Gal-Man- (PO₄), y en la extracción de fragmentos de las secuencias que incluyeran los sitios

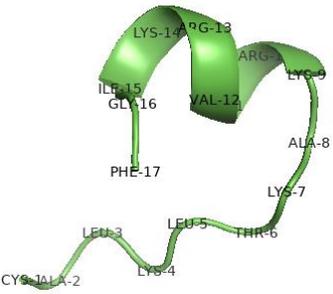
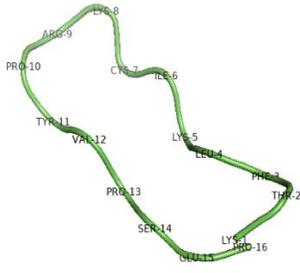
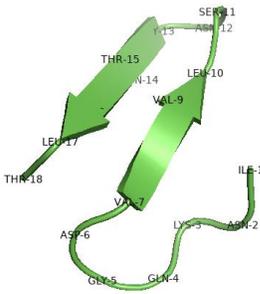
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

activos en el reconocimiento de glucanos. De este modo se seleccionó un grupo de 15 secuencias de lectinas reconocidas por glicoconjugados del Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) con ID: 1CIW; ICQ9; ICR7; IQF3; 1RIR; 2DHI; 2DV9; 2DVA; 2DVB; 2DVD; 2DVF; 2DVG; 2DVP; 2TEP; 1BZW desde donde fue extraída la región conservada que constó de un péptido de 14 residuos aminoacídicos designado como PepHLec2854 y se extrajeron 3 fragmentos de residuos de 16 a 18 residuos de aminoácidos desde diferentes motivos de las proteínas con ID: 4N32 y 1RIR de la misma base de datos los cuales fueron designados como PepHLec2855 y PepHLec2856.

La conformación 2D de cada péptido se modeló y visualizó utilizando el servidor PEPFOLD y PyMol v2.3 respectivamente. Los datos obtenidos sugieren que tres secuencias de péptidos descritas como PepHLec2854, PepHLec2855 y PepHLec2856 adoptaron un espacio conformacional optimizado basado en una alta similitud de interacción con los targets de este estudio (sAP y PPG) como se condensa en la tabla 3.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Tabla 3.*Péptidos homólogos a las lectinas resultado del diseño bioinformático*

PepHLec2854	PepHLec2855	PepHLec2856
Secuencia Extraída:	Secuencia Extraída:	Secuencia Extraída:
HYSRTENMGTSNAC	KTFLKICKRPYVPSEP	INKQGDVTVLSNGNTQLT
Fragmento ID:	Fragmento ID: 4N32 Residuo	Fragmento ID: 1RIR
	315 al 328	Residuo:18 al 35
		

A continuación, en la tabla 4, se presenta la secuencia primaria y propiedades de los péptidos diseñado a partir de las lectinas descritas en la sección 5.1. Diseño Bioinformático.

Tabla 4

Propiedades fisicoquímicas de péptidos diseñados a partir de un conjunto de 16 secuencias de proteínas perteneciente a la familia de Lectinas.

Péptidos	Secuencia	PM (Da)	C*	pI	Estructura	#AA
PepHLec2854	HYSRTENMGTSNAC	1569.68	+1	8.58	α -hélice	14
PepHLec2855	KTFLKICKRPYVPSEP	1905.31	+4	10.5	α -hélice	16
PepHLec2856	INKQGDVTVLSNGNTQLT	1901.08	+1	10.14	Beta-plegada	18

Nota. *Carga neta a pH 7.0; Punto Isoeléctrico (pI); Número de aminoácidos (AA).

2.8.3 Análisis por Dinámica molecular de la interacción entre los PepHLec y los targets (sAP y PPG)

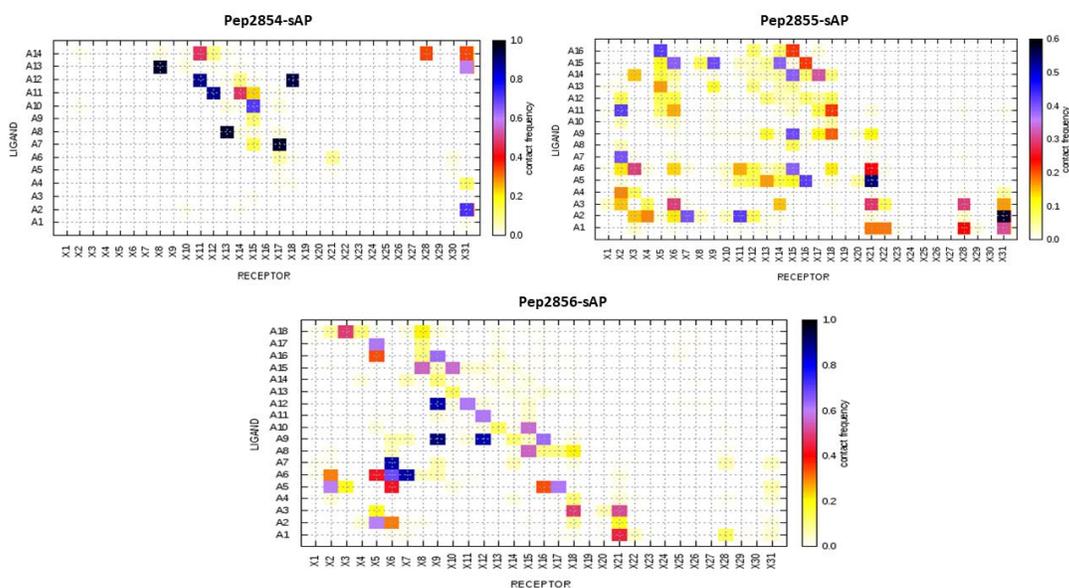
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

En cuanto a la dinámica molecular realizada, el servidor CABS-Dock generó diez estructuras del modelo mejor clasificadas para la formación de los complejo sAP-PepHLec y PPG-PepHLec. Las poses de acoplamiento predicen las orientaciones de unión de un ligando al sitio activo del receptor, muchas veces definidas por el usuario para evaluar interacciones estabilizadoras como enlaces de hidrógeno, puentes salinos y posibles contactos hidrofóbicos en los pares de moléculas utilizando archivos PDB. La simulación computacional llevada a cabo por el CABS-dock utilizó la dinámica de Replica Exchange Montecarlo con 10 replicas distribuidas uniformemente en la escala de temperatura hasta los mínimos de energía. El procedimiento permitió obtener 10 trayectorias (una para cada replica). Durante la simulación, la molecular receptora (target) se mantuvo en conformaciones casi nativas mediante un conjunto de restricciones de distancia que unen los pares de átomos C-alfa; mientras que se permitió la flexibilidad total de los péptidos sintetizados y pequeñas fluctuaciones de la columna vertebral del receptor para explorar la posición de unión de acuerdo con las energías de la función de puntuación al calcular la desviación cuadrática media (RMSD) de cada pose. Se utilizaron tres clasificaciones diferentes de RMSD para soluciones de acoplamiento como referencia: **i)** solución correcta cuando $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$; **ii)** solución aceptable cuando RMSD está entre 2,0 y 4,0 \AA ; y **iii)** solución incorrecta cuando $\text{RMSD} \geq 4.0 \text{ \AA}$ (34). Los contactos de interacción más frecuentes con la sAP y el PepHLec fueron entre los residuos de Arg11, Ser 12 y Asn17, y los residuos de Asn7, Ser11, Asn11 respectivamente con una frecuencia considerablemente alta (0,06-0,1); mientras para el PPG, se planteó la hipótesis de que Ser275, Ser289 y Ser363 del dominio de los PPG son los sitios clave de unión a los péptidos catiónicos a través de los residuos de Lys, Arg y Glu. En este caso, la mayoría de las interacciones fueron puentes salinos. según los mapas de contacto mostrados en las figuras 11-12.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 11

Mapas de frecuencia de contacto de los PepHLec con la sAP

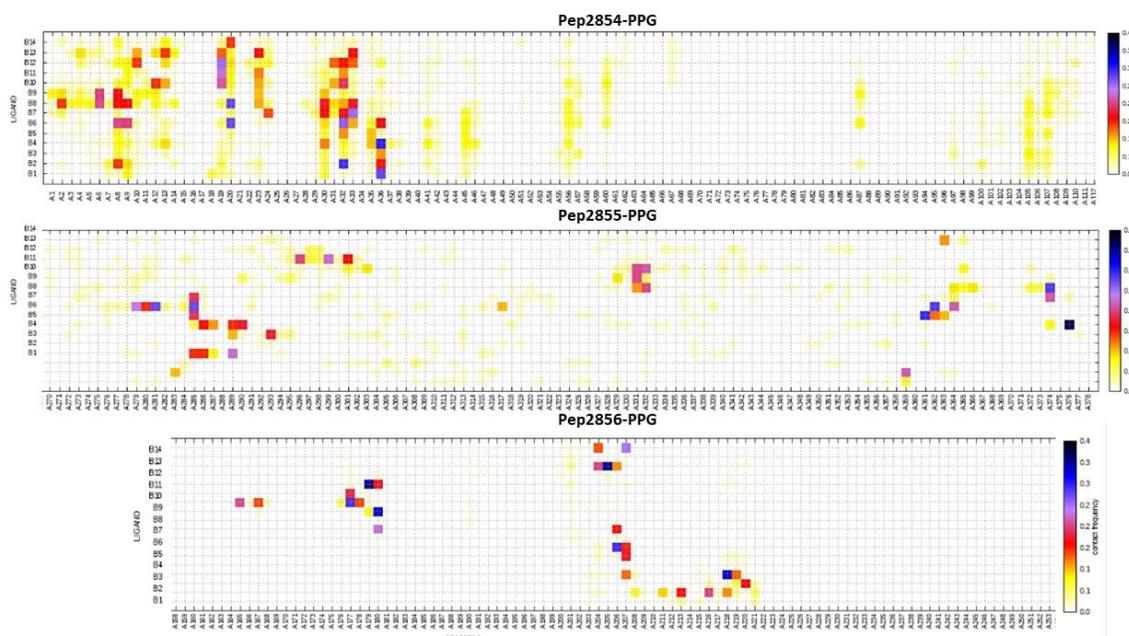


Nota. Estos mapas muestran una distancia máxima de interacción de 3.5 \AA entre cada uno de los residuos de aminoácidos de los PepHLec. Ligando asignado al eje “Y” y los residuos de la sección de 31 residuos del dominio conservado de las fosfatasas ácidas secretadas por *Leishmania* designada como Receptor en el eje “X”.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 12

Mapas de frecuencia de contacto de los PepHLec con el PPG



Nota. Estos mapas muestran una distancia máxima de interacción de 3.5 \AA entre cada uno de los residuos de aminoácidos de los PepHLec. Ligando asignado al eje “Y” y los residuos de la sección de 31 residuos del dominio conservado del proteoglicano en la membrana de parásitos *Leishmania* designada como Receptor en el eje “X”.

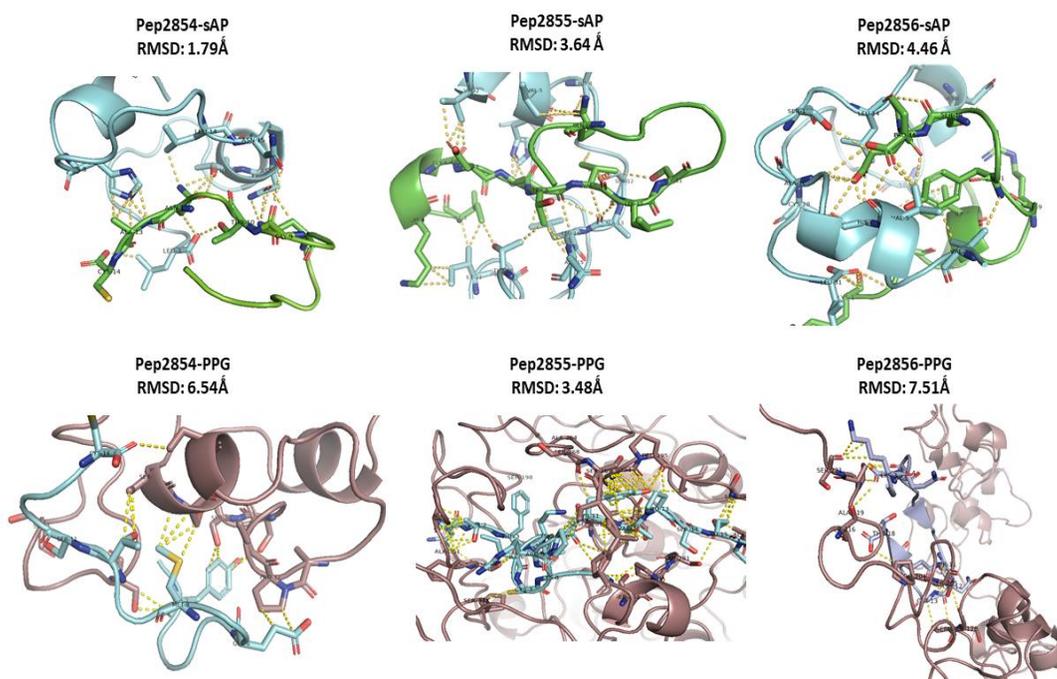
La simulación de MD se orientó por el conocimiento previo de las interacciones que podrían tener lugar entre tres péptidos homólogos a lectina y dos glicoconjugados diferentes como se muestra en la Figura 13. En (13a-c), la pérdida parcial de la conformación 2D de los péptidos pueden verse cuando se acercan a la región sAP. Para las trayectorias moleculares dinámicas, el valor más pequeño de RMSD de coordenadas atómicas fue $1,79 \text{ \AA}$ en el acoplamiento dinámico para trayectorias del par molecular PepHLec2854-sAP, validando así el proceso de diseño basado en estructura. Nos centramos en la agrupación en función de la menor cantidad de valores de RMSD relacionados al enlace peptídico en la proximidad del sitio de unión en el biorreceptor. El resultado de la DM evidenció la proximidad de la interacción que tiene lugar entre el PepHLec2855

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

y el PPG, registrando un valor de RMSD igual a 3,48 Å. Sin embargo, este valor se encuentra en el límite (3.5 Å) de lo que se considera una buena aproximación y cercanía para favorecer la interacción entre los pares moleculares. Es de considerar que los valores de RMSD aumentan significativamente con el tamaño molecular de las estructuras, lo que lo convierte a este valor en un dato con muchos atributos relacionados con una alta dimensionalidad de las proteínas. Por lo tanto, estos datos se consideran buenas aproximaciones, que se complementaron y correlacionaron con los contadores de afinidad obtenidos por experimentos SPR posteriores.

Figura 13

Modelamiento de la interacción de los PepHLec con la sAP y el PPG



Nota. Modelos mejor clasificados obtenidos del acoplamiento dinámico en el servidor de CABS-Dock junto con los valores de RMSD. Las estructuras representan cada uno de los péptidos unidos cerca de un fragmento sAP de la región conservadora correspondiente al fragmento MVQVVHRHGARSALNDNTTEICGTLYPC. Las estructuras representan cada uno de los péptidos unidos cerca de la unión de PPG en la región conservadora (ID Uniprot:

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

A4HM87₁₀₃₀₋₁₄₅₀). La proteína diana (sAP) está coloreada en azul celeste (línea de arriba) y en color violeta el PPG (línea de abajo) y el péptido está coloreado en verde. La línea punteada amarilla en cada acoplamiento representa la interacción entre aminoácidos más de acuerdo con los mapas de contacto.

Visualización obtenida desde el software Pymol de las interacciones entre el PepHLec2856 (cadena en color celeste) y la sAP (cadena en color morado) de acuerdo con la frecuencia de contactos con una distancia máxima de 3.5Å entre la región conservada del PPG y el péptido cuya interacción entre las cadenas se denota con el punteado color amarillo. Esta representación fue obtenida del mejor modelo en la dinámica molecular con un valor RMSD de 7.51Å y 129 elementos en el clúster.

2.8.4 Síntesis de péptidos en fase sólida.

Los péptidos se sintetizaron y purificaron usando columnas Sepack C-18, y la estructura 2D se analizaron usando dicroísmo circular como se muestra en la Figura 14. En la figura 14a, se observa que la estructura 2D de una lectina informada en el Protein Data Bank con código PDB: 2DHI. Esta familia de proteínas se caracteriza por mostrar principalmente una estructura de motivos de alfa hélice y plegada en beta.

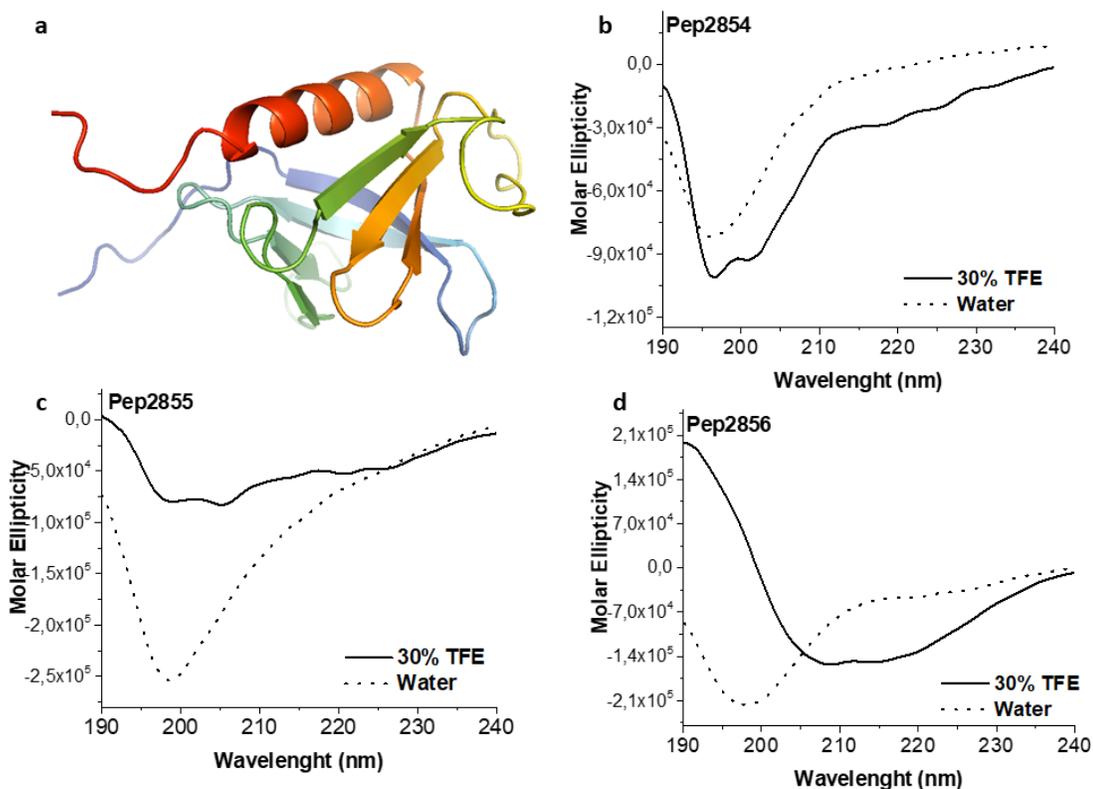
La Figura 14a muestra la estructura 2D de una lectina informada en el Protein Data Bank con el código PDB 2DHI. Esta familia de proteínas se caracteriza por mostrar principalmente una estructura de tipo alfa hélice y plegada en beta. Además, la estructura secundaria de los péptidos determinada por CD mostró que en el agua los tres péptidos exhibían una estructura de espiral aleatoria. Sin embargo, con un 30% de TFE como disolvente, existe una tendencia ligeramente modificada para el PepHLec2854 y el PepHLec2855, pero sigue siendo una tendencia de espiral aleatoria con un mínimo alrededor de 195-205. Mientras que el PepHLec2856 conserva la conformación 2D similar a la estructura de las lectinas que se exhibe en la solución acuosa que

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

muestra un máximo en 190 y dos mínimos sugeridos en 205 y 230 lo que indica una estructura de hélice alfa (Fig. 14b-1c). El principal efecto del TFE como co-disolvente se promueve las interacciones entre las moléculas del mismo péptido, desplazando las moléculas de agua, de tal forma que permite al péptido estabilizar la estructura secundaria. La mezcla de TFE/agua promueve principalmente la estabilización de las estructuras de hélice alfa más que la hoja beta evitando la desnaturalización.

Figura 14

Espectros de dicroísmo circular de la tendencia de las estructuras secundarias de cada PepHLeC



Nota. Los experimentos fueron realizados a una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. (Línea continua) en TFE al 30% v/v; (Línea punteada) Medio agua. a) Estructura 2D de una lectina informada con código PDB: 2DHI. b) PepHLeC2854 con tendencia a espiral aleatoria. c) PepHLeC2855 con una estructura 2D propensa a espiral aleatoria. d) PepHLeC2856 con tendencia a alfa-hélice.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

El TFE permite un mayor número de interacciones locales entre las moléculas del péptido a través de enlaces de hidrógeno. Los datos experimentales apoyan los resultados del plegamiento teórico de los péptidos de conformación más probables realizados en el servidor PEPFOLD, excepto por lo observado en el PepHLec2856 cuyo modelamiento predijo una estructura de plegamiento Beta contraria al perfil de alfa-hélice obtenido experimentalmente.

Debido a la complejidad del análisis de los espectros de dicroísmo circular, un análisis por DCPro usando dos algoritmos diferentes para evaluar el contenido de cada tipo estructural presente en cada péptido, este análisis evidenció que puede coexistir más de una sola tendencia en las conformaciones 2D de los péptidos como dan muestra los resultados recopilados en el Anexo B.

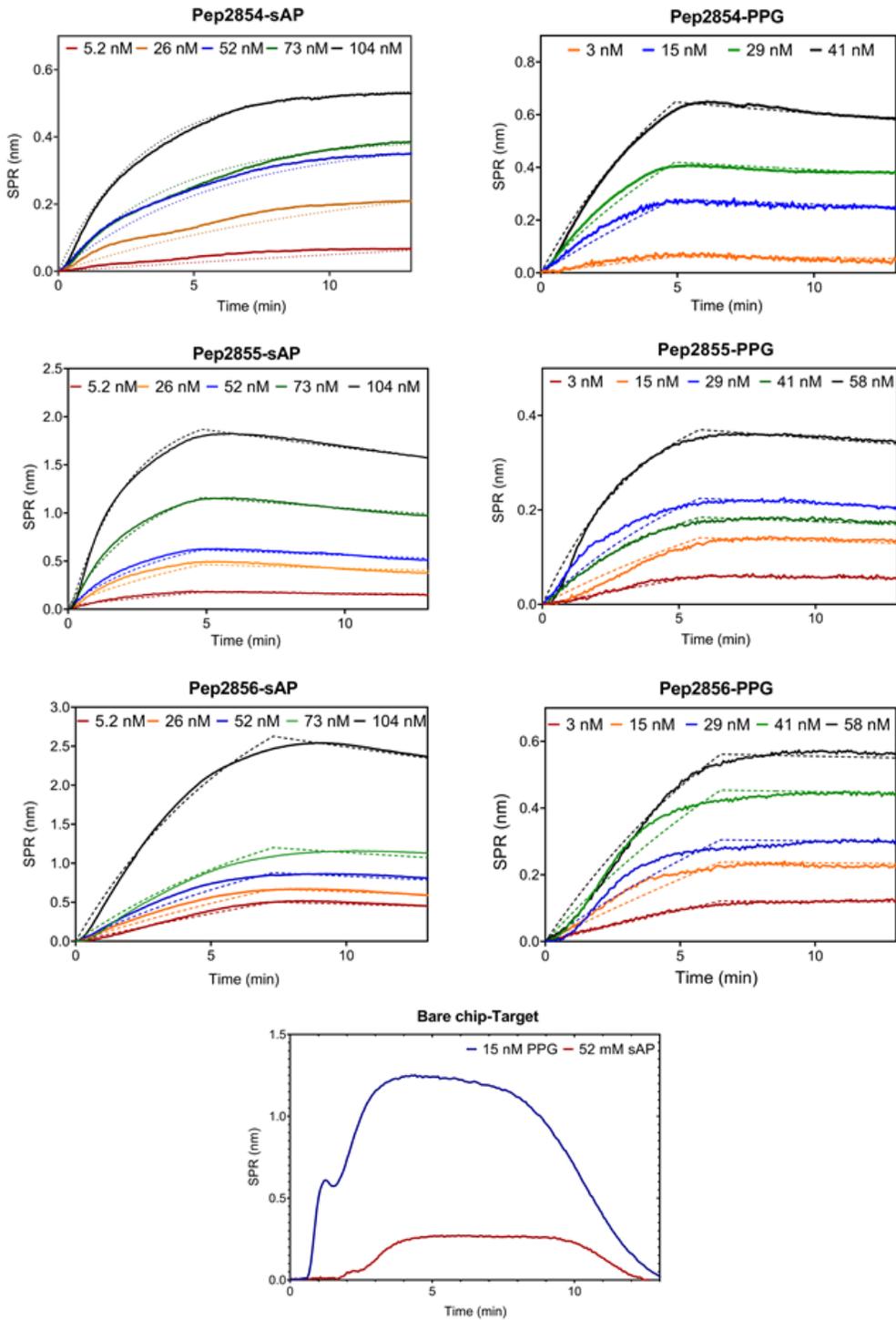
2.8.5 Determinación de las constantes cinéticas y la afinidad de los péptidos sintéticos por la sAP y el PPG

A partir de un ajuste matemático a las ecuaciones cinéticas que rigen la interacción de ligando-target en un ensayo de SPR de acuerdo con los sensogramas adquiridos, se pudieron establecer los valores para la afinidad de cada uno de los péptidos sintéticos por cada uno de los targets bajo estudio. Para este fin, se aplicó un modelo de interacción 1:1 bajo parámetros de cinética de primer orden no competitivo como se presenta en la figura 15.

Figura 15

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Sensogramas ajustados para determinar los parámetros cinéticos y constantes de afinidad de los PepHLec con la sAP y PPG



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Nota. La sAP fue inyectada en el rango de concentración de 5.2 a 104 nM, mientras que el PPG, fue inyectado en un rango de concentración fue de 3.0 a 58 nM. Los sensogramas se muestran en líneas continuas, mientras que las curvas del ajuste matemático se muestran en línea punteada.

La técnica SPR juega un papel destacado en la caracterización de interacciones biomoleculares debido a su capacidad para detectar y monitorear eventos de unión molecular en tiempo real sin el uso de marcadores. Se empleó un montaje de SPR desarrollado en el Grupo NanoB2A de la Prof. Laura M. Lechuga en el ICN2 durante la Estancia Doctoral. Este SPR tiene la configuración de *Kretschmann* para el análisis y la determinación de las afinidades de unión y los parámetros cinéticos de las interacciones entre las proteínas de estudio (sAP y PPG) y los péptidos PepHLec2854, PepHLec2855 y PepHLec2856. El principio de funcionamiento del biosensor SPR se basa en la alta sensibilidad de un campo plasmónico evanescente generado en la interfaz de una capa metálica nanométrica (50 nm de oro) y el medio dieléctrico cuando la luz incide en un ángulo específico. Las propiedades del campo evanescente dependen significativamente del índice de refracción del medio con el que se pueden medir los pequeños cambios debidos a interacciones moleculares, así como la formación de pares moleculares (diana-biorreceptor) que tiene lugar en la superficie del sensor. El análisis SPR requiere que una de las moléculas estudiadas esté inmovilizada en el chip de superficie de oro. La estrategia utilizada fue la formación del acoplamiento de amina covalente entre la N-hidroxisuccinimida (activada por NHS) de una monocapa autoensamblada (SAM) de un alcanotiol y el grupo amina primaria presente en cada cadena peptídica (Ver figura 15). Para facilitar la distribución homogénea de la monocapa de péptido en la superficie y minimizar los problemas de impedimento estérico, se utilizaron alcanetioles-hidroxilo funcionales como espaciador lateral en la SAM.

Se usó el software GraphPad Prism 8.0 para realizar un tratamiento y ajuste de cada sensograma y obtener las constantes de disociación (k_{off}) y asociación (k_{on}) así como la constante

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

de disociación en el equilibrio (K_D) que representa la afinidad. Dichos valores se muestran en las Tablas 5-6.

Tabla 5.

Parámetros cinéticos y afinidad entre los PepHLec y la sAP.

ID Péptido	K_D (nM) \pm ES	k_{on} ($\times 10^6$ M \cdot s $^{-1}$) \pm ES	k_{off} (s $^{-1}$) \pm ES	($R^2 \approx 1$)	Chi (Chi ≈ 0)
PepHLec2854	1.48 \pm 0.10	3.15 \pm 0.23	0.004 \pm 0.001	0.995	0.012
PepHLec2855	4.42 \pm 0.09	4.49 \pm 0.63	0.019 \pm 0.002	0.997	0.025
PepHLec2856	15.6 \pm 0.49	1.26 \pm 0.30	0.020 \pm 0.003	0.995	0.044

Nota. *ES: Error estándar de la media. K_D se estimó basándose tanto en la afinidad de estado estacionario como en el modelo de interacción cinética de estado estacionario 1: 1. Ensayos por triplicado independientes.

Tabla 6.

Parámetros cinéticos y afinidad entre los PepHLec y la PPG.

ID Péptido	K_D (nM) \pm ES	k_{on} ($\times 10^6$ M \cdot s $^{-1}$) \pm ES	k_{off} (s $^{-1}$) \pm ES	($R^2 \approx 1$)	Chi (Chi ≈ 0)
PepHLec2854	5.0 \pm 0.26	2.6 \pm 0.10	0.014 \pm 0.005	0.995	0.014
PepHLec2855	2.7 \pm 0.11	4.4 \pm 0.09	0.012 \pm 0.003	0.993	0.008
PepHLec2856	1.76 \pm 0.50	1.8 \pm 0.01	0.001 \pm 0.002	0.987	0.019

Nota. *ES: Error estándar de la media. K_D se estimó basándose tanto en la afinidad de estado estacionario como en el modelo de interacción cinética de estado estacionario 1: 1. Ensayos por triplicado independientes.

Se evaluó de forma independiente la interacción de sAP y PPG con los tres péptidos, previamente inmovilizados en el chip sensor. Los resultados mostrados en la Figura 14 corresponden al ajuste del sensograma experimental a los parámetros cinéticos teóricos y al parámetro estadístico para todas las curvas ajustadas (Chi y R-cuadrado). Los sensogramas resultantes de la inyección de la solución de sAP y PPG sobre el SAM sin

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

péptido inmovilizado mostraron la recuperación completa de la línea de base después de la inyección de los objetivos, lo que confirma la ausencia de adsorciones inespecíficas a la superficie del sensor (Anexo C). De las ecuaciones de ajuste, es posible extraer tanto la cinética (k_{on} y k_{off}) como afinidad (K_D) de la interacción del par molecular formado entre el péptido y el target. En términos de cinética, la constante de asociación (k_{on}) indica la rapidez de la interacción biomolecular, pero lo que es más importante, la constante de disociación (k_{off}), que puede ser considerada como la medida de la estabilidad del complejo. En este sentido, los complejos PepHLec2854-sAP y PepHLec2856-PPG son los más estables y su constante de disociación k_{off} mostró pequeños valores de 0,004 y 0,001 s^{-1} , respectivamente. Esta observación se puede interpretar como la fracción del complejo que se disocia cada segundo, lo que se relaciona con una vida media más larga de estos dos complejos moleculares. Con respecto a la medición de k_{on} , observamos que PepHLec2855 se une rápidamente a las dos moléculas target, mostrando valores de k_{on} similares tanto para sAP ($4.49 \times 10^{-6} M \cdot s^{-1}$) como para PPG ($4.4 \times 10^{-6} M \cdot s^{-1}$), sin embargo, estas no fueron interacciones más estables. A partir de este hallazgo, inferimos que tanto PepHLec2854 como PepHLec2856 no solo tienen una alta afinidad por las glicoproteínas estudiadas, sino que también exhiben una especificidad distinta para cada una de ellas. La afinidad es la fuerza de unión de una molécula a su ligando, aunque la unión es un proceso reversible, la medición de las constantes de velocidad de reacción se puede utilizar para definir un equilibrio o una constante de afinidad ($1/K_D$), por lo que cuanto menor sea el valor de K_D , cuanto mayor sea la afinidad del péptido por su objetivo.

Todos los péptidos mostraron valores de K_D en el rango nanomolar, evidenciando la alta afinidad por sAP y PPG. Los pares moleculares, PepHLec2854-sAP y PepHLec2856-PPG, registraron los valores de K_D más pequeños iguales a 1,48 nM y 1,76 nM, respectivamente, como

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

se muestra en la Tabla 3-4. Una de las observaciones más significativas es que la interacción de PepHLec2856 -PPG fue 9 veces más fuerte que PepHLec2856-sAP, presumiblemente porque la carga positiva de PepHLec2856 (+4) aumenta la interacción electrostática con los grupos negativos en la molécula de PPG mayoritariamente de las cadenas laterales de treonina y serina en los sitios de acople, diferente al sitio activo. Estos valores de afinidad son similares a los valores de K_D de los anticuerpos de alta afinidad, generalmente considerados en el rango de $1-10^{-3}$ nanomolar (Vanhee et al., 2011; Yun Wang et al., 2019). Sin embargo, los péptidos sintéticos muestran mejores propiedades de reconocimiento que algunos anticuerpos, sumado a su síntesis química más accesible y robusta producción a gran escala y su alta estabilidad bioquímica, ofreciendo por tanto una interesante alternativa para su uso en pruebas y dispositivos de diagnóstico. La elevada afinidad de estos péptidos por los targets de la investigación fue evidente desde los resultados de la dinámica molecular previamente realizada. En donde, se obtuvieron valores de RMSD ($< 3.0 \text{ \AA}$) aceptables para cada una de las interacciones probables entre cada péptido y los receptores (sAP y PPG), evidencia de la alta probabilidad de que los ensayos experimentales por la técnica de SPR fueran satisfactorios en cuando a la determinación de los parámetros cinéticos y la constante de afinidad para cada par molecular. Finalmente, se incluyó la prueba de especificidad del ensayo de SPR de los péptidos usando una solución de BSA bajo las mismas condiciones estudiadas para cada uno de los targets estudiados. La interacción de los péptidos con la BSA no es significativa, ya que se observa un aumento en la señal debido a cambios en el índice de refracción del medio debido al efecto voluminoso de BSA cuando pasa a través de la superficie del sensor, pero no la retención de esta biomolécula en la superficie sensora (Anexo D).

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

2.9 Conclusiones del diseño y síntesis de los PepHLec

Se lograron diseñar y sintetizar tres péptidos designados como PepHLec2854, PepHLec2855 y PepHLec2856 basados en la familia de las lectinas con alta afinidad para el reconocimiento de los glicoconjugados, la sAP y el PPG, que son las moléculas mayoritariamente secretadas por parásitos del género *Leishmania* en los dos formas del parásito luego de la infección en el huésped humano y que son considerados actualmente posibles marcadores moleculares para el diagnóstico temprano de la infección por Leishmaniasis.

La estrategia dinámica molecular empleada permitió modelar las interacciones más probables entre los péptidos y los targets seleccionados, encontrando valores de RMSD dentro de los límites aceptables para los cálculos teóricos (~ 3.0 Å) basados en la elaboración de un mapa de frecuencia de contactos que permite predecir cuales serían los aminoácidos de los dominios conservados de las sAP y el PPG con mayor probabilidad de unirse a cada péptido sintético.

Los PepHLec2854 y PepHLec2856 exhibieron la mayor afinidad y especificidad por sAP (K_D de 1,47 nM) y PPG (K_D de 1,76 nM) respectivamente. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los péptidos basados en un diseño racional con la capacidad de ocupar el sitio de unión de una glicoproteína pueden ser usados como bioreceptores sintéticos de alta afinidad, como una alternativa en el uso de anticuerpos que presenta muchas limitaciones en términos de producción, estabilidad bioquímica y robustez. Estos péptidos son candidatos en el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico para la LC y especialmente para la construcción de dispositivos de biosensado tipo POC que permiten la detección rápida y precisa de la infección en entornos descentralizados y de bajos recursos.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

3. Síntesis y Caracterización de AuNC fluorescentes basados en PepHLec

Los nanoclusters metálicos fluorescentes (NC) son una nueva clase de fluoróforos que han atraído el interés de diferentes investigadores debido a su estructura ultrafina de las cuales se derivan propiedades novedosas y fascinantes en términos de los fenómenos de luminiscencia, catálisis y actividad biológica que exhiben, en gran medida atribuidas al confinamiento cuántico que tiene lugar en ese régimen de tamaño. En estos sistemas, el tamaño de los NC se acerca a la longitud de onda de Fermi de los electrones, lo(Boyer, Mènard, & Meunier, 2010; P. D. Nguyen, Cong, Baek, & Min, 2017; Wei, Lu, Chen, & Chen, 2011a) que da como resultado un comportamiento “*quasi molecular*” reflejado en la aparición de niveles de energía discretos y cuantizados que permiten la aparición transiciones electrónicas que dan lugar a fenómenos de fluorescencia que son dependientes del tamaño sub-nanométrico, del empaquetamiento de los átomos reducidos, así como de la naturaleza del metal precursor, generalmente oro, plata y cobre como ya ha sido demostrado por otros autores (Ngamdee, Tuntulani, & Ngeontae, 2015; T. A. D. Nguyen et al., 2015; Zheng, 2007). En cuanto a los nanocluster de oro (AuNC) se ha reportado una alta compatibilidad con los sistemas vivos por lo cual son ideales para aplicaciones biológicas y nanomedicina. En los últimos años, se han dedicado importantes esfuerzos para establecer estrategias de síntesis controlada desde donde se modulen sus propiedades optoelectrónicas y de este modo permitir aplicaciones más precisas ya sea en métodos diagnósticos por imágenes o en la construcción de biosensores.

Motivados en la exploración y aplicación de estos sistemas de nanoestructuras en la detección de Leishmaniasis, se propuso una ruta de sintética de AuNC rápida y en “un solo paso” asistida por ultrasonido empleando los PepHLec diseñados y sintetizados previamente como una

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

plantilla que permitió obtener nanoestructuras tipo AuNC@PepHLec, de las cuales solo los péptidos, PepHLec2854 y PepHLec2855 permitieron la formación de nanoclusters de oro caracterizados por la emisión de fluorescencia a una longitud de onda de máxima intensidad a 635 y 645 nm, respectivamente, y excitación a ~330 nm. La presencia de aminoácidos que contenían residuos de cisteína pudieron mediar la reducción de los iones Au³⁺ y posteriormente facilitaron la estabilización de los átomos de Au(0) a través la instauración de un enlace Au-S como es discutido en los análisis por XPS. Nuestros resultados corroboran la importancia de ligandos tiolados en la síntesis de AuNC altamente fluorescentes consecuencia del tamaño nanométrico alrededor de ~2 nm y una estructura molecular ultrafina cuya formula molecular fue elucidada como [Au₃L₂] para el sistema AuNC@PepHLec2854 y como [Au₄₋₁₀₉L₂] para los AuNC@PepHLec2855 empleando la técnica de espectrometría de masa con ionización/desorción asistida por un matriz (MALDI).

3.1 Nanoclusters de metales nobles

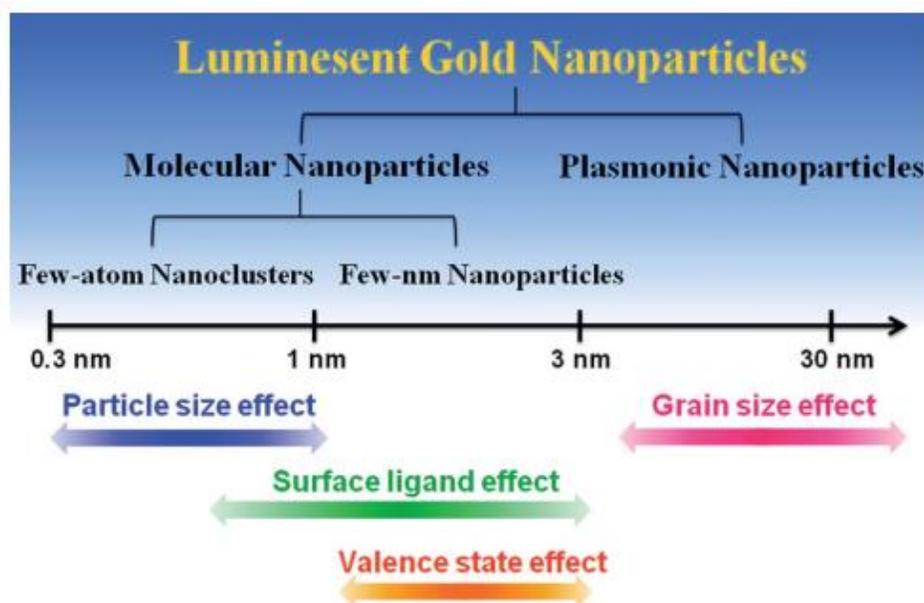
El diseño y construcción de materiales a escala nanométrica está comprendida en un rango de tamaños entre 1-100 nm para el caso de nanoestructuras de metales nobles (oro, plata y cobre. Las nanoparticulas (NPs) se clasifican en tres dominios de acuerdo con su tamaño: NPs grandes (50-100 nm), NPs pequeñas (1-50 nm) y *clusters* (< 1 nm). Las respuestas ópticas de las NPs grandes y su interacción con la radiación electromagnética dependen simplemente de sus tamaños, densidad de electrones libres y su relación volumétrica con la función dieléctrica del medio circundante, lo cual puede ser descrito cuantitativamente descrito por la teoría de Mie. Cuando el tamaño de partícula disminuye hasta la mitad de la longitud de onda de Fermi (~50 nm para AuNPs y AgNP), la función dieléctrica y los índices de refracción se vuelven fuertemente dependientes del tamaño, pero la teoría de Mie aún proporciona una descripción adecuada de estos sistemas. Pero cuando el tamaño de la partícula se vuelve comparable con la longitud de onda de Fermi de

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

un electrón (es decir, la longitud de onda de De Broglie de un electrón a la energía de Fermi, igual a ~ 0.5 nm), las propiedades químicas y optoelectrónicas de los *clusters* de metales (Au y Ag) son dramáticamente diferentes en comparación con los otros dos regímenes de tamaño (Kubo, 1962) como se representa en el Figura 16.

Figura 16

Escala de tamaño de las nanoestructuras metálicas.



Nota. Tomado de (Zheng, Zhou, Yu, & Liu, 2012)

En este régimen de tamaño más pequeño, los llamado NC metálicos se convierten en "especies moleculares" en donde se pueden observar estados discretos que se manifiestan en notables fenómenos luminiscentes similares a las moléculas altamente polarizables (Zheng, 2007). Estos agregados atómicos ultrafinos también exhiben procesos de transferencia de carga, electrones y transferencia de fluorescencia resonante entre los átomos metálicos y los ligandos por la superposición de estados excitados.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

3.1.1 Comportamiento optoelectrónico de AuNC

Los metales nobles como el oro (Au) son ampliamente estudiados debido a sus propiedades físicas y químicas que derivan de su organización electrónica, son excelentes conductores eléctricos como resultado de tener 1 electrón desapareado en el orbital “s” del último nivel de energía donde se localizan los electrones libres en la banda de conducción. En el caso del AuNC, los electrones del orbital 5d están más cerca al núcleo que los electrones del nivel 6s, lo que produce una separación considerable entre las bandas s y d; en consecuencia, la conductancia de los AuNCs estará determinada por los electrones en el nivel 6s.

En 1900, se propuso un modelo clásico para explicar los fenómenos de transporte de cargas eléctricas en materiales metálicos. Este modelo se conoce como el modelo de *Drude-Lorentz*, el cual considera los electrones de valencia como electrones libres que chocan elásticamente con los núcleos fijos sobre la red cristalina (aproximación adiabática). Es decir, considera los electrones de valencia como electrones libres deslocalizados que no pertenecen a ningún átomo en el metal a granel y como consecuencia los electrones se mueven bajo un potencial constante como resultado de la atracción del núcleo atómico positivamente cargado. En todas las escalas de tamaño, el desplazamiento de electrones libres en el campo eléctrico da lugar a cambios en la polarización de la superficie de las nanopartículas. De este modo, la respuesta óptica dependerá del tamaño y de la variación del número de electrones libres en la superficie (C. Chen & Li, 2018). En los nanoclusters sub-nanométricos donde el tamaño es más pequeño que la trayectoria media de los electrones libres, tanto la frecuencia de absorción como el ancho de la banda estará cuantitativamente relacionada con el inverso del radio ($1/R$) de la partícula. Consecuentemente, cuando el tamaño de partícula se aproxima a la longitud de onda de Fermi, la estructura de bandas continua del metal se rompe en niveles de energía discretos por lo cual de acuerdo con *Kubo*, el

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

espaciamiento promedio (δ) de niveles de energía entre niveles adyacentes sigue la siguiente ecuación:

$$\delta \approx \frac{E_f}{N} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde E_f es la energía de Fermi del metal a granel, que para el Au corresponde a 5.5 eV y N es el número de átomos; y a su vez N es proporcional al diámetro de la partícula en las tres dimensiones (N^3) (Goswami, Yao, et al., 2016). Sí se sustituye en la Ecuación 1 los valores de energía de Fermi para el Au y se consideran nanopartículas de entre 1.8 a 2.0 nm de diámetro, se obtendría un número de átomos de Au entre 200 a 300 (Au₂₀₀₋₃₀₀) (Qian, Zhu, Wu, & Jin, 2012).

En este sentido, la diferencia relativa entre el espacio del nivel de energía y la energía térmica se convierte en un criterio ineludible para distinguir el comportamiento metálico del no-metálico. Sí la separación entre los niveles de energía es menor que $k_B T$ (Donde k_B es la constante de Boltzmann y T , la temperatura ambiente) la energía térmica puede crear pares electrón-hueco y la corriente puede fluir; por otra parte sí la separación de niveles de energía es más grande que la energía térmica permitida, los electrones libres en el *cluster* metálico estarán confinado en estados discretos (Qian et al., 2012). En la escala sub-nanométrico, las propiedades de las partículas se consideran altamente sensibles al número de átomos de Au; la ausencia de una alta densidad de estados electrónicos continuos impide la aparición de plasmones superficiales resonantes (SPR) como se observa en las nanopartículas más grandes, fenómeno que es atribuido a las oscilaciones colectivas de los electrones de la banda de conducción en la superficie de la nanopartícula al interactuar con la radiación electromagnética (C. Chen & Li, 2018; Shan et al., 2006). Sin embargo, estos aspectos del comportamiento cuántico y la correlación de estructuras electrónicas con el número de átomos que están agregados en un NCs siguen siendo objeto de estudio.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Recientes estudios han establecido diferentes rutas de síntesis y han brindados métodos de caracterización robustos a nivel molecular y estructural para un mayor entendimiento de sus propiedades optoelectrónicas y sus múltiples aplicaciones en diferentes campos de la ciencia. En este sentido, las propiedades ópticas como la fotoluminiscencia resultan ser particularmente apreciadas; la fluorescencia de AuNCs ha atraído un amplio número de investigaciones debido a las potenciales aplicaciones biológicas para la creación de biosensores que permiten un diagnóstico oportuno de enfermedades causadas por diferentes patógenos en donde los métodos convencionales son obsoletos o tienen marcadas desventajas como el caso del diagnóstico de la Leishmaniasis.

3.1.2 AuNC fotoluminiscentes

La fotoluminiscencia es un proceso de emisión cuya energía de activación es de tipo electromagnético. En este caso los fotones absorbidos en un estado fundamental (S_0) de la materia promueven los electrones a un estado excitado de mayor energía (S_1) que al relajarse y volver al estado no excitado emite un fotón de menor energía.

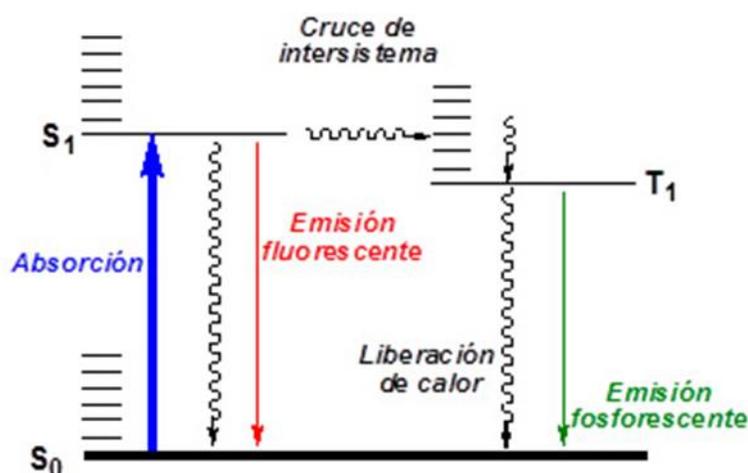
Estos fenómenos pueden ser representados mediante el diagrama de *Jablonski*, (Figura 17) el cual ilustra la absorción de fotones desde un estado fundamental (S_0) para alcanzar un estado excitado (S_1) seguido del relajamiento radiactivo que puede darse por dos rutas: **i)** emisión fluorescente donde el electrón vuelve desde $S_1 \rightarrow S_0$ y **ii)** emisión fosforescente en el que el electrón en un estado S_1 sufre una inter-conversión de su espín y alcanza un estado triplete (T_1) y desde allí retorna al estado fundamental S_0 . Este último fenómeno es más lento y el tiempo de vida (10^{-6} s) es mayor al de la emisión fluorescente (10^{-9} s) pues está prohibido por paridad del espín. En este caso, la fluorescencia es uno de los efectos más estudiados en cuanto a la fotoluminiscencia y es

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

el principio básico de un gran número de biosensores ópticos por ser altamente selectivos y sensibles a nivel molecular.

Figura 17

Diagrama de Jablonski donde se representan las transiciones electrónicas asociadas a los fenómenos de luminiscencia.



Nota. Tomado de (Gregory Schaaff & Whetten, 2000)

Al comportarse como sistemas “cuasi moleculares”, los nanoclusters de metales nobles, especialmente los AuNC exhiben fluorescencia como resultado de las transiciones electrónicas que tienen lugar entre los niveles de energía discretos generados por el confinamiento cuántico de los átomos de Au(0), que se evidencian con la absorción intensa de la luz y posteriormente la emisión radiativa (X. Huang et al., 2012).

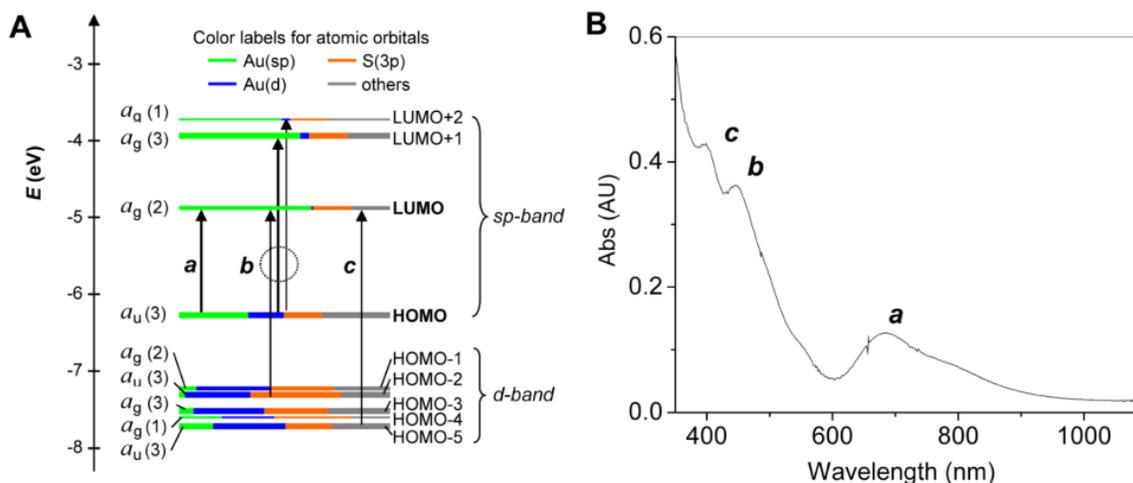
En la figura 18 se presenta un diagrama orbital de niveles de energía de Kohn-Shan modelado para AuNC de aproximadamente Au₂₅ (Zhu, Aikens, Hollander, & Schatz, 2008).

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 18

A) Diagrama de niveles de energía de orbitales de Kohn-Shan modelado para $Au_{25}NC$ tiolados.

B) Espectro UV-Vis calculado de $Au_{25}NC$ tiolados.



Nota. Tomado de (Zhu et al., 2008).

Las transiciones predichas en el diagrama de Kohn-Shan junto con el espectro de absorción calculado muestran los saltos electrónicos entre los orbitales HOMO→LUMO a 670 nm mostrado en el espectro de UV-Vis y son debidas a transiciones intrabanda ($sp \rightarrow sp$). El pico de absorción a 450 nm estaría dado por transiciones mixtas entre bandas ($sp \rightarrow sp$) y ($sp \leftarrow d$) y finalmente la banda de absorción a 400 nm sería atribuida a transiciones netamente ($sp \leftarrow d$). De este modo, se han estudiado diferentes sistemas de nanoclusters con Au_{10-300} , evidenciando que las bandas de absorción son resultado de transiciones de un solo electrón entre niveles de energía discretos y cuantizados (Goswami, Yao, et al., 2016; Yahia-ammar, Sierra, & Me, 2016). Este comportamiento se considera fundamentalmente distinto a las oscilaciones colectivas de electrones de conducción que exhiben las nanoparticulas plasmónicas (Sinha-Roy et al., 2017).

Sin embargo, el mecanismo exacto del origen de la fluorescencia no ha sido claramente elucidado. Se ha discutido dos posibles procesos que dan lugar a la fluorescencia en estos

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

nanoclusters: **i)** como una manifestación del confinamiento cuántico que tiene lugar en el núcleo metálico y **ii)** por la interacción que tiene lugar entre el núcleo metálicos y los ligandos en su superficie. Recientes estudios también han demostrado la dependencia de la fluorescencia en función de la temperatura y han explicado la aparición de dos bandas de emisión en el rojo alrededor de 710 nm (I) y 640 nm (II). La banda I desplazada hacia el rojo en el espectro como una consecuencia de las interacciones electrón-fonon en el confinamiento cuántico y al defecto electrónico-dispersión superficial desde algunos estados tales como HOMO, LUMO y LUMO⁺ formados mayoritariamente de orbitales atómicos del núcleo metálico, y la banda II desplazada hacia la región del azul, la cual es originada predominantemente de la interacción del átomos de oro no reducidos, Au(I), y los ligandos en la superficie de los nanoclusters, es decir una banda de emisión del complejo tipo [Au(I)-L] (Forward, Bohmann, Fackler, & Staples, 1995; X. Wen, Yu, Toh, & Tang, 2012).

3.2 Síntesis de AuNC fluorescentes

Los AuNC pese a ser altamente sensibles pueden ser sintetizados con una alta precisión y control atómico, lo cual permite no solo entender fundamentalmente el origen de los fenómenos luminiscentes de estas nanoestructuras, sino también desarrollar estrategias sintéticas que permitan optimizar o potenciar dichas propiedades ópticas de acuerdo con la aplicación en donde serán requeridas. Principalmente, la fluorescencia, la baja toxicidad y la alta biocompatibilidad con los sistemas vivos, los han hecho ideales para la obtención de bio imágenes y pruebas diagnósticas basadas en biosensores (Halawa, Lai, & Xu, 2018; M. Liu, Tang, Yang, Xu, & Yang, 2019; J. Wang et al., 2014).

En general, los procesos de síntesis de AuNC incluyen métodos denominados *bottom-up* y *top-down* ampliamente conocidos para la obtención de materiales a escala nanométrica. Las rutas

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

tipo *bottom-up* se llevan a cabo por reducción química o foto-reducción de iones Au^{3+} en la presencia de ligandos que protegen los AuNC formados, a la vez que confieren una especie de plantilla que previenen el aumento del tamaño. Los agentes ligandos más empleado para la síntesis son compuesto tiolados, proteínas, pequeños péptidos ricos en cisteína, polímeros, polisacáridos, dendrímeros así como cadenas de ADN y ARN (Soko et al., 2019; Tao, Ju, Li, Ren, & Qu, 2014; Xie, Zheng, & Ying, 2009). Por otra parte, los métodos *top-down*, involucran el ataque químico de compuestos orgánicos tiolados sobre AuNPs más grandes (2-5nm) hasta convertirlas en AuNC sub-nanométricos.

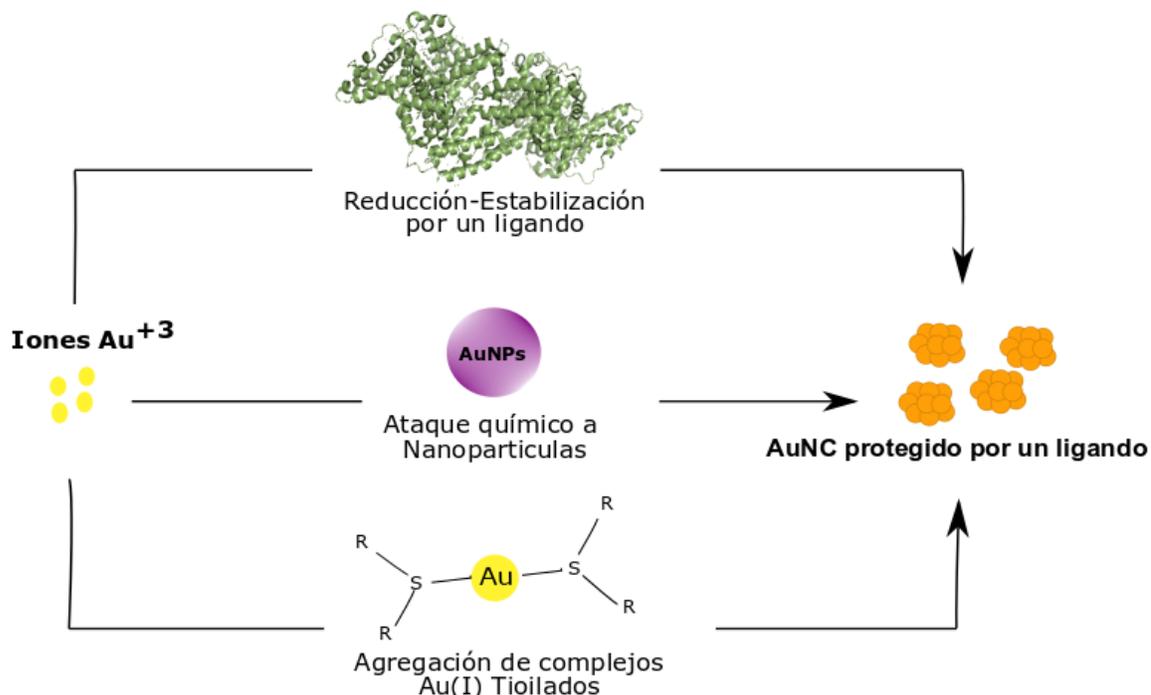
Recientemente, los AuNC con elevada fluorescencia se preparan por medio de procesos de agregación inducida por la temperatura (AIE), estos permiten la agregación controlada de complejos tiolados de Au(I) hasta generar núcleos reducidos de Au(0) y finalmente la formación de nanoclusters tipo núcleo-cascara (core-shell), [Au(0)-Au(I)-tiol] (Q. Li et al., 2019; Zhentao Luo, Xun Yuan, Yue Yu, Qingbo Zhang, David Tai Leong, Jim Yang Lee, 2012) .

En la síntesis de los AuNC, así como en la síntesis de nanopartículas más grandes existen varios parámetros influyentes, los cuales incluyen: **i)** precursor de iones Au^{3+} , **ii)** el tipo de ligando o plantilla, **iii)** concentración de agentes reductores, **iv)** la temperatura de reacción, **v)** pH del medio y **vi)** el tiempo de síntesis. Siendo, las características del ligando una de las variables más importantes ya que debe tener una fuerte afinidad por la superficie del Au(0) y así lograr obtener AuNC altamente estables, con tamaños monodispersos y que además exhiban un rendimiento cuántico (QY) mayor al 10% (H. Chang & Chang, 2014). En la figura 19 se ilustra cada una de estas estrategias.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 19

Diagrama esquemático de las estrategias sintéticas para la síntesis de AuNC.



Nota. Estas estrategias se basan en métodos *bottom up*, como la Reducción-Estabilización por ligando y la Agregación de complejos Au(I)-Tiolado; también se incluye un método del tipo *top down* conocido como Ataque Químico a Nanoparticulas más grandes.

En este sentido, los ligandos tiolados han sido imprescindibles en dichas preparaciones dado la alta afinidad del azufre por el oro (Au-S) (Pakiari & Jamshidi, 2007). Dentro de los ligandos más empleados se encuentran las proteínas y polímeros, como la albúmina de suero bovino (BSA), la tripsina, la papaína y la beta-ciclodextrina (β -CD), que pueden actuar como agentes reductores y a la vez como ligandos protectores, evitando así el uso de agentes reductores adicionales (H. Lin et al., 2013; Sun et al., 2009; Yuling Wang, Chen, & Irudayaraj, 2011).

3.2.1 Síntesis por Reducción Química

Tradicionalmente, las nanoestructuras de Au se obtienen principalmente por reducción de iones Au^{3+} provenientes de la disociación del ácido cloroaúrico (HAuCl_4), el cual resulta ser

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

altamente soluble en agua. Necesariamente, los procesos de reducción química para la síntesis de nanoestructuras han requerido el uso de agentes estabilizantes o ligandos que protejan las nanopartículas y por ende contrarresten los procesos de agregación y crecimiento de los *clusters* metálicos. Dado el tamaño sub-nanométrico de los NC es aún imperativo e indispensable la inclusión de ligandos que garanticen una elevada afinidad por el Au ya que la estabilización ocurre por la formación de un enlace de coordinación del tipo: Au-S, Au-COOH y Au-NHR₂.

Dentro de los ligandos más estudiados se encuentran las proteínas como la BSA, la cual ha permitido sintetizar AuNC@BSA con alta eficiencia de fluorescencia. La BSA provee protección estérica tipo encapsulación, donde los átomos de núcleos de Au(0) se estabilizan a través del enlace Au-S aportados por los 35 residuos de cisteína presentes en la BSA (Xie et al., 2009; Yue, Liu, Li, Liu, & Wu, 2012). Proteínas como la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la glucosa oxidasa (GOD) también han sido empleadas en la síntesis y estabilización de AuNC para aplicaciones en detección de H₂O₂ y glucosas respectivamente, durante reacciones enzimáticas (F. Wen et al., 2011; Xia, Long, & Wang, 2013). Otros sistemas nanoestructurados fluorescentes obtenidos a partir de polímeros ramificados también han sido reportados; el uso de dendrímeros poliméricos como la poliamidoamina (PAMAM) en presencia de NaBH₄, ha permitido el empaquetamiento ordenado y compacto de AuNC en donde los iones no reducidos Au(I) interactúan con los grupos NH₂ y COOH de la PAMAM confiriéndoles un alta resistencia a la degradación proteolítica comúnmente observada en AuNC basados en proteínas y cadenas de ADN o ARN (Avila-Salas, González, Riós, Araya-Durán, & Camarada, 2020; Dai, Tan, He, Chen, & Liu, 2020). Otros polímeros como polivinil pirrolidona (PVP), quitosano y ciclodextrinas han mostrado ser altamente efectivos en presencia de agentes reductores fuertes; dando lugar a AuNC resistentes a la fotodegradación, altamente estables en medio acuoso y con emisión de fluorescencia entre 430-

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

470 nm lo cual les permite ser aplicados tanto a nivel clínico como en el campo de la fotocatalisis (Murugadoss & Sakurai, 2011). Las β -CD han sido usadas para la preparar AuNC@ β -CD selectivos en la detección de dopamina por apagamiento de la fluorescencia; ya que la dopamina puede incrustarse en las nanocavidades de las AuNC@ β -CD, dando lugar a la formación de complejos no fluorescentes. En la síntesis directa por reducción química también se ha explorado el uso de oligonucleótidos ricos en tiamina (TA) han sido comúnmente usado para la detección de Hg^{2+} ; la facilidad de estos aptámeros para formar complejos TA-[Hg^{2+}]-TA que apagan la fluorescencia le han permitido ser usados como método de detección (Tan et al., 2013).

Evidentemente, los ligandos empleados en la síntesis tienen un rol muy importante tanto en la estabilización de las nanoestructuras como en la final aplicación que recibirán ya que los biosensores requieren de una elevada especificidad que viene dada por el componente de reconocimiento que identifica el target ya sean iones metálicos, aniones, metabolitos, enzimas y proteínas. De este modo, de acuerdo con el tipo de ligando y su selectividad, los AuNC pueden ser dirigidos hacia la un target o diana molecular específica.

3.2.2 Ataque químico a nanoparticulas

Otra de las estrategias reportadas en los últimos años para la obtención de AuNC fluorescentes es el ataque químico a nanoparticulas plamónicas (2-4 nm) usando un exceso de ligando, el cual induce el ataque. Los ligandos empleados en este tipo de síntesis deben ser compuestos preferiblemente tiolados debido a su alta afinidad por el oro. Dentro de los agentes mayoritariamente usados se encuentran el ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA); ácido mercaptosuccínico (MSA), BSA, tripéptidos como el GSH, y ácido dihidolipoico (DHLLA) (Yao, 2010).

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

El ataque químico ocurre cuando las moléculas en exceso de ligando logran remover átomos de Au(I) desde la superficie de las nanopartículas al formar complejos Au(I)-Ligando, lo cual da lugar a la aparición de interacciones aurofílicas entre los complejos Au(I) que inician los procesos de nucleación y crecimiento de *clusters* más pequeños. Otra parte, el ligando también puede robar átomos de Au de la superficie que por procesos de abrasión provocar la disminución del tamaño de la nanopartícula hasta alcanzar el tamaño sub-nanométrico. Se ha reportado que esta ruta de síntesis de AuNC es mayoritariamente favorecida en medios alcalinos (pH~13), sin embargo, en otras investigaciones se han logrado obtener sistemas de Au₂₅NC usando MRS como ligando con un QY de 3.1% en un medio ácido (pH~3.0) y Au₈NC usando GHS en un medio neutro (pH 7-8) cuya emisión de fluorescencia está directamente relacionada con el ordenamiento de los núcleos de Au y el número de átomos (P. C. Chen, Yeh, Ou, Shih, & Chang, 2013; C. C. Huang, Yang, Lee, & Chang, 2007). De forma similar, ligandos como el DHLA puede atacar la superficie de las AuNPs estabilizadas con Bromuro Dodecilmimetilamonio CTAB) por un proceso de intercambio de ligando dando lugar a la formación de AuNC@DHLA con rendimientos cuánticos del 3% y una fuerte emisión de fluorescencia a 450 nm (C. A. J. Lin et al., 2009). Otro agente ligante ampliamente usado en esta estrategia de síntesis es la polietilenamida (PEI) quien sustituye el CTAB comúnmente usado como agente estabilizante en la síntesis de nanopartículas más grandes; estos sistemas de Au₈NC@PEI exhibieron una fuerte fluorescencia a 445 nm y el QY del 20% de eficiencia (Duan & Nie, 2007).

3.2.3 Agregación de complejos de Au(I) tiolados

En los últimos 10 años, se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la formación de AuNC fluorescentes. Sin embargo, estos mecanismos siguen siendo objeto de discusión y estudio dada la rigurosidad a nivel cuántico y atómico para lograr explicar su formación y los

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

fenómenos luminiscentes asociados al confinamiento electrónico. El gran interés que reciben los NCs sumado a la necesidad de mejorar la eficiencia de fluorescencia de estos sistemas ha llevado a proponer una de las estrategias más precisas en el control de tamaño para conseguir AuNC con alta eficiencia de fluorescencia. Esta ruta de síntesis, consiste en la agregación *in situ* de complejos de Au(I) tiolados de forma controlada para general núcleos Au(0) que posteriormente dan origen a estructuras fuertemente estabilizadas del tipo núcleo-coraza [Au(0)-Au(I)-L] con rendimientos cuánticos por encima del 20% (Zhentao Luo, Xun Yuan, Yue Yu, Qingbo Zhang, David Tai Leong, Jim Yang Lee, 2012) Esta ruta es conocida como AIE, la cual puede ir acompañada por otros métodos como la agregación inducida por solvente, la agregación inducida por cationes (Cd^{2+}) y la agregación inducida por larga exposición a la temperatura (24h, 50-70°C).

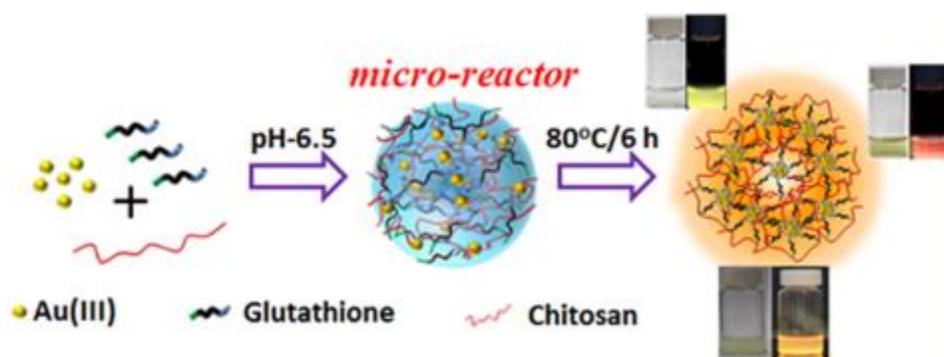
Por otra parte, la AIE inducida por solvente emplea solventes débilmente polares como el etanol para logra romper la esfera de solvatación de los átomos de Au(I)-tiol en el complejo, permitiendo el acercamiento y agregación de los complejos alrededor de los núcleos de Au(0). Estos sistemas de NCs también exhiben otros fenómenos luminiscentes como la fosforescencia con desplazamientos *Stoke* mayores (~200 nm) y un tiempo de vida media de luminiscencia superior a 2.5 μs . El grado de agregación es afectado directamente por la polaridad del solvente. Preferiblemente, las mezclas de solvente con una alta proporción de etanol pueden intensificar la agregación conduciendo a AuNC más densos y con mayor intensidad en la emisión de fluorescencia a 565 nm. Recientemente, se han explorado la adición de agentes espaciadores como el quitosano, un polímero catiónico y biodegradable, el cual una vez formados los agregados Au(I)-Tiol los confina en una especie de hidrogel nanométrico que restringe el movimiento del ligando sobre la superficie del núcleo atómico, aumentando la estabilización y por tanto el incremento

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

significativo de la fluorescencia (Goswami, Lin, Liu, Leong, & Xie, 2016) como se muestra en la figura 20.

Figura 20

Síntesis de AuNC por agregación de complejos Au(I)-Tiolato usando un hidrogel polimérico de quitosano como microreactor.



Nota. Tomado de referencia (Goswami, Lin, et al., 2016).

3.3 AuNC basados en péptidos y proteínas.

Indudablemente, los péptidos y proteínas son quizás las biomoléculas más importantes a nivel biológico ya que cumplen múltiples funciones que involucran las vías de señalización y regulación celular, los procesos de neurotransmisión y sinapsis, la manifestación y desarrollo de enfermedades producto de desórdenes metabólicos y en la síntesis endógena de biomoléculas, así como la expresión y concentración de las mismas en los organismos vivos durante las infecciones y enfermedades causadas por diversos agentes patogénicos.

3.3.1 Síntesis de AuNC mediados por proteínas.

Un alto número de trabajos de investigación han sido reportados año tras año cuyo interés primordial ha sido la exploración de un gran número de proteínas en la formación de nanoclusters metálicos, especialmente AuNC como albuminas, globulinas, pepsina, transferrinas,

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

deshidrogenasa, β -lactamasas, ribonucleasas y lisozimas (Yong Wang, Chen, & Yan, 2013; F. Wen et al., 2011; West, Griep, Cole, & Karna, 2014; Zang et al., 2016). La versatilidad de dichas biomoléculas es atribuida a conformación espacial dinámica que puede albergar los Au^{3+} en pequeñas cavidades hidrofóbicas para su posterior reducción; la presencia de múltiples grupos funcionales en las cadenas laterales de la secuencia de las proteínas y variabilidad de aminoácidos que las conforman asegura un amplio número de interacciones posibles, no solo covalentes, también la aparición de complejos $[\text{Au}(0)\text{-Au(I)-L}]$ y las interacciones electrostáticas con moléculas de proteína cargadas negativa y positivamente de acuerdo con el pH del medio. El uso de biomoléculas en la síntesis de AuNC no solo mejoran la estabilización y las propiedades optoelectrónicas también proveen de actividad biológica, lo cual despierta mayor interés por estas nanoestructuras a nivel biológico.

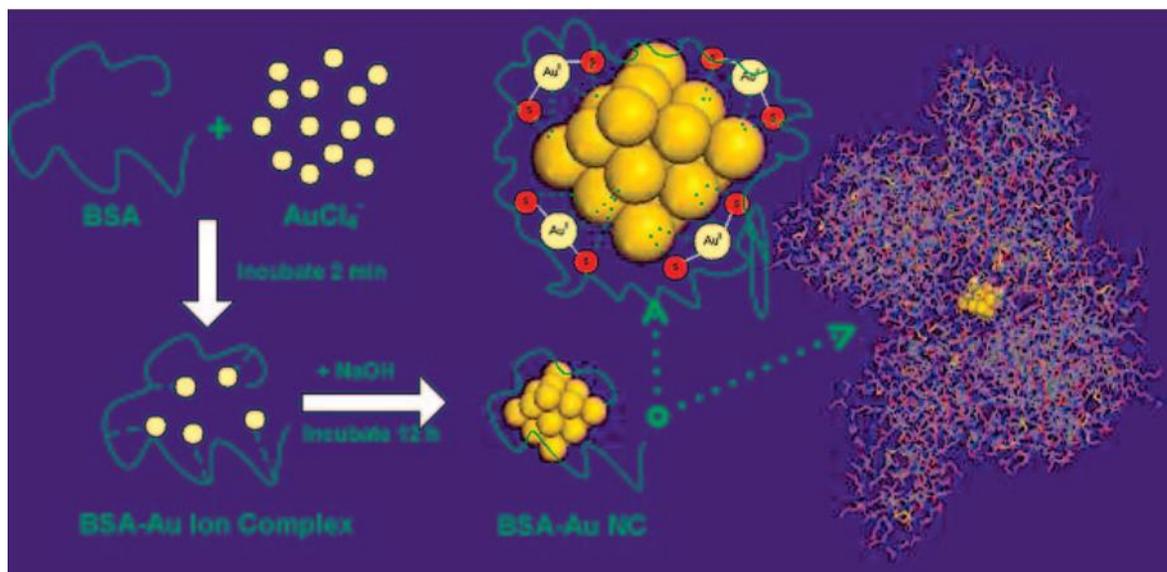
Estas consideraciones, han llevado a muchos autores a reportar rutas de síntesis basadas en proteínas y péptidos como la que propuso *Xie y colaboradores en 2009*, y que es sin duda es el precedente más importante en las estrategias de obtención de AuNC a partir de biomoléculas (Xie et al., 2009).

Este trabajo proporcionó una base exitosa para explorar otros precursores metálicos (Ag, Cu) para preparar diferentes NC usando diferentes proteínas como plantilla. La reacción de reducción de los Au^{3+} por parte de las proteínas, se lleva a cabo a través de los residuos de tirosina, cuya capacidad reductora se ve intensificada en un medio básico (pH >10.0). Asimismo, las cisteínas e histidinas ejercen un efecto estabilizador sobre los átomos de oro reducidos a través de interacciones del tipo Au-S (tiol), Au-NH₃ (amina) y Au-COOH (ácido carboxílico). En este método, la BSA fue empleada como ligando reductor-estabilizador de los AuNC como se ilustra en figura 21.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 21

Modelo de la formación de AuNC en solución acuosa a partir de BSA.



Nota. Tomado de la referencia (Xie et al., 2009).

En 2011, *Chien Liu y colaboradores* también informaron la síntesis directa de AuNC fluorescente usando insulina; en dicho estudio los AuNC@Insulina mostraron una excelente biocompatibilidad y retención de la bioactividad de la insulina. La síntesis se realizó mezclando insulina y HAuCl_4 (1mM) en un buffer de Na_3PO_4 bajo agitación continua durante 12 h y una temperatura de 48°C . Los AuNC@Insulina con un tamaño de partícula igual a 0.92 ± 0.03 nm fueron centrifugados a 4000 gravedades por 30 min usando amicones de 5 kDa. Los espectros de absorción y emisión de fotoluminiscencia de AuNC@Insulina evidenciaron una fuerte emisión a 670 nm con un rendimiento cuántico de 0.07% y tiempos de vida observados de 439 ns (4%) y 2041 ns (96%). Dada la gran versatilidad de estos AuNC@Insulina, los autores del estudio propusieron su uso en aplicaciones de marcaje fluorescente para la detección por tomografías de Rayos X o en el desarrollo de métodos de sensado de glucosa en muestras de sangre (C. L. Liu et al., 2011). En este mismo año, *Kawasaki y Colaboradores* se reportaron la síntesis de AuNC

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

basado en la Pepsina es una proteinasa aspártica (PM 34550 Da) tiene un rol muy importante en los procesos digestivos y metabólicos de los vertebrados; con este estudio se demostró la fuerte influencia de la acidez del medio en obtención de Au₅₋₈NC con emisión de fluorescencia en el azul (QY~ 3.7%), Au₁₃NC con emisión en el verde (QY~ 5.0%) y Au₂₅NC con emisión en el rojo (QY~3.5). En esta ruta, el pH del medio fue fundamental para determinar el número de átomos de oro empaquetados en el núcleo metálico. Curiosamente, la función enzimática de la pepsina contribuye a la formación de los AuNC y que estos sean usados en la detección de iones Pb²⁺ por intensificación de la señal fluorescente y en la detección de iones Hg²⁺ por apagamiento de la fluorescencia. En este estudio también se determinó que a mayor número de átomos incluidos en los AuNC aumentaba la foto-estabilidad (es decir, Au₂₅NC~Au₁₃NC>>Au₅NC) atribuida al crecimiento del tamaño sub-nanomérico por las interacciones aurofílicas entre los *clusters* más pequeños y iones no reducidos de Au(I). Aunque los mecanismos de formación de estos AuNC requieren un análisis estructural adicional no incluido en su trabajo, la ruta de síntesis con proteinasa demostró ser novedosa y útil para preparar diferentes tipos de nanoclusters metálicos modulando el pH de la reacción, lo cual permitiría múltiples aplicación en catálisis, óptica, marcaje biológico y desarrollo de biosensores a partir de AuNC basados en pepsina (Kawasaki, Hamaguchi, Osaka, & Arakawa, 2011).

En 2013, *Yang Chen y colaboradores*, emplearon por primera vez la papaína, otra proteína con un elevado interés biológico, la cual fue usada como agente reductor y estabilizante en una ruta de síntesis química eficiente y simple para obtener AuNC. En esta investigación se estableció que los parámetros óptimos para la síntesis partían de una concentración de papaína de 7.5 mg·mL⁻¹ (0,5 mL), una solución de HAuCl₄ de 2,5 mM (0,5 mL) que previamente fue mezclada a 37°C durante 5 min y agitación constante en presencia de NaOH para alcalinizar el medio (pH~12).

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Los sistemas de AuNC preparados exhibieron una banda de emisión intensa a 660 nm (QY 4.3%) cuando son excitados con una longitud de onda de 470 nm. Se observó un tamaño de partícula uniforme alrededor de ~2,0 nm. En este estudio se incluyó un análisis por XPS en el donde se observó la aparición de dos picos intensos a 83,6 y 87,2 eV, correspondientes al desdoblamiento de orbitales electrónicos $4f^{7/2}$ y $4f^{5/2}$ característicos de los núcleos de Au(0) en los AuNC. El mejor ajuste para los datos indicaron que los AuNC@Papaina están constituidos en aproximadamente un 5,2% de Au (I) y un 94,8% de Au(0) (Y. Chen et al., 2013). Esta baja cantidad de Au(I) en la superficie ha sido asociada por otros autores a la estabilidad de los AuNCs fluorescentes ya que el crecimiento de los núcleos de oro se detiene al disminuir la concentración de iones no reducidos y a su vez favorece la formación de complejos [Au(I)-S] (Yuan et al., 2011).

Proteínas como la hemoglobina y las globulinas también ha sido reportadas como ligandos exitosos que cumplen tanto la función de reducir los iones Au^{3+} provenientes del $HAuCl_4$, indiscutiblemente el principal precursor de los Au(0) y la estabilización de los núcleos metálicos una vez formados. En 2017, *Yinhuan Li y colaboradores* proponen la síntesis de AuNC@Hb partiendo de una solución de hemoglobina ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 5 mL) y una solución de $HAuCl_4$ (2,5 mM; 5 mL) mezclada vigorosamente a 60°C y posterior adición de NaOH (1M; 1mL). La reacción transcurrió durante 36 horas, una vez concluida la reacción y que la solución se tornará a una coloración verde oscuro, los AuNC@Hb fueron purificados por centrifugación. En este estudio se examinó el efecto de la temperatura en la reacción en un rango de $37\text{-}80^\circ\text{C}$ y el tiempo de reacción (4-48h), concluyendo que a los 60°C la reacción se completa y se observa mayor intensidad de fluorescencia a 450 nm al ser excitados con una longitud de onda de 365 nm y un tiempo de reacción de 36 horas como tiempo óptimo para la formación de los AuNC@Hb. Estas nanoestructuras presentaron un fuerte efecto catalítico sobre la reacción de quimioluminiscencia

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

del luminol con NaIO_4 , las cuales fueron evaluadas para la detección de dopamina ya que esta inhibe drásticamente la luminiscencia del luminol en un rango de concentraciones de 0,3 a 9,0 nM de dopamina. Los resultados fueron satisfactorios con un límite mínimo de detección a 0,1 nM en muestras de plasma sanguíneo (Yinhuan Li, Peng, & You, 2017).

En el mismo año, *Shenghao Xu y colaboradores* propusieron el uso de la Y-globulinas para obtener AuNC altamente estabilizados. Para esta síntesis se disolvieron 2,5 g de Y-Globulina en 5 mL de agua, y posteriormente se adicionaron 5 mL de solución de HAuCl_4 (10 mM) bajo agitación vigorosa. Después de 2 min fueron adicionados 1 mL de NaOH (1M) y la mezcla fue incubada durante 6 horas a una temperatura de 37°C . La formación de AuNC@Y-Glo se evidenció como una solución resultante de color marrón clara, la cual fue aislada de la luz y almacenada a 4°C . Los análisis por TEM mostraron un tamaño homogéneo de partícula alrededor de ~ 2 nm con fuerte emisión de fluorescencia a 650 nm (QY $\sim 5,6\%$) con una fuente de excitación de 365 nm. También se confirmó la interacción fuerte entre los núcleos del AuNC y los grupos tiol presentes en el Y-Globulina por la aparición de una señal a 163,1 eV en el espectro de XPS, correspondiente al pico $2p^{3/2}$ del enlace Au-S. Se observaron los pico con energía de enlace de 84,13 eV para el pico del Au $4f^{5/2}$ correspondiente a los núcleos de Au(0) y el pico del Au $4f^{7/2}$ con una energía de enlace de 87,83 eV atribuido a los iones Au(I) no reducidos presentes en la superficie del núcleo metálico. Estos sistemas de AuNC@Y-Glo presentaron propiedades ópticas únicas que fueron aprovechadas para la construcción de un biosensor de Cu^{2+} basado en el apagamiento de la señal fluorescente de los AuNC en un ensayo competitivo en presencia de pirofosfato y posterior adición de una pirofosfatasa (Joseph & Geckeler, 2014).

Adaptando un enfoque similar, en 2016 *B.A Russell y colaboradores*, usaron la albumina de suero humano (HSA) para la síntesis de AuNC en una ruta de “un solo paso”. Se estableció

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

que la formación de los AuNC@HSA se llevaba a cabo dentro de las cavidades hidrofóbicas interiores de la proteína en un rango de pH de 2-11. En esta ruta de síntesis también se consideraron la formación de dímeros producto de las interacciones entre las especies ionizadas positiva y negativamente cuando el pH del medio coincide con el punto isoeléctrico de la HSA (pH 9.3). Por otra parte, datos de XPS sugieren que mientras que los AuNC son formados dentro de la proteína, no todos los iones Au^{3+} se reducen por completo, también migra desde los sitios de nucleación al interior de la proteína hacia la superficie de la HSA, lo cual podría indicar que las cadenas laterales de aminoácidos cargados positivamente en la superficie de la proteína interactúan con AuCl_4^- cargado negativamente. Estos cambios en la química de la superficie de la proteína pueden alterar la afinidad a los sitios de unión que naturalmente tiene la HSA, lo cual podría restringir su uso para el reconocimiento de un target específico en aplicaciones de bioensayo (Russell, Jachimska, Kralka, Mulheran, & Chen, 2016).

3.3.2 AuNC basado en péptidos

Sin lugar a duda, los compuestos tiolados han sido las moléculas más empleadas desde el inicio de la síntesis de nanoclusters de oro ya sea como estabilizadores en presencia de agentes reductores fuertes o como reductores-ligandos. Dentro de las primeras biomoléculas reportadas en la síntesis se encuentran el tripéptido GSH, ciclodextrinas tioladas y L-cisteína, los cuales establecen interacciones covalentes fuerte entre el Au y el S la coraza metálica (41).

En 1998, se reporta la primera síntesis de clústeres de oro usando GSH con diferentes masas atómicas que posteriormente fueron separados usando geles de electroforesis y analizados por espectroscopia de masas MALDI. En esta investigación se lograron identificar de forma separada núcleos de Au con masas de 4.3, 5.6 y 8.2 kDa, es decir en un rango entre 20-40 átomos de oro dentro de la estructura cuyo diámetro de partícula se encontraba entre los 0,3 a 3,2 nm (J. Phys.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Chem. B 1998, 102, 10643-6). Dos años más tarde, el mismo grupo de investigadores publicaron un estudio riguroso que relacionó la quiralidad del ligando (GSH) con las características conformacionales de los AuNC@GSH. En efecto, los resultados obtenidos por dicroísmo circular demostraron que las estructuras de nanoclusters con baja simetría exhiben una elevada quiralidad determinada por el carácter helicoidal del ligando y del número de moléculas de este sobre la superficie de los Au (0). Estos resultados han motivado la exploración, estudio y discusión de las propiedades opto-quirales las cuales aún no han podido ser totalmente caracterizadas y representan un reto analítico (42).

La elucidación de la estructura atómica y molecular ha sido uno de los desafíos más importantes en el estudio de los nanoclusters metálicos, ya que dicho conocimiento permitiría direccionar con mayor precisión la síntesis química de estas nanoestructuras. En 2004, *Yuichi Negishi y colaboradores* realizaron un reportaron los resultados del estudio espectroscópico y por espectrometría de masas (MALDI) de diferentes sistemas AuNC@GSH sintetizados en presencia de NaBH₄. En esta investigación se logró establecer que la formación de Au_nNC(SG)_m se regía por la estabilidad intrínseca de los núcleos de Au, lo cuales adoptaban una geometría compacta y estructura electrónica para satisfacer los llamados números mágicos “n”; donde “n” representa la un número de preferencia de los átomos de Au que se van agregando hasta formar los clusters, para los cuales “n” toma los valores de 8, 18, 21, 25, 28, 32 y 39. De acuerdo a este número mágico, la emisión máxima de fluorescencia aparecía a una u otra longitud de onda en el rango visible e infrarrojo cercano (43).

Hoy en día, los AuNC@GSH ha sido el modelo más estudiado, desde el cual se ha establecido un conocimiento sólido y una mayor comprensión de los fenómenos optoelectrónicos que tienen lugar en la rigurosidad del tamaño sub-nanométrico de los AuNC.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

En 2005, *Laura Fabris y colaboradores* reportaron la preparación de una serie de AuNC protegidos por péptidos ricos en cisteína derivatizados con el ácido R-amino-iso-butírico (Aib). Los tres péptidos fueron diseñados para favorecer las interacciones intermoleculares entre el extremo C-terminal y el N-terminal de cada péptido. Se prepararon los AuNC protegidos con monocapas de péptido (MCP) se sintetizaron a partir de la síntesis de *Brust-Schiffrin* o “síntesis de doble fase”, la cual inicia con la adición de una solución H_{Au}Cl₄ (0,010 g-mL⁻¹) a una solución de bromuro de tetra-N-octil-amonio (0,016 g-mL⁻¹) en tolueno. La mezcla fue agitada durante 15 min hasta que se observó un cambio de coloración en las dos fases de la mezcla. La fase acuosa fue removida de la fase orgánica y posteriormente esta fue deshidratada con Na₂SO₄. Finalmente se adicionaron 5 mL de metanol frío a la fase orgánica lo cual llevo a una pérdida de la coloración que indica la solubilización de los agregados poliméricos [Au-SR] los cuales son reducidos por adición de 5 mL de NaBH₄ (0,02 g-mL⁻¹ en metanol) en frío bajo agitación constante. La mezcla se torna oscura indicando la formación de las monocapas alrededor de los átomos de Au reducidos. Al cabo de 2 horas de la reacción, se adicionaron 40 mL de agua y luego se extrajo nuevamente la fase orgánica por adición de 20 mL de cloruro de metileno. El extracto orgánico fue secado con Na₂SO₄, fue filtrado y evaporado en atmosfera de nitrógeno hasta obtener un sólido de coloración marrón. Se obtuvieron AuNC@MPC con diámetros de partículas en un rango entre 1.1 y 2.3 nm. El sistema de AuNC más pequeño obedece a la conformación de formula promedio Au₃₈NC@NPC₁₈ de acuerdo con los resultados obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados obtenidos empleando técnicas como espectroscopia infrarroja (IR) y Resonancia magnética nuclear de protones (1H-RMN) mostraron que la integridad química del péptido se mantuvo tras la formación de la monocapa. Una de las conclusiones más importantes de esta investigación es que el tamaño de los AuNC esta drásticamente afectado por la relación

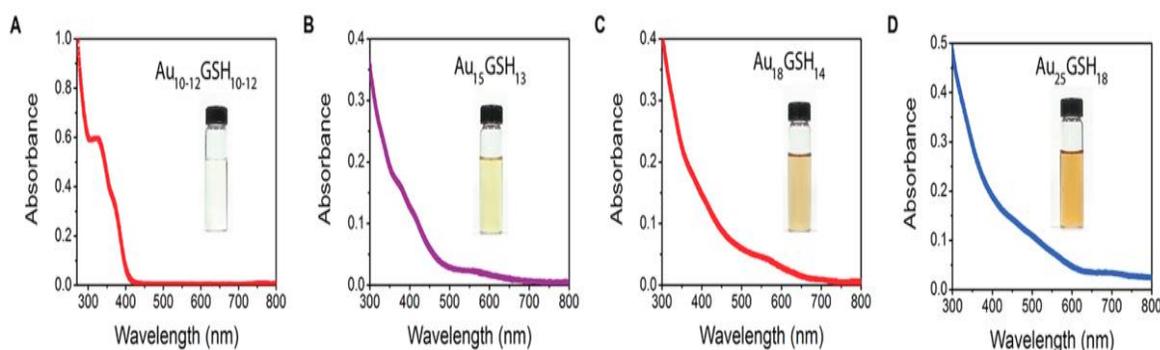
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

molar entre el péptido y la concentración de $[Au^{3+}]$; cuando la relación molar fue de 3:1 se obtuvieron los AuNC@MPC más pequeños. Además, los autores sugieren que cuando se emplean péptidos más estructurados se alcanza una mayor estabilización del nanocluster ya que existe un obstáculo estérico que restringe el empaquetamiento de los Au(0) que conforman el núcleo metálico, a lo que se conoce como “efecto del ligando”.

Una de las investigaciones más reciente y citada es la reportada por *Kevin G. Stamplecoskie y colaboradores* en el año 2014. Como se ilustra en la figura 22, este estudio concluye que AuNC protegidos con glutatión (GSH) exhiben un estado excitado dependiente del tamaño del nanocluster y las transiciones electrónicas. Las rutas de síntesis en este sentido tienen una fuerte correlación con la transferencia de carga del ligando hacia el metal, el tiempo de vida del estado excitado y el comportamiento fotoelectrónico.

Figura 22

Espectros de absorción de los AuNC de diferentes tamaños preparadas a partir del tripéptido



GSH variando el pH y reducción con CO.

Nota. (A) pH 7 (QY~1.65%), (B) pH 9 (QY~3.97%), (C) pH 10 (QY~4.23%), y (D) pH 11 (QY~2.37%). El recuadro en cada cuadro se incluye una imagen de un vial que contiene cada una de las soluciones correspondientes a los AuNC@GSH obtenidos. Tomado de (Stamplecoskie & Kamat, 2014)

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Este estudio mostró que los racimos de AuNC con tamaño decreciente, ($Au_{25} < Au_{18} < Au_{15} < Au_{10-12}$) presentan mayor actividad fotoelectrónica. Los $Au_{25}NC@GSH_{14}$, mostraron mayor potencial fotosensibilizador respecto al rendimiento cuántico por transferencia de electrones y exhiben fuerte absorción de luz visible (41).

En 2015, *Hua Li y colaboradores*, reportaron una ruta sintética usando un péptido sintético relacionado con la hormona del crecimiento-6, designado como GHRP-6. El polipéptido bioactivo actuó como reductor-estabilizador en la síntesis de AuNC con emisión brillante en el rango del verde, los cuales alcanzaron un QY significativamente alto igual al 10,7%. Los $AuNC@GHRP-6$ se obtuvieron en medio acuoso por la adición lenta una solución de NaBr (9,72 mM; 250 μ L) sobre una solución de GHRP-6 (5 mg \cdot mL⁻¹; 3mL) bajo agitación moderada. En esta síntesis, la reducción de los iones Au^{3+} es atribuida a los grupos amina en el polipéptido en una reacción de transferencia de electrones. La intensidad de fluorescencia fue significativamente incrementada por la adición NaBr. Evidenciando el efecto sensibilizador de la fluorescencia sobre los $AuNC@GHRP-6$ un rango entre 0,780 y 9,72 mM. Para entender el efecto del NaBr, se realizó un experimento comparativo con otras sales como el NaF, NaCl y el NaI a la concentración máxima de 9,72 mM y se observó que la intensidad de emisión no varió significativamente, lo cual se atribuye al radio iónico y al carácter metálico de la sal. El análisis por DLS arrojó tamaños hidrodinámicos alrededor de los 35 nm cuando el NaBr fue adicionado y en ausencia de este se registró un tamaño de 45 nm. El tamaño tan elevado en estos sistemas de nanoclusters es atribuido a la esfera de solvatación y el efecto de hidratación que sufre el GHRP-6 más no a el crecimiento del núcleo metálico (H. Li et al., 2017).

Un año más tarde, *Hui Wang y colaboradores* identificaron teórica y experimentalmente una configuración explícita de la estructura de sistemas tipo $AuNC_{24}@Peptide_8$. El péptido fue

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

sintetizado previamente y corresponde a la secuencia, $H_2N-CCYKKKKQAGDVCOOH$, la cual estabilizó fuertemente los *clusters* metálicos a través de interacciones Au-S con los residuos de cisteína. Para simplificar los cálculos, los nanoclusters preparados con este péptido es designado como $Au_{24}(Cys-Cys)$. En este estudio se evidenció que la estructura para este tipo de sistemas estaba formada por un núcleo de Au_{13} con una simetría octaédrica cubierto por dos conformaciones tipo $Au(Cys-Cys)$ y tres motivos $Au_3(Cys-Cys)_2$ en la estructura atómica. También determinaron por cálculos orbital molecular de frontera (FMO) que la estructura electrónica de los $AuNC_{24}(Cys-Cys)_8$ es diferente a la que exhiben los $Au_{24}(SR)_{20}$ siendo “SR” un alquiltiolato. Una vez más se evidencia que el tipo de ligando y la relación molar entre el Au:L determinará el tamaño del núcleo de átomos reducido y por ende el empaquetamiento y estructura electrónica (H. Wang et al., 2016), lo cual corrobora fielmente los hallazgos encontrados por otros autores (Häkkinen, Walter, & Grönbeck, 2006).

En el 2019, *Jyun-Gou You y colaboradores*, publica un estudio sobre el efecto de péptidos catiónicos ricos en cisteína, sobre la síntesis de AuNC fluorescentes inducida por agregación y posterior intensificación (AIEE). Sin embargo, la AIEE inducida por péptidos y sus aplicaciones en biosensores no ha sido muy investigada hasta el momento. En este estudio, los autores usaron un péptido de poli-arginina que favoreció la AIE para dar origen a sistemas $AuNC@GSH-PolyArg$ a través de interacciones electrostáticas. Como resultado, los $[AuNC@GSH]-PoliArg$, mostró un incremento en la emisión de fluorescencia 3,5 veces más que la emisión exhibida por los $AuNC@GSH$. El rendimiento cuántico aumento hasta 10 veces con un aumento de 2,1 veces el tiempo de vida media de la fluorescencia. También se observó un desplazamiento de ~8 nm de la longitud de onda de máxima emisión. La ruta de síntesis propuesta partió de una solución acuosa de $HAuCl_4$ (200 mM; 1 mL) la cual fue mezclada con una solución de GSH (100 mM; 0,4 ml) y

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

se completó el volumen hasta 10 mL adicionando agua ultrapura bajo agitación suave. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, se tomaron 7 mL de los complejos de Au (I)-GSH preformados y se adicionaron a una solución acuosa de GSH (100 mM; 2mL). Inmediatamente, la mezcla fue calentada a 70° C durante 24 h. Una vez formado los AuNC@GSH fueron diluidos en diferentes soluciones buffer HEPES (50 ml, 100 mM; pH 4,0-10,0). De estos ensayos se pudo concluir que la Poli-Arg induce fácilmente la AIE a una longitud de onda de emisión de 619 nm comparado con el efecto de un polipéptido neutro como la poli-treonina y un polipéptido aniónico como el poli-glutamato. La agregación progresiva de los AuNC@GSH es beneficiada a valores de pH ácidos (pH 2-4), dando lugar a una fuerte atracción electrostática entre los AuNC@GSH cargados negativamente y la poli-Arg mayoritariamente cargada positivamente a estos valores de pH (You & Tseng, 2019).

El interés en los AuNC por parte de la comunidad científica es notable y constante. Sin embargo, su aplicabilidad en el campo de los biosensores se ve comprometida a la hora de elegir ligandos y rutas sintéticas que garanticen no solo la baja toxicidad de los AuNC sino también la función de reconocimiento y especificidad por un target conferida por el ligando. Este hecho ha incentivado el estudio y profundización de las interacciones moleculares que ocurren entre los AuNC y los ligandos, y subsecuentemente el comportamiento de todo el sistema, AuNC-Ligando en la detección y diagnóstico por reconocimiento de un target específico. Diferentes investigaciones han logrado obtener sistemas de nanoclusters con una elevada fotoestabilidad, alta eficiencia de fluorescencia, y han determinado variables de control en la síntesis que podrían modular la estructura de los AuNC con una elevada precisión. Sin embargo, la fabricación de estos sistemas compromete rutas sintéticas de elevada rigurosidad y precisión a nivel atómico, sumado al desarrollo de técnicas analíticas y de caracterización de alta confiabilidad y robustez a nivel

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

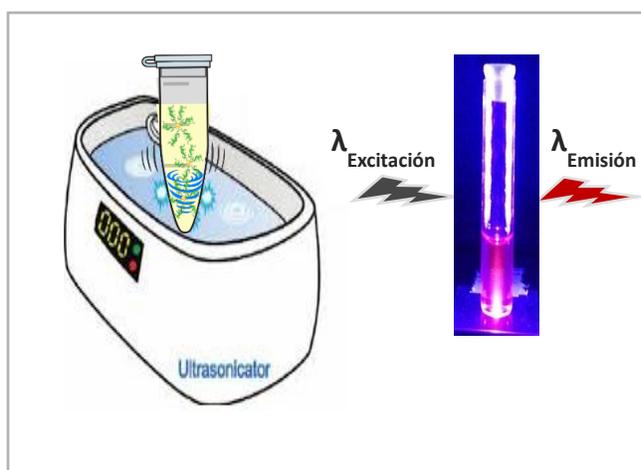
atómico y así alcanzar la elucidación completa e inequívoca de dichas estructuras. Estos desafíos aún no han sido superados y requieren de la investigación para reunir más información con el fin de comprender y controlar las mínimas variaciones en el número de átomos del núcleo metálico y las moléculas de ligando, las cuales determinan el tamaño y el confinamiento cuántico que da origen a las propiedades de dichos sistemas.

3.4 Metodología de la síntesis “in situ” de AuNC basados en los PepHLec

Recopilando datos y resultados en síntesis previas AuNC, se estableció una ruta sintética asistida por ultrasonido, esto con el fin de homogenizar la mezcla evitando las agregaciones entre las moléculas del péptido y de este modo asegurar mayor disposición espacial del péptido estructurado y así asegurar la mayor interacción entre las cadenas laterales del péptido y los iones de Au^{3+} en solución. En la figura 23, se ilustra la síntesis de AuNC asistida por ultrasonido usando los péptidos sintéticos como plantilla.

Figura 23

Síntesis de AuNC basado en PepHLec,



Nota. Ruta asistida por Ultrasonido a una frecuencia de 50 Hz en 2 ciclos de 10 min cada uno. La temperatura de la reacción se mantuvo a 40°C. En el esquema se incluye un recuadro con un vial que contiene uno de los sistemas de AuNC@PepHLec luminiscentes obtenidos.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

La frecuencia del ultrasonido fue fijada a 50Hz y fue operado en 2 ciclos de 10 min cada uno; el primer ciclo inicio una vez adicionado una solución del Péptido (250 μ L; 3 mM) sobre una solución de H₂Cl₄ (250 μ L; 1mM), una vez concluidos los 10 min, se adicionó el borohidruro de sodio en diferentes relaciones volumétricas para garantizar la reducción completa de los iones Au³⁺ y se procedió con el segundo ciclo de 10 min; la temperatura del ensayo se mantuvo alrededor de los 40°C. Las concentraciones del Péptido y del H₂Cl₄, así como el volumen de NaBH₄ fueron establecidas de acuerdo con el análisis de variación de estos parámetros como es descrito más adelante. Se seleccionó el péptido PepHLec2854 (H₂N-HYSRTENMGTSNAC-COOH) para llevar a cabo los ensayos preliminares y así establecer las mejores condiciones de síntesis respecto a la relación molar (Au³⁺: péptido) y relación volumétrica (NaBH₄:Au³⁺) la cuales han sido consideradas como las más influyentes en los métodos de síntesis reducción química para la formación de sistemas nanoestructuras y para el control de su tamaño. La elección de este péptido se basó en la disponibilidad del residuo de cisteína en el extremo C-terminal de la secuencia; considerando que la síntesis de péptidos en fase solida por la estrategia del grupo FMoc con Resina Rink-MBH₄ descrita en el Capítulo 2, da lugar a péptidos amidados en su extremo N-terminal, de acuerdo con esta observación se presume que el grupo tiol (-SH) presente en la cadena lateral de la cisteína será más lábil y reactivo para interactuar fuertemente con el Au coloidal como ya se ha demostrado en otros estudios la elevada afinidad del Au por el Azufre (Goswami, Lin, et al., 2016; Kumar et al., 2012; Yuan et al., 2011).

Una vez establecidas las mejores condiciones de síntesis para obtener AuNC@PepHLec2854 fluorescentes, se realizó la síntesis bajo los mismos parámetros de dos sistemas más de AuNC, usando como plantilla los péptidos PepHLec2855 y PepHLec2856 cuya

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

secuencia aminoacídica fue [H₂N-KTFLKICKRPYVPSEP-COOH] y [H₂N-INKQGDVTVLSNGNTQLT- COOH] respectivamente.

3.4.1 Variación de Algunos Parámetros en la Síntesis de AuNC@PepHLec.

De acuerdo con la literatura, los parámetros más influyentes en el tamaño y estructura electrónica de los AuNC tiolados son: la relación molar entre los iones Au³⁺ y el ligando tiolado (Fabris et al., 2006; Häkkinen et al., 2006); la relación volumétrica entre el agente reductor (NaBH₄) respecto a los iones Au³⁺ (Ding et al., 2015; Joseph & Geckeler, 2014) y adicionalmente, en este trabajo realizamos un ensayo para determinar la concentración de HAuCl₄ de partida necesaria para obtención de AuNC fluorescentes.

3.4.1.1 Efecto de la concentración de HAuCl₄. Para establecer el efecto de la concentración de iones Au³⁺ en el proceso de reducción asistido por Ultrasonido (10 min x 2 ciclos) se fijaron las concentraciones y volúmenes adicionados del del PepHLec2854 (3,0 mM;250 µL) y la mínima concentración recomendada para el NaBH₄ (50 mM;2,5µL) las cuales permanecieron constantes en este ensayo. Por el contrario, se varió la concentración de HAuCl₄ en un rango entre 0,5 a 3,0 mM en ensayos separados para cada concentración testeada. Se registraron los espectros UV-Vis para cada uno de los ensayos con el fin de hacer un seguimiento a la aparición o ausencia de la banda de SPR característica del Au nanoestructurado, que será discutido en la sección de Análisis de Resultados.

3.4.1.2 Efecto de la Relación molar de Péptido respecto a los iones Au³⁺. Una vez corroborado que la concentración más adecuada de partida de la sal precursora del Au, el HAuCl₄ fue 1,0 mM, basado en el análisis de los UV-Vis obtenidos en el ensayo descrito anteriormente (3.4.1.1). Se realizaron variaciones en la concentración del PepHLec2854 en un rango de 1 a 12 mM, manteniendo la adición de NaBH₄ (50 mM;2,5 µL) contante para cada ensayo. Los espectros

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

UV-Vis y de Emisión fueron adquiridos y analizados como se muestra en la sección de Análisis de Resultados.

3.4.1.3 Efecto en la relación volumétrica del agente reductor (NaBH_4) respecto a los iones Au^{3+} . Para realizar estos experimentos, se mantuvo constantes a concentración de HAuCl_4 (1,0 mM; 250 μL) y del PepHLec2854 (3,0 mM; 250 μL) mientras se iban adicionando diferentes volúmenes de una solución de NaBH_4 (50 mM). Las relaciones volumétricas empleadas en fueron 1:100; 1:50; 1:30; 1:10 en tres ensayos separados. Se adquirieron los espectros absorción empleando la técnica de UV-Vis y los espectros de emisión para cada uno de los ensayos realizados.

Finalmente, se tomaron las mejores condiciones de síntesis para obtener los demás sistemas de AuNC: AuNC@PepHLec2855 y AuNC@PepHLec2856. Una vez finalizada la síntesis, cada una de las suspensiones de nanoestructuras fueron purificadas por centrifugación en filtro de Amicón de 1 kDa a 14000 rpm y 10°C con 3 lavados sucesivos usando agua desionizada. El sobrenadante fue inmediatamente suspendido en el mismo 500 μL de agua tipo I.

3.4.2 Determinación de propiedades fisicoquímicas de AuNCs

Diferentes técnicas analíticas han sido empleadas para caracterizar y estudiar los AuNC; la mayoría de estos métodos son espectrofotométricos, los cuales han permitidos analizar sus propiedades ópticas y establecer su dependencia respecto al tamaño, composición y rutas sintéticas. La elucidación de la estructura a escala atómica y molecular es necesaria a la hora de optimizar los parámetros más influyentes en la síntesis, reproducir la preparación manteniendo las mismas propiedades una vez formados estos sistemas, estudiar y entender los mecanismos de formación y el comportamiento en términos cuánticos y energéticos de dichos sistemas.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

3.4.2.1 Análisis del comportamiento plasmónico por espectroscopía UV-Vis. Como es sabido, las nanopartículas en un rango de tamaño entre 5-100 nm exhiben un pico de absorción en el UV-Vis correspondiente a la banda de SPR que en el caso del Au coloidal se encuentra alrededor de los 520-540 nm. En este sentido, en los espectros de absorción UV-Vis de nanoestructuras ultrapequeñas de oro (< 2,5 nm) hay la ausencia de esta banda o una presencia drásticamente atenuada. Adicionalmente, se puede realizar un seguimiento de los agentes reductores o ligandos que estabilizan los AuNC durante el proceso de síntesis y así obtener información útil sobre la reacción.

Para realizar este análisis, los espectros de absorción de cada una de las nanoestructuras obtenidos usando cada uno de los péptidos sintéticos fueron adquiridos en un espectrómetro UV Perkin Elmer en un rango espectral de 300-800 nm empleando una microcelda con capacidad para 100 μ L y un paso óptico de 0,1 cm. Este análisis preliminar y comparativo por espectroscopía UV-Vis permitió establecer las condiciones adecuadas de la síntesis respecto a la concentración del agente reductor (NaBH_4), la relación molar entre el péptido y la sal precursora de oro (HAuCl_4) y así establecer su efecto en la formación de AuNC estables.

3.4.2.2 Análisis de las propiedades fotoluminiscentes por espectroscopía de fluorescencia. Para el conocimiento exhaustivo del comportamiento fotoluminiscente de los AuNC se ha recurrido al análisis estructural y fisicoquímico de los nanoclusters obtenidos por diferentes métodos de síntesis de forma paralela. Hasta el año 2000, se consideraba que el origen de la fluorescencia en los AuNC era solo el resultado de la recombinación radiactiva de los electrones libres por debajo del nivel de Fermi con los huecos en las bandas “d” de los núcleos de Au(0) y no se contaba con detalles claros del efecto del tamaño nanométrico en dichos sistemas. Actualmente, se tiene evidencia de la dependencia de la fluorescencia del número de átomos que

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

conforman el cluster metálico (Zheng et al., 2012). Se han reportado longitudes de onda de emisión a 385 nm para Au₅@PAMAM, 456 nm para Au₈@PAMAM, 510 nm para Au₁₃@PAMAM, 781 nm para Au₂₃@PAMAM y 879 nm para Au₃₁@PAMAM (Zheng, Zhang, & Dickson, 2004).

En este sentido, el análisis de la fotoluminiscencia de los tres sistemas de AuNC@PepHLec2854, AuNC@PepHLec2855, AuNC@PepHLec2856 se basó en la recolección de espectros de emisión usando diferentes longitudes de onda de excitación en un rango de 310 a 350 nm; partir de los cuales se logró determinar la longitud de onda de máxima emisión.

Para calcular el QY fue empleando como patrón de referencia fluoresceína ($\lambda_{\text{emisión}}$ 525 nm) y cresil violeta ($\lambda_{\text{emisión}}$ 650 nm) de acuerdo con el espectro de emisión de los AuNC obtenidos. Las medidas se realizaron en un espectrofluorímetro Marca *Photon Technology International* (PTI) Modelo QM40 con lámpara de Xenón y detector fotomultiplicador 814. Las muestras de NC se depositaron en un microcelda de cuarzo de capacidad de 250 μL con un paso óptico de 1.0 mm. Los espectros fueron adquiridos en un tiempo de integración de 1,0 nm \cdot s⁻¹.

3.4.2.3 Análisis de tamaño hidrodinámico por dispersión de la luz en modo dinámico (DLS). La dispersión de la luz en modo dinámico (DLS) es una técnica óptica que mide el diámetro hidrodinámico de nanoestructuras en solución y proporciona información sobre el estado de agregación de éstas. El DLS mide la luz dispersada por un láser que pasa a través de una solución coloidal y por analizando la modulación de la intensidad de la luz dispersa en función del tiempo, el tamaño hidrodinámico de se pueden determinar partículas y aglomerados de partículas. Las partículas más grandes se difundirán más lentamente que las más partículas pequeñas, luego el instrumento mide la dependencia la luz dispersada en función del tiempo para generar una función de correlación que se pueda solucionar matemáticamente el tamaño de partícula.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Los tres sistemas de AuNC@PepHLec en suspensión acuosa fueron analizados por la técnica de DLS para conocer su tamaño hidrodinámico. En este caso, 100 μL de cada muestra de nanoestructuras fueron diluidos con agua desionizada hasta un volumen de 500 μL y colocadas en una microcelda de polipropileno para volumen reducido para finalmente ser analizadas en un Zetasizer Nano Z90 (Malvern) equipado con un láser Nd-YAG de 635 nm con un ángulo de 90° operado a 60 *scans* cada 60 segundos con un tiempo de relajación de 5 min entre cada medición y control de temperatura a 19°C . Las mediciones fueron tomadas por triplicado para cada uno de los AuNC@PepHLec sintetizados. Cada uno de los histogramas con la distribución de tamaños ha sido consignado en la sección de Anexo E.

3.4.2.4 Determinación del Potencial Zeta de los AuNC@PepHLec. El potencial Zeta (ζ) una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las nanoestructuras y es un valor utilizado comúnmente para caracterizar la carga superficial en ellas. Este parámetro fundamental se relaciona con la estabilidad coloidal y se mide en milivoltios (mV); las estructuras con $+30\text{ mV} < \zeta < -30\text{ mV}$ han demostrado ser estables en suspensión. Dado que la carga superficial en los AuNC es conferida por el ligando que protege el “core” de átomos de Au(0) resulta ser importante determinarlo, ya que el potencial zeta de una suspensión acuosa evidencia la estabilidad termodinámica soportada por las especies cargadas que se encuentran absorbidas en su superficie de las nanoestructuras. Esta medida está relacionada con la movilidad electroforética de partículas en suspensión por acción de una diferencia de potencial.

De este modo, la determinación de los valores de potencial zeta de lo AuNC@PepHLec2854, AuNC@PepHLec2855, y AuNC@PepHLec2856 se llevó a cabo un Zeta-metro integrado en el mismo equipo Zetasizer Z90 descrito anteriormente. Para este análisis, se usó una celda capilar para potencial zeta de polipropileno (FFR-DTS1070), la cual fue llenada con

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

la solución de AuNC con ayuda de una jeringa hasta completar el volumen total 1,0 mL con una diferencia de potencial estándar aplicado de 20 mV previamente recomendado para la medición en sistemas acuosos. Los resultados de este análisis han sido incluidos en la sección de Anexo F.

3.4.3 Estudio de la Estructura Atómica y Molecular de los AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855

Los siguientes análisis para elucidar la estructura atómica y molecular se realizaron únicamente sobre los sistemas nanoestructurados que exhibieron propiedades luminiscentes, en este caso de los tres PepHLec diseñados y sintetizados solo los péptidos PepHLec2854 y PepHLec2855 fueron elegidos para continuar con la caracterización estructural y molecular usando las diferentes técnicas de análisis implementadas y mencionada a continuación. Dado que en esta investigación nuestro interés prevalecía por aquellas nanoestructuras fluorescentes basadas en PepHLec que permitieran desarrollar un prototipo biosensor basado en fluorescencia, lo cual será abordado y discutido en profundidad en el Capítulo 4. En este caso, las nanoestructuras obtenidas usando el péptido PepHLe2856 fueron descartadas de aquí en adelante de acuerdo con la discusión planteada en la siguiente sección del análisis de resultados de las propiedades optoelectrónicas.

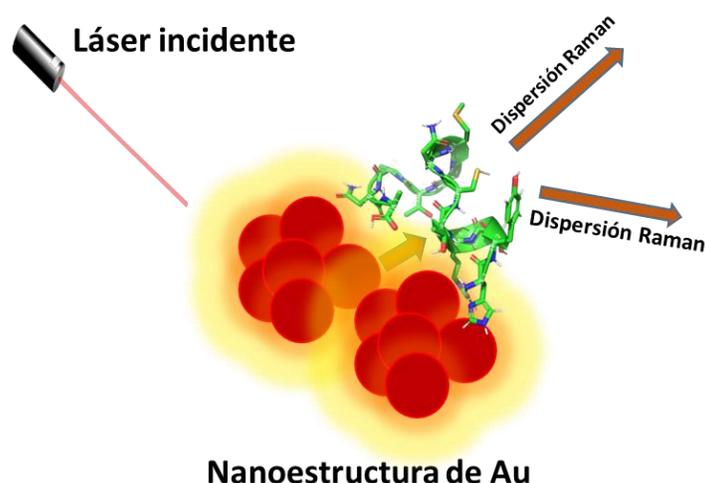
3.4.3.1 Análisis por espectroscopía Raman intensificada por efecto de superficie (SERS). La espectroscopía Raman es una técnica espectroscópica que se basa en la dispersión inelástica de la luz, donde la frecuencia de los fotones puede cambiar en función de su interacción con la muestra. La luz reemitida tiene una longitud de onda más larga o corta en comparación con la longitud de onda incidente sobre la muestra, a lo que se denomina efecto Raman (G. Yang, Nanda, Wang, Chen, & Hallinan, 2017). Utilizando la información derivada de este cambio, se pueden inferir varios parámetros relacionados con las frecuencias vibratorias, rotacionales y por tanto con los grupos funcionales presentes en las moléculas. Es bien conocido que las

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

nanoestructuras de metales nobles (Au, Ag y Cu) que al interactuar con el analito da origen a los llamados "puntos calientes" locales en la superficie del *cluster* metálico, lo cual pueden mejorar la intensidad de las señales Raman; a lo que se conoce como SERS, ilustrado en la figura 24 (Hong & Li, 2013).

Figura 24

Efecto SERS de una AuNP con un péptido



Sin embargo, el efecto intensificación producido por las nanoestructuras puede variar según el tamaño de partícula y el entorno (Manikas, Causa, Della Moglie, & Netti, 2013). En este sentido, el análisis por espectroscopia Raman resulta ser indispensable para determinar y corroborar las modificaciones que tienen lugar en la superficie de los AuNC por efecto del ligando respecto al ligando libre. Este análisis permitió monitorear los desplazamientos, intensidad y desaparición de diferentes modos vibracionales atribuidos a los grupos funcionales en las cadenas laterales de los péptidos involucrados en la interacción directa con la superficie de los AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855 o en su vecindad más próxima.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Bajo estas consideraciones, para este estudio se dispuso 4,0 μL de cada muestra de los AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855, se dejaron secar a en un desecador hermético con flujo de N_2 durante 2 horas. Las muestras completamente secas fueron analizadas el en un espectrómetro Raman marca Horiba Scientific con referencia LabRam HR Evolution equipado con una con microscopio confocal con tiempos de integración CCD de hasta 1 ms por punto. El equipo fue previamente calibrado con una oblea de silicio a una longitud de onda de 520 nm. Los parámetros de adquisición de los espectros Raman fue de 20 *scans* cada 2 segundos, láser incidente con longitud de onda de 532 nm, usando un objetivo de 100X y una rendija de 600 μm .

3.4.3.2 Análisis por espectroscopía de fluorescencia de Rayos X. Los experimentos XPS se llevaron a cabo con la plataforma de caracterización de superficies XPS/ ISS/UPSA Centeno construida por SPECS (Alemania). La plataforma está provista de un analizador de energía PHOIBOS 150 2D-DLD. Para las mediciones se utilizó una fuente de rayos-X Al- $K\alpha$ monocromática (FOCUS 500) operada a 100 W. La energía de paso del analizador hemisférico se fijó en 100 eV para los espectros generales y en 60 eV para espectros de alta resolución.

Las muestras de AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855 en estado sólido fueron montadas sobre una cinta conductora de carbono y dispuestas en un portamuestras metálico de acero inoxidable para el análisis provisto por el fabricante SPECS. La compensación de la carga superficial se controló para algunas muestras utilizando un *Flood Gun* (FG 15/40-PS FG 500).

Las regiones analizadas para las muestras fueron: C 1s, O 1s, N 1s, Si 2p, S 2p+Si 2s, F1s, Cl 2p, Au 4f. Al final de cada análisis se grabó de nuevo la región C 1s para verificar la evolución de la carga superficial de las muestras durante el análisis. Los espectros XPS fueron procesados en el software CasaXPS (V2.3.16). La composición se calculó a partir de las áreas experimentales que fueron corregidas por los factores de sensibilidad teniendo en cuenta la fotoionización de

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Scofield, parámetros de asimetría y función de respuesta de la intensidad/energía de enlace. Finalmente, la escala de energía de enlace (BE) de los espectros fue corregida tomando como referencia el componente de C 1s (C-H) a 284,8 eV.

3.4.3.3 Elucidación de la estructura molecular empelando espectrometría de masas.

Como se ha mencionado en este capítulo, la intensidad de la fluorescencia, el rango de radiación electromagnética donde tiene lugar la emisión son propiedades que están estrechamente afectadas por la cantidad de átomos de Au que conforman el núcleo metálico, las especies de Au(I) que estabilizan el núcleo y la cantidad de moléculas de ligando unidas a la superficies de los AuNC y estabilizan la estructura electrónica y son responsables del comportamiento *quasi-molecular* de estos sistemas sub-nanométricos. Por lo tanto, la espectrometría de masas es una de las técnicas más confiables y precisas ampliamente utilizada para elucidar la estructura molecular, el número de átomos de Au y el número los ligandos protectores. Los dos métodos empleados para el estudio de AuNC es la espectrometría de masas con ionización por *Electrospray* (ESI-MS) y espectrometría de masas con ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS) con analizador de tiempo de vuelo (TOF), siendo esta ultima la más utilizada ya que permite la ionización y desorción suave por acción de una fuerte de radiación Láser, por lo que los target s son transferidos intactos a la fase gaseosa (Bhattarai et al., 2015; Pilolli et al., 2014). La muestra es co-cristalizada con un exceso de matriz que en términos generales son moléculas orgánicas de bajo peso molecular con una fuerte absorción en la longitud de onda del láser que “solubilizan” la muestra sin que ocurra reacción química más allá de la transferencia de electrones o protones (Dave, Headlam, Wallis, & Gorman, 2011).

Los espectros MALDI-TOF fueron obtenidos empleando como matriz una solución saturada de ácido α -hidroxi-cinámico (HCCA) en ACN: H₂O (50:50) con un 0.01% TFA. Las

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

muestras de AuNC fueron preparadas de acuerdo con uno de los protocolos preparativos más conocidos para MALDI, llamado “doble capa” (*double layer*). Se aplicó una delgada capa de matriz de 0,5 μL (capa 1) con una micropipeta en uno de los spot del portamuestras para MALDI, y se dejaron secar a temperatura ambiente, se colocó una segunda capa de otros 0,5 μL , que consistió en un premezcla entre cada una de las nanoestructuras de oro (AuNC@Pep2854 y AuNC@PepHLec2855) y la matriz en una relación volumétrica 1:1 (Bruker, 2015). Una vez seca, se introdujo en el equipo para la toma de espectros. Los espectros de masa se adquirieron por el método de Reflectron en modo positivo, con una afluencia del láser del 70% y en un rango de masa de 1,5-20 kDa (Pomastowski & Buszewski, 2019).

Cada espectro fue procesado en el software *flexAnalysis 3.3*. usando herramientas de fácil manejo y algoritmos altamente sofisticados para arreglo de línea base, suavizado, detección automatizada e interactiva de picos (SNAP, Centroid y Sum peakfinder), recalibración de espectros (*linear, quadratic, quadraticenhanced, High Precision Calibration, statistical and iCalsupport*) para el postratamiento de espectros MALDI-TOF.

3.4.4 Determinación del tamaño y morfología de los AuNC@PepHLec2854 por Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM)

El tamaño de partículas y la morfología son los factores muy importantes determinan las propiedades electrónicas, ópticas y catalíticas de las AuNC. TEM es una técnica robusta y sofisticada que se utiliza con frecuencia para determinar el tamaño y la forma de las nanoestructuras aun a nivel sub-nanométrico. Sin embargo, TEM tiene cierto error experimental sobre alrededor de 0.2 nm en el valor registrado y que el haz de electrones operado a un voltaje elevado (>200 kV) genera calor intenso lo cual pueden desintegrar o fundir los AuNC más pequeños. En los últimos años, se ha implementado un modo de operación que se conoce como

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

HR-TEM o TEM de alta resolución, el cual requiere de un microscopio de transmisión que incluye correctores para la aberración esférica y cromática, logrando alcanzar una resolución de hasta $0,8\text{\AA}$, lo cual puede brindar resultados más precisos sobre las características estructurales de las AuNC. A estas escalas de tamaños tan pequeños se pueden obtener imágenes, de átomos individuales y hasta analizar defectos cristalinos.

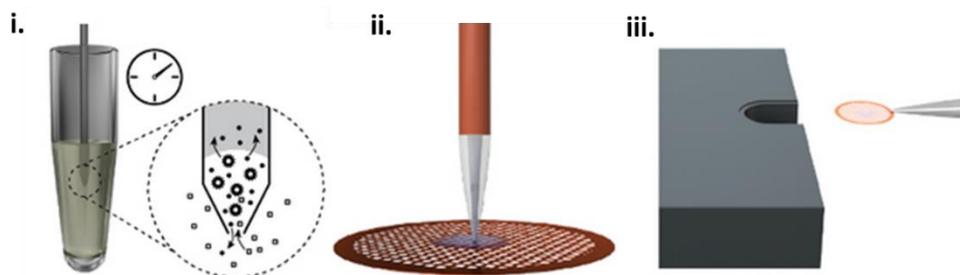
Para determinar la morfología y tamaño de los sistemas de AuNC obtenidos en esta investigación fue empleado un Microscopio *FEI Tecnai G² F20* de alta resolución para análisis TEM/STEM, el cual puede ser operado 60-200 kV en modo TEM o 60-300 kV para STEM , equipado con correctores de aberraciones de sonda e imagen, y una cámara CMOS de alta velocidad, espectrómetro HREELS y detector de rayos X (EDAX) con ventana ultra delgada que permite hasta 136 eV de resolución y con un sistema *Focus Ion Beam* (FIB) para acondicionamiento de la muestra previo al análisis TEM, que consiste en un haz focalizado de iones de Galio para obtener laminas delgadas de los AuNC sobre estructuras nanométricas lo cual mejora la conducción y por tanto mejora el análisis.

Para obtener las micrografías STEM de los AuNC@PepHLec2854, se siguió un protocolo preparativo de muestra para TEM como se describe a continuación: (i) se tomaron $3.0\ \mu\text{L}$ de solución de AuNC con una jeringa capilar, (ii) los cuales fueron depositadas como una gota en una rendija o *grid* de Cobre de 200 mesh x $250\ \mu\text{m}$; se dejaron secar en una cámara con flujo de nitrógeno y presión reducida, (iii) y finalmente se colocaron en un soporte al interior del equipo para su respectivo análisis como es ilustrado en la figura 25.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 25

Método preparativo para análisis por STEM.



Nota. Entre 3-4 μL de muestra son dispuestos por goteo en un *grid* para TEM, luego del secado de la gota, el *grid* se dispone en el soporte o porta muestras al interior del microscopio. Adaptado de (Schmidli et al., 2018).

Este paso metodológico fue realizado durante una estancia doctoral en el Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) en colaboración con el grupo de *Nanobiosensor and Bioanalytical Applications* (NanoB²A) de la Prof. Laura M. Lechuga, líder del grupo.

3.5 Análisis de Resultados de la Síntesis de AuNC Usando los PepHLec.

3.5.1 AuNC@PepHLec

Inicialmente, se escogieron los parámetros de síntesis adecuados en cuanto a la concentración de HAuCl_4 , relación molar del péptido a iones Au^{3+} y la relación volumétrica del agente reductor (NaBH_4) respecto a la concentración de los iones Au^{3+} . Estos parámetros fueron escogidos de acuerdo con la literatura, donde se ha reportado como los más influyentes en la formación de sistemas de AuNC fluorescentes. La ruta de síntesis asistida por un sonicador de Ultrasonido que fue operado a una frecuencia de 50 Hz, durante 2 ciclos de 10 min cada uno; en el primer ciclo se hizo una premezcla entre el PepHLec2854 y la sal de oro, y en el segundo ciclo fue adicionado el NaBH_4 desde una solución fría. La temperatura de la síntesis se mantuvo a $\sim 40^\circ\text{C}$. Inmediatamente adicionado el NaBH_4 se observó un cambio en la coloración de la mezcla desde un amarillo pálido a un tono café más intenso en la medida que la concentración de HAuCl_4

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

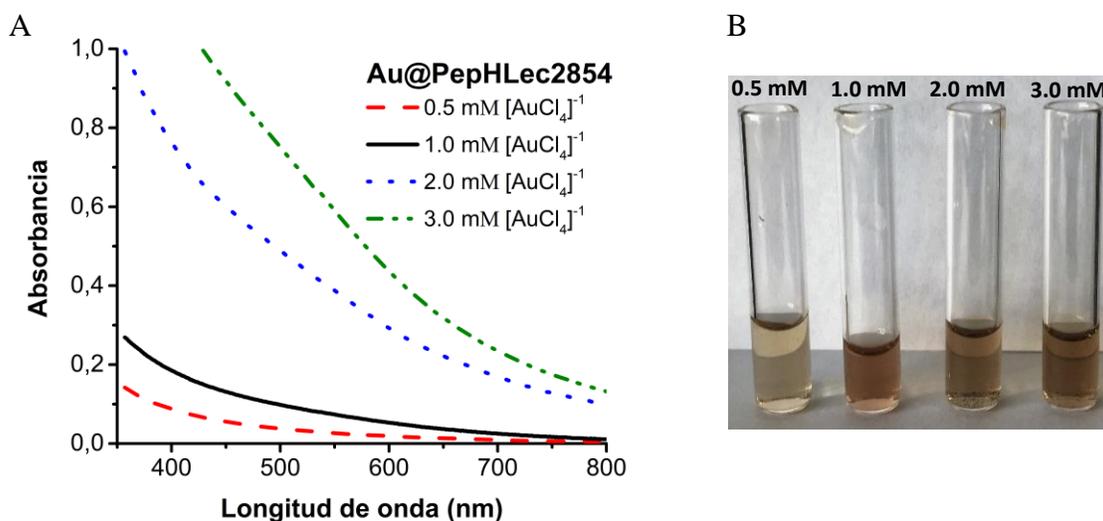
se fue incrementando (Figura 1B) y cuanto más volumen de agente reductor fue adicionado (figura 2B) en cada uno de los ensayos realizados. Esta coloración se atribuye a la reducción de Au y consecuentemente a la formación de sistemas nanoestructurados, la intensidad de la coloración café es resultado de la concentración de Au coloidal proporcional a la concentración inicial de iones Au^{3+} y en el caso de la adición de mayor volumen de NaBH_4 , que al estar en exceso va a asegurar la reducción de mayor cantidad de iones Au^{3+} disponibles. Sin embargo, al ser un agente con alto poder reductor permite que los procesos de nucleación prevalezcan por encima de los procesos de crecimiento en la formación de las nanoestructuras; es por esta razón que un gran número de rutas sintéticas para la formación de AuNC incluyen la adición de pequeñas cantidades de NaBH_4 .

Para el análisis preliminar de los parámetros más adecuado de síntesis, se adquirieron los espectros UV-Vis de cada uno de los ensayos programados. En figura 1 se puede evidenciar el efecto de la concentración de partida del HAuCl_4 , en donde se mantuvo constante la $[\text{PepHLec2854}]$ igual a 3,0 mM y se adicionó 2,5 μL de una solución de NaBH_4 (50 mM). Como se ha recomendado en muchos estudios previos, la concentración de partida de iones Au^{3+} se fijó a 1.0 mM, para garantizar que el número de nanopartículas formadas no superen la capacidad de solvatación del solvente y tenga lugar una suspensión coloidal altamente estable. Como se muestra en los espectros de absorción de la figura 26, concentraciones superiores a 1.0 mM aumentan el ancho de banda de absorción correspondiente a las transiciones “d-d” del complejo $[\text{AuCl}_4]^{-1}$ y la absorbancia de la muestra sale del rango dinámico lineal del detector.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 26

Espectros UV-Vis de AuNC@PepHLec2854 con diferentes concentraciones del precursor de Au.



Nota. [Condiciones: 3mM PepHLec2854; 2.5 μL NaBH_4] a diferentes concentraciones de AuCl_4^{-1} .

Respecto a la banda de absorción de los plasmones de Au nanoestructurado, se observa una ausencia de la SPR, lo cual podría inferir que las partículas allí contenidas tienen tamaños sub-nanoméricos que como lo hemos mencionado anteriormente, infieren el comportamiento “quasi molecular” de los AuNC. La intensidad en la coloración café está relacionada con la formación de nanoestructuras con un mayor número de Au(0) conformando el núcleo metálico lo cual las hace más eficiente respecto sus propiedades de absorción en el ultravioleta.

Por otra parte, la variación del volumen de NaBH_4 adicionado mostró cambios más significativos no solo cualitativos en cuanto a las diferentes tonalidades de la solución resultante, sino en el comportamiento espectral. Es bien conocido que los cambios distintivos en la coloración implican el crecimiento de los clústeres en la reacción, lo cual involucra un control cinético establecido por el reductor empleado y su concentración en el medio como se puede notar en la figura 2B. Es importante mencionar que aunque el NaBH_4 es un agente con alto poder reductor, dando lugar a rutas de síntesis muy rápidas que dificultan el control cinético, se ha recomendado

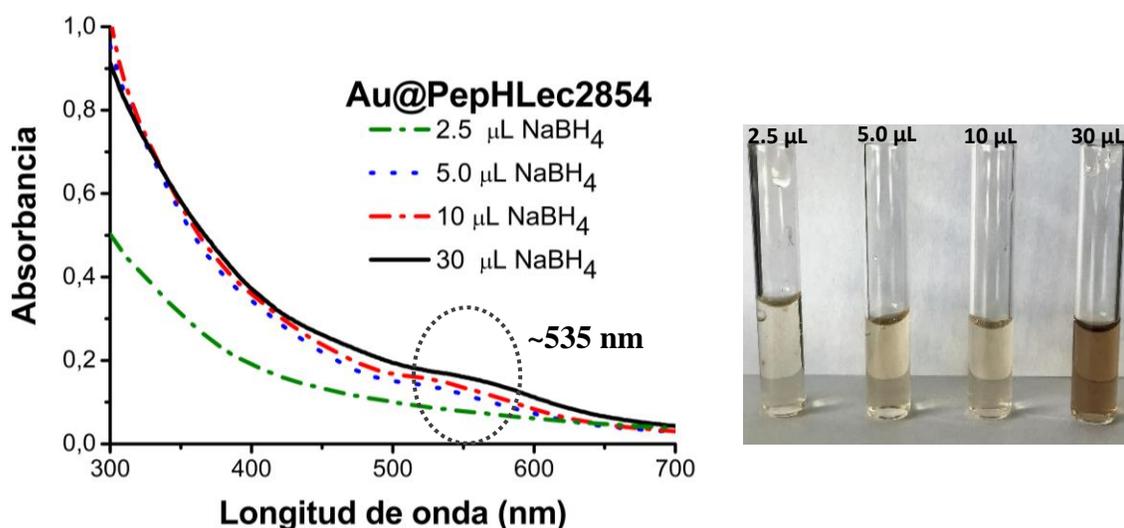
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

usar bajas concentraciones de este para reducir la velocidad de reducción de los complejos Au(I)-PepHLec2854 y que se facilite una mayor pasivación y protección de los AuNC de menor tamaño formados en la etapa inicial de crecimiento, dando lugar a AuNC más estables (Wu, MacDonald, Chen, Zhang, & Jin, 2011).

En la figura 27, se puede observar que la banda de SPR del oro sigue estando ausente en los sistemas de AuNC en donde se usaron 2,5 y 5,0 μL de agente reductor; lo cual nuevamente se relaciona directamente con el tamaño sub-nanométrico y con la presencia de complejos Au(I)-PepHLec2854 no reducidos que estabilizan el núcleo de Au(0).

Figura 27

Espectros UV-Vis de AuNC@PepHLec2854 sintetizados a partir del PepHLec2854 con variación de la relación volumétrica del agente reductor.



Nota. [Condiciones: 3mM PepHLec2854; 1mM AuCl⁻¹₄] adicionando diferentes volúmenes de NaBH₄ (~50 μM).

Sin embargo, para volúmenes de NaBH₄ más altos (10-30 μL) se observa la aparición de un hombro de absorbancia alrededor de 545 nm, lo cual podría estar indicando que en los sistemas de AuNC@PepHLec2854 bajo estas condiciones se evidenció un aumento de tamaño y por tanto un comportamiento plasmónico característico de las nanopartículas. El levantamiento de la curva

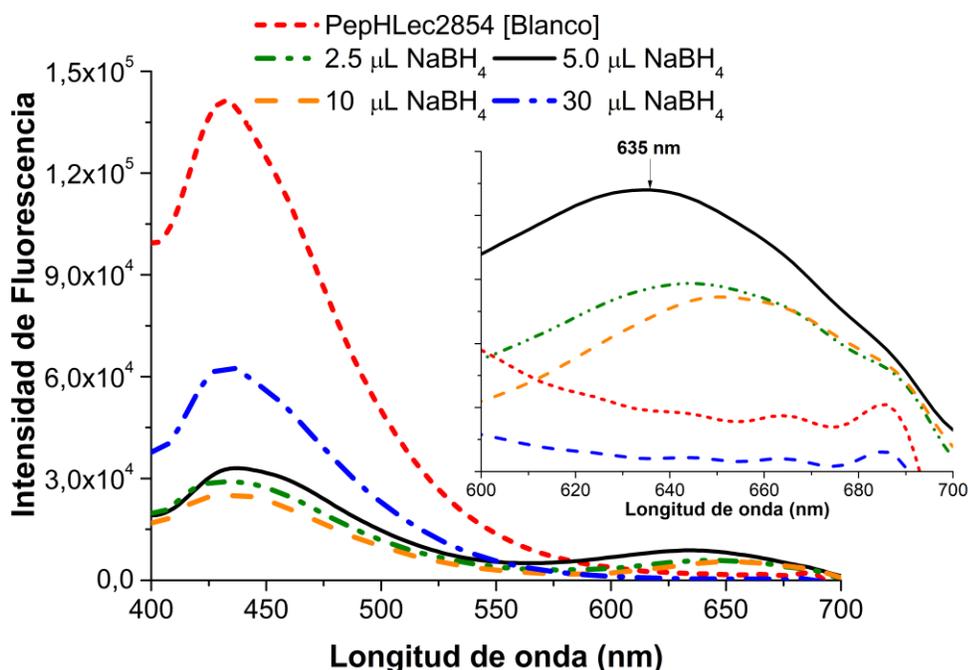
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

de absorción alrededor de los 535 nm es consecuencia de las transiciones interbandas, $Au(5d) \rightarrow Au(6sp)$, de los núcleos reducidos $Au(0)$ en el núcleo metálico (H. Wang et al., 2016). Estos resultados hasta el momento, satisfacen las observaciones realizada en otros estudio, en donde la absorción en la región ultravioleta tiene una fuerte dependencia del tamaño nanométrico y adicionalmente que la estabilización de AuNC requiere de la presencia de complejos de Au(I)-Ligando que puedan ser absorbidos en la superficie tipo núcleo-coraza por lo cual, la reducción de los iones Au no puede ser total (Yu et al., 2013).

Con el fin de analizar la ausencia del comportamiento plasmónico evidenciado en los espectros de absorción sobre las propiedades luminiscentes de los AuNC@PepHLec2854 obtenidos con variación en la relación volumétrica de $NaBH_4$, se adquirieron los espectros de emisión para cada uno de los ensayos mostrados en la figura 28.

Figura 28

Espectros de Emisión de AuNC@PepHLec2854 sintetizados con diferentes volúmenes de $NaBH_4$ ($\sim 50\mu M$).



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Nota. [Condiciones: 3mM PepHLec2854; 1mM AuCl⁻¹₄] Con una longitud de onda de excitación igual a 330 nm. En la figura, también se incluye una ampliación de la región de 600-700 nm.

Para estos experimentos, se estableció una longitud de onda de excitación a 330 nm, sin embargo, en resultados posteriores se mostrarán los respectivos barridos espectrales entre 310 a 350 nm para determinar la longitud de onda de máxima de excitación de cada uno de los sistemas de AuNC@PepHLec obtenidos. Los espectros de emisión de los AuNC@PepHLec2854 reportados en un rango de 400 a 700 nm evidencian las propiedades fluorescentes exhibidas por los diferentes sistemas de nanoclusters. Notablemente, los AuNC obtenidos usando 5,0 μ L de NaBH₄ (50 mM) presentan una banda de emisión definida con un máximo a 635 nm, igualmente se observan bandas de emisión para los sistemas obtenidos con 2,5 μ L y 10 μ L del agente reductor, con mayor desplazamiento hacia el rojo. En cuanto a la adición de un volumen más grande de NaBH₄, la emisión es escasa. Tanto la estructura atómica y la estructura electrónica de Au_nNC@Ligando determinan sus propiedades optoelectrónicas; al comparar el comportamiento en cada uno de los espectros de emisión de los AuNC@PepHLec respecto a la emisión mostrada por el PepHLec2854 a 430 nm y que es atribuida a los grupos fluoróforos presentes en la secuencia del péptido como lo son los grupos aromáticos de las cadenas laterales en la tirosina y la fenilalanina, se observó el decrecimiento en la intensidad de la emisión del péptido en los espectros de los AuNC@PepHLec. Este efecto se atribuye a la inclusión de las moléculas de PepHLec2854 en la nanoestructura y la poca disponibilidad de moléculas libres una vez formados los AuNC; esta observación es más marcada en aquellos sistemas de AuNC que exhibieron fluorescencia. (H. Wang et al., 2016). Es claro, que la fluorescencia es principalmente el resultado de las transiciones electrónicas entre los orbitales HOMO y LUMO distribuidos alrededor de los átomos de Au, lo que indica que la energía de la emisión estará determinada principalmente por el número de átomos Au(0) en el AuNC protegido por el ligando (Craeto, Malola, Brososky, Dass, & Häkkinen, 2014)

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

y de acuerdo a estos resultados, la cantidad de agente reductor afecta significativamente la conformación de estos núcleos; siendo la adición de solo 5,0 μL de NaBH_4 , la mejor condición para que se formen AuNC fotoluminiscente de acuerdo con la ruta de síntesis establecida en esta investigación.

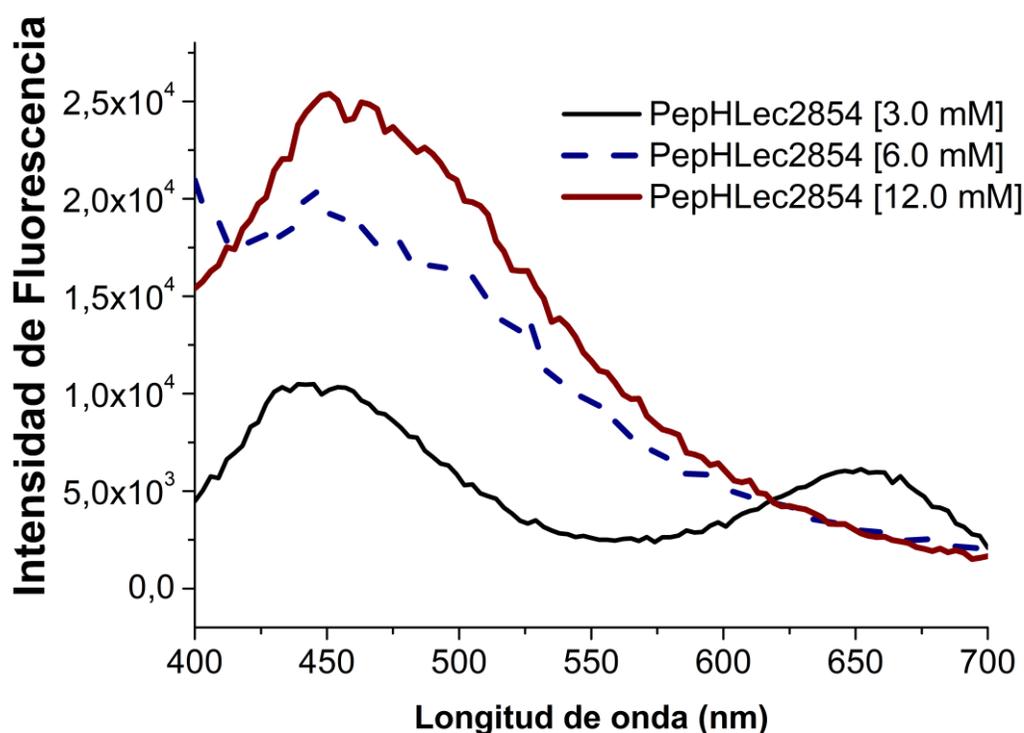
También se determinó la relación molar entre el péptido tiolado y los iones Au^{3+} que permitiera la mayor formación de AuNC protegidos por el PepHLec2854. Las relaciones molares estudiadas fueron 3:1; 6:1 y 12:1 como se han mencionado en reportes de síntesis previos (Fabris et al., 2006). La relación molar entre el Au:S, es quizás uno de los parámetros más importantes para la fabricación de AuNC tiolados, ya que es por interacción con el azufre que se logran estabilizar los agregados atómicos de Au(0) y es el elemento que presenta la mayor auroafinidad; dada su moderada electronegatividad puede formar un enlace de carácter covalente con el oro y fácilmente formar complejos coordinados con el Au(I). Se han sugerido modelos teórico basados en datos experimentales para determinar los mecanismos que conducen a la formación de AuNC tiolados y así comprender las conformaciones y el empaquetamiento que sufren los átomos de oro y que están mediados por reacciones de intercambio de ligando, y otras veces por el ataque químico por exceso de ligando (Häkkinen et al., 2006). Como se observa en el espectro de emisión presentado en la figura 29, el cambio en la concentración del PepHLec2854 afecta drásticamente la formación de AuNC luminiscentes; la relación molar 3:1 resulta ser la que permite sistemas nanoestructurados con emisión en el rojo alrededor de los 650 nm en comparación con las demás relaciones molares probadas. De acuerdo con estudios teóricos para $\text{Au}_{24}[\text{Cys-Cys}]$, los orbitales HOMO y LUMO están mayoritariamente distribuidos alrededor de un núcleo de Au_8 , siendo la relación de tioles la que determina el número de átomos en el núcleo Au_n en diferentes sistemas de $\text{Au}_{24}[\text{Cys-Cys}](\text{Au}_{13})$ y $\text{Au}_{24}[\text{Cys-Cys}](\text{Au}_8)$. En este mismo estudio se encontró que el núcleo de

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Aux dominantemente contribuye a los orbitales moleculares presentes en los AuNC y que para un núcleo Au más grande la diferencia de energía entre el HOMO-LUMO es más pequeña, mientras que para un núcleo de Au más pequeño, la energía de separación entre los orbitales HOMO y LUMO será más grande siendo coherente con la teoría de bandas (Jin, Zeng, Zhou, & Chen, 2016; H. Wang et al., 2016).

Figura 29

Espectros de Emisión de AuNC@PepHLec2854 sintetizados con diferentes relaciones molares del PepHLec2854: Au³⁺



Nota. [Condiciones: 2,5 μ L NaBH₄ (~50 μ M); 1mM AuCl⁻¹₄] Con una longitud de onda de excitación igual a 330 nm.

En este sentido, la relación (Au:S) podría decidir la estructura electrónica, la propiedad óptica y estabilidad de reacción de los AuNC@PepHLec. Además, los nanoclusters basado en

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

péptido exhiben actividad biológica distintivas en comparación con el uso de ligandos alquílicos tiolados. La manipulación de estas estructuras a nivel atómico exacto y el comportamiento y modulación del comportamiento electrónicos desde la síntesis, brinda una alternativa novedosa y atractiva para desarrollar sistemas de AuNC versátiles en el análisis y biosensado de diferentes biomoléculas para el diagnóstico de múltiples enfermedades y terapia clínica.

Finalmente, una vez se establecieron las mejores condiciones de síntesis anteriormente discutidas usando el PepHLec2854, se sintetizaron bajo las mismas dos sistemas más de AuNC empleando como plantilla los péptidos PepHLec2855 y PepHLec2856.

3.5.2 Propiedades optoelectrónicas de los AuNC basados en PepHLec

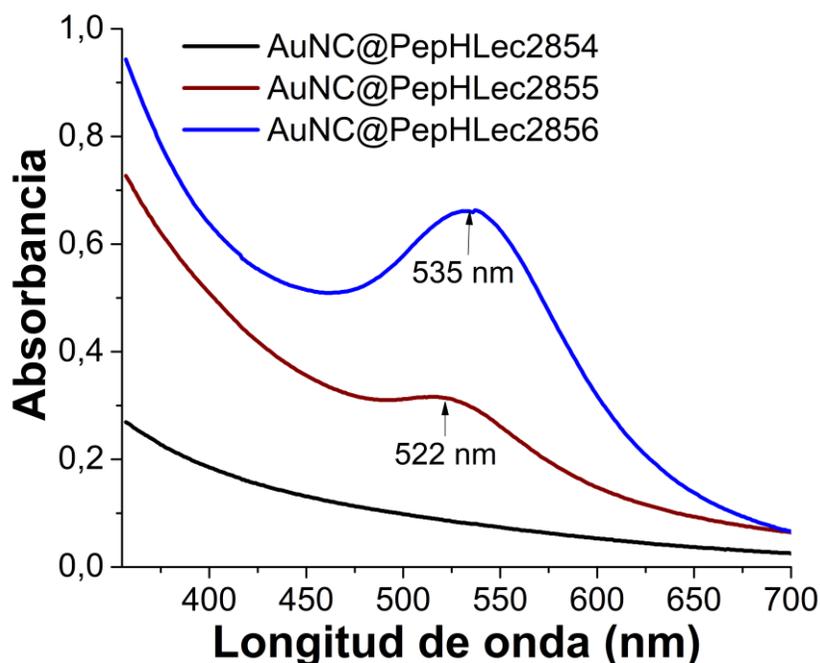
Para estudiar y comparar las propiedades optoelectrónicas de los diferentes sistemas de nanoestructuras de oro, se analizó el comportamiento plasmónico exhibido por cada uno de los AuNC a partir de los espectros de absorción y de emisión adquirido de acuerdo con la metodología implementada.

3.5.2.1 Análisis del comportamiento plasmónico de AuNC por UV-Vis. El estudio de estas propiedades es indispensable para comprender la transición de nanopartículas de oro grandes (AuNP >5,0 nm) a sistemas de AuNC los cuales tienden al comportamiento de las moléculas. A diferencia de las nanopartículas, los agregados sub-nanométricos tiolados no están dominados en el espectro de absorbancia por la banda de SPR a ~530 nm que surge como una oscilación coherente de electrones que se relajan y libera la energía en forma de calor al interactuar con la radiación. En la figura 30, se muestran los espectros de absorción para los tres sistemas nanoestructurados obtenidos por la misma ruta de síntesis basados en los PepHLec2855 y PepHLec2856 difieren drásticamente en cuanto a su comportamiento plasmático con los AuNC@PepHLec2854.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 30

Espectros UV-Vis de los AuNC sintetizados con cada uno de los PepHLec bajo los mismos parámetros.



Notablemente, el espectro UV-Vis de los AuNC@PepHLec2856 evidencia la presencia marcada de la banda de SPR a 535 nm característica de nanopartículas grandes y menos pronunciada pero también notable en los AuNC@PepHLec2855 a 522 nm. Estos resultados corroboran la incapacidad del PepHLec2856 (H₂N-INKQGDVTVLSNGNTQLT) como un ligando útil en la producción de nanoclusters, esto debido a la carencia de residuos de cisteína quienes aportan los grupos tiol requeridos para ser absorbidos en la superficie de metal reducido, impedir el crecimiento al permitir solo la agregación de un número finito de átomos y de este modo proteger mantener el tamaño en el régimen sub-nanométrico. En cambio, sí, pueden dar lugar a la formación de nanopartículas más grandes con propiedades ópticas también únicas pero carentes de fluorescencia como se discutirá en el siguiente ítem. En cuando a los sistemas

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

AuNC@PepHLec2855 cuya secuencia del péptido (H_2N -KTFLKICKRPYVPSEP) incluye un residuo de cisteína en el intermedio de la cadena que puede interactuar con la superficie de las nanoestructuras de oro y protegerlas, sin embargo la lejanía uno de los extremos terminales puede generar un impedimento estérico por plegamiento de la estructura 2D que dificulte su disponibilidad para formar complejos de coordinación [Au(I)-L], que posteriormente estabilizaran los núcleos de oro reducidos y podría tratarse de AuNC@PepHLec2855 con una amplia dispersión de tamaños incluyendo partículas de más de 2,0 nm. En general, muchos trabajos experimentales y teóricos han demostrado que los clusters Au_{25} , Au_{18} y Au_{15} tienen un núcleo metálico, mientras que los Au_{10-12} tienden a ser complejos coordinados [Au-SR] polimerizado sin *core* metálico, conocidos como *clusters* homolépticos (Stamplecoskie & Kamat, 2014). En este sentido, es claro que la absorción por transferencia de carga $L \rightarrow M$ ocurre para todos los tipos de AuNC y para los homolépticos, por tanto, es una transición favorable para todos los tamaños y se caracteriza por la absorbancia a longitudes de onda inferiores a los 400 nm, comportamiento que está presentes para los tres sistemas preparados con cada uno de los PepHLec. Por otra parte, los nanoclusters más grandes con estructura tipo núcleo-coraza exhiben adicionalmente, transiciones $M \rightarrow M$ (metal-metal) que corresponden a un leve levantamiento en la región de 500-650 nm del espectro de absorción (Yau, Varnavski, & Goodson, 2013). De estos análisis podemos establecer que los AuNC@PepHLec2854 cuya secuencia del péptido corresponde a H_2N -HYSRTENMGTSNAC, exhiben un comportamiento propio de los nanoclusters a escala sub-nanométrico, donde el confinamiento cuántico y el régimen del tamaño definen las propiedades optoelectrónicas que han sido evidentes a lo largo de los ensayos experimentales y presumiblemente cuentan con una estructura atómica y electrónica que satisface los números mágicos para el núcleo de Au(0) que confieren estabilidad y un empaquetamiento riguroso ya propuesto en diferentes estudios (Kaatz

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

& Bultheel, 2019) como lo hemos podido confirmar en la elucidación de la estructura atómica y molecular por las técnicas de XPS y MALDI-TOF.

3.5.2.2 Análisis de las propiedades fotoluminiscentes de los AuNC@PepHLec. Con el fin de conocer las propiedades fotoluminiscentes de cada una de las estructuras sintetizadas, se realizó el análisis por Espectroscopía de fluorescencia y se adquirieron los espectros de emisión para cada uno de los AuNC@PepHLec haciendo un barrido con diferentes longitudes de onda de excitación como se muestra las figuras 30A-C. Los espectros fueron adquiridos en una ventana de emisión desde 500-750 nm para los AuNC@PepHLec2854; de 450-700 nm para los AuNC@PepHLec2855 y desde 380-600 nm para las nanoestructuras obtenidas con el PepHLec2856.

En la figura 31A, se evidencia la fuerte emisión de fluorescencia de los AuNC@PepHLec2854 con un máximo a 635 nm con un QY del 4,87%, y una longitud de onda de máxima excitación de 330 nm; con un ancho de banda de 180 nm, lo cual podría estar indicando que la distribución de tamaño no es tan alta para estos nanoclusters, además de que es claramente observado que la longitud de onda de emisión es independiente de la energía de excitación como ocurre en los sistemas moleculares. Como se ha documentado en trabajos previos, el pico de emisión más dominante en el espectro de emisión corresponde a las transiciones electrónicas Metal→Metal que tienen lugar en el núcleo metálico, Au_n, por encima de los fenómenos de transferencia de carga del Ligando→Metal. En la figura 31B, correspondiente a los espectros de emisión del sistema de nanoclusters, AuNC@PepHLec2855, se presenta el comportamiento luminescente de estas nanoestructuras, el cual se ve caracterizado por la presencia de dos bandas de emisión, la primera a una longitud de onda menor de 450 nm correspondiente a la banda de emisión de los grupos fluoróforos en el péptido PepHLec2855, los cuales exhibieron un QY igual

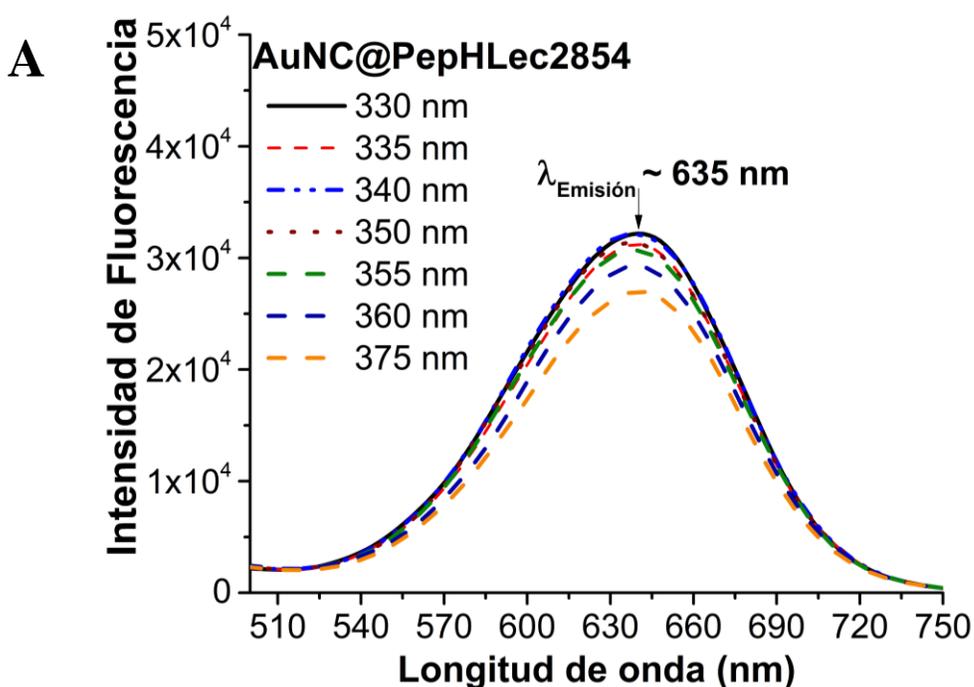
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

a 1.05%. Espectros de emisión de los PepHLec y la segunda banda con un máximo de emisión a 645 nm con baja intensidad de fluorescencia. Se observa que la emisión también es independiente de la longitud de onda de excitación que toma un valor máximo a 320 nm.

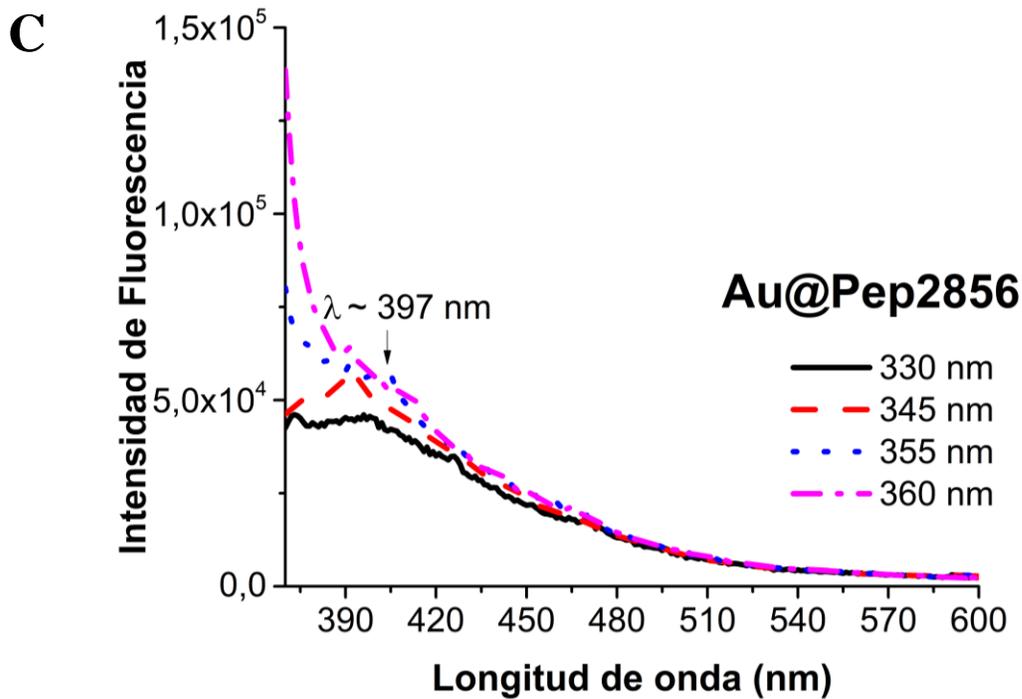
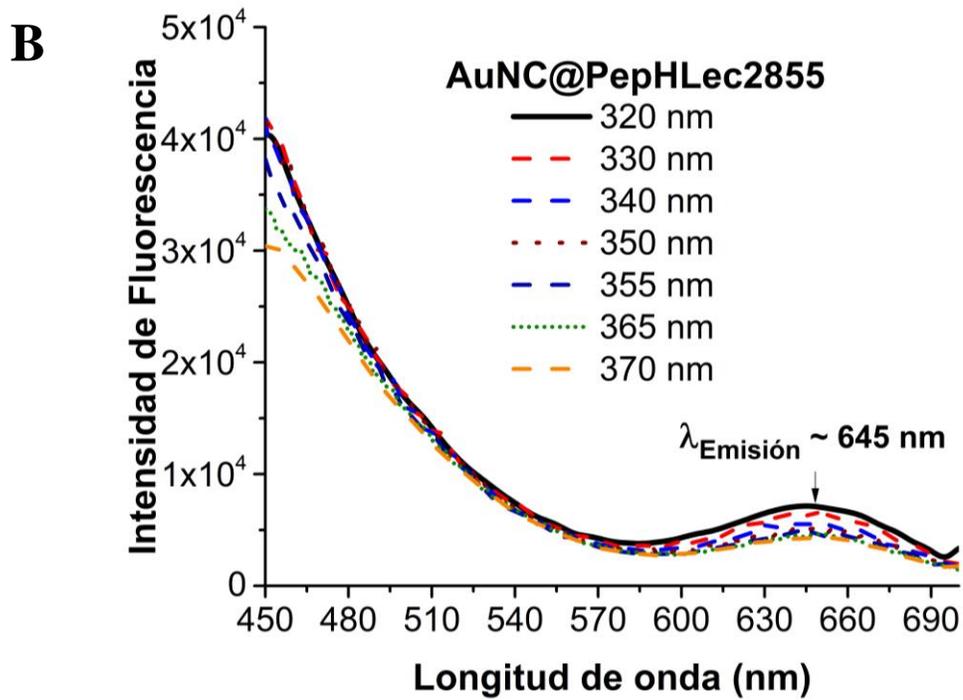
Por otra parte, las nanoestructuras de Au basadas en el PepHLec2856 mostraron una banda de fluorescencia distorsionada y poco definida alrededor de 397 nm, como fue observado en la figura 30C que puede ser el resultado de la emisión de los grupos fluoróforo de la secuencia peptídica, sumado a las transiciones de la transferencia de carga del tipo $L \rightarrow M$ típicas en todos los sistemas nanoestructurados. La ausencia de una banda de emisión a longitudes de onda mayores a 500 nm correspondientes a las transiciones $M \rightarrow M$ regidas por el confinamiento cuántico demuestra que los sistemas nanométricos formados no son del tipo nanoclusters sub-nanométricos.

Figura 31

Espectros de Emisión de AuNC sintetizados con cada uno de los PepHLec bajo las mismas condiciones de síntesis.



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS



Nota. A) AuNCPepHLec2854, B) AuNCPepHLec2855. C) Nanoestructuras AuNC@PepHLec2854. Barrido de longitudes de onda de excitación en un rango de 330 a 360 nm.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Algunos cálculos teóricos han predicho las longitudes de onda de emisión en función del número de átomos en el cluster; la emisión alrededor de ~625 nm observada en Au₂₀₋₂₅-(SR), donde los orbitales frontera, HOMO-LUMO dependientes también del tamaño del cluster, se encuentran centrados en el núcleo y tienen una gran contribución de los orbitales “3p” del sulfuro. La diferencia de energía (“band-gap”) HOMO-LUMO en estos sistemas es más baja comparada con Au_n con n<10 átomos, por lo cual las interacciones Metal-Metal son predominantes y mediadas eficientemente por los átomos de azufre en la superficie. Las transiciones Ligando→Metal han sido observadas en los Au_n (n<10) y son atribuidas a la fuerte interacción entre el oro y el ligando, las cuales pueden ser distinguidas por la emisión a longitudes de onda entre los 401-490 nm ya que la diferencia de energía entre los orbitales HOMO-LUMO del metal son más altas, hecho que requeriría una energía de excitación más alta (~320 nm) (Baral et al., 2017).

Hasta aquí, hemos mencionado dos mecanismos por los que tendría lugar la emisión en estos sistemas de nanoclusters; verificando que la fotoluminiscencia es una propiedad dependiente del tamaño sub-nanométrico, de la estabilidad impartida por el ligando que implícitamente modula la estructura electrónica y está dominada por las transiciones metal-metal del núcleo.

3.5.3 Análisis Estructural, Atómico y Molecular de los AuNC basados en PepHLec

3.5.3.1 Análisis por espectroscopía fotoelectrónica de Rayos X de los AuNCs. El análisis XPS permitió conocer los estados de valencia del Au presente en los nanoclusters basados en los PepHLec2854 y PepHLec2855. El análisis por XPS de nanoestructuras de oro típicamente incluye el nivel 4f del núcleo metálico (Au) y la región de la banda de valencia. En cuanto a la información del núcleo metálico. XPS es una técnica muy poderosa ya que la estructura del nivel 4f es muy sensible a la disminución de tamaño del sistema, evidenciando notables corrimientos hacia energías de enlace más altas cuando el tamaño de los Au_n[SR] disminuye. Adicionalmente,

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

se pudo estudiar la interacción entre el grupo tiol de las cisteínas en cada péptido y se observaron las componentes, S 2p+Si 2s que fueron incluidas en el **Anexo G**.

La figura 32A, corresponde al espectro XPS de los AuNC@PepHLec2854 que valida la presencia de oro con la aparición del doblete 4f del Au. Los picos del doblete correspondientes a las especies Au(0) y Au(I) fueron hallados por un proceso de deconvolución del espectro. Como resultado, las energías de enlace del Au(0) se posicionaron en 80,55 eV en $4f_{7/2}(\text{Au})$ y 84,31 eV en el $4f_{5/2}(\text{Au})$ y para el estado del Au(I) tomaron valores de energía de enlace de 80,34 eV $4f_{7/2}(\text{Au})$ y 81,66 eV $4f_{5/2}(\text{Au})$. La diferencia de separación del doblete fue igual a 3,65 eV que corresponde al acoplamiento spin-orbital. Se ha reportado valores alrededor de 3,7 eV como un indicio sólido de la reducción Au^{3+} a Au^0 (Behera & Ram, 2013).

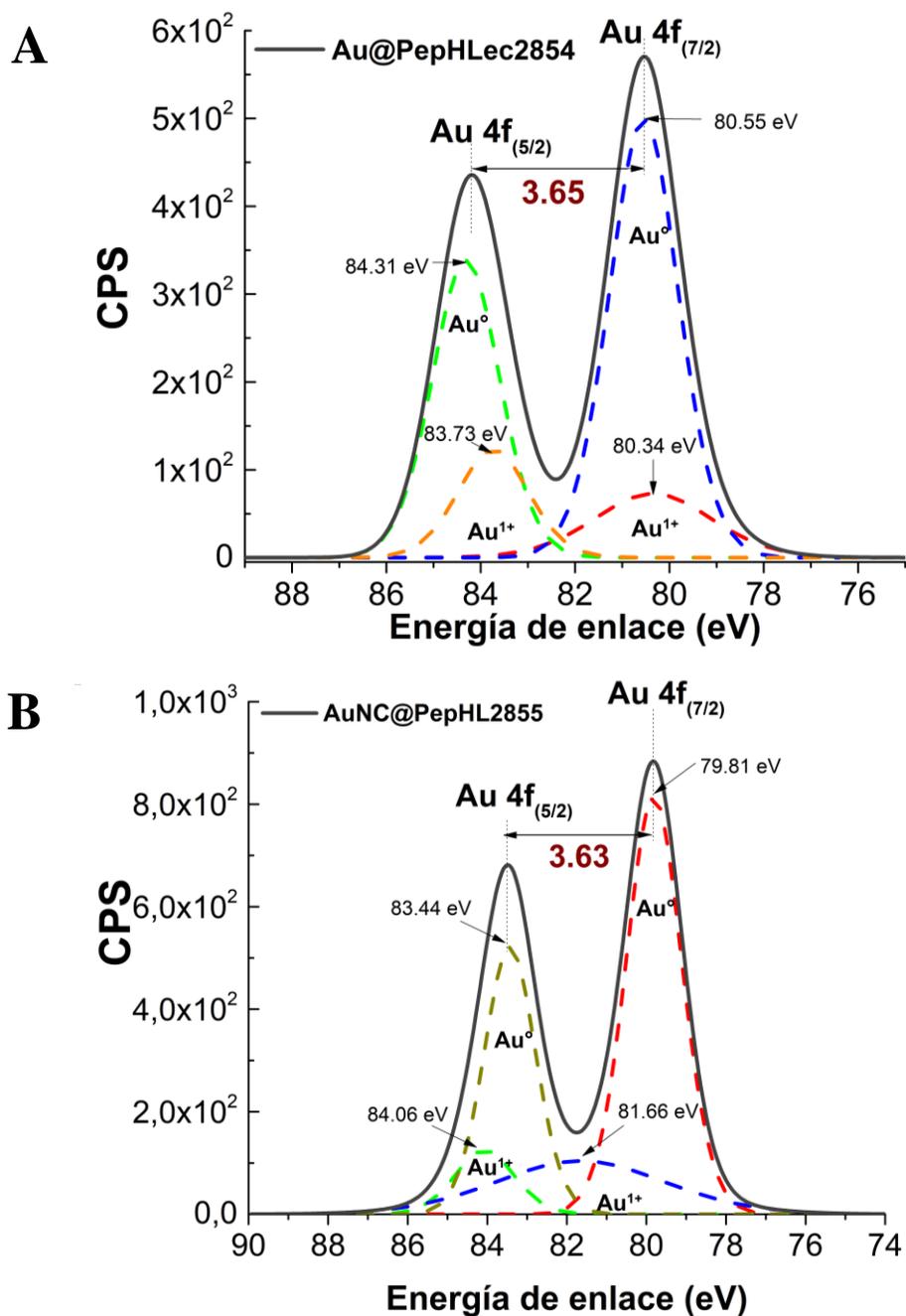
En cuanto a las energías de enlace observadas para los AuNC@PepHLec2855 en la figura 32B, aplicando el mismo proceso de deconvolución de espectros, las energías de enlace para los Au(0) en cada uno de los dobletes 4f correspondientes a 79,81 eV $4f_{7/2}(\text{Au})$ y 83,44 eV $4f_{5/2}(\text{Au})$ y para el estado de valencia Au(I) las energías de enlace tomaron valores de 81,66 eV en el doblete $4f_{7/2}(\text{Au})$ y de 84,06 eV en $4f_{5/2}(\text{Au})$; y la energía del acoplamiento spin-orbital fue de 3,63 eV. En este sistema de AuNC también se confirma la presencia de Au en estado metálico evidenciado por el valor asignado a la diferencia de energía de los dobletes (spin-orbital).

Debido a la sensibilidad de esta técnica espectroscópica, el desplazamiento de las energías de enlace en estas nanoestructuras es una consecuencia de del tamaño sub-nanométrico (Sylvestre et al., 2004).

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 32

Espectros XPS de alta resolución de para la región del Au 4f de AuNC sintetizados usando PepHLec.



Nota. **A)** AuNC@PepHLec2854. **B)** AuNC@PepHLec2855.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Como fue registrado, los valores de energía del 4f(Au) de los AuNC@PepHLec2854 son mayores en comparación con las energías de enlace para el orbital 4f(Au) de los AuNC@PepHLec2855, lo cual podría estar indicando que los átomos de oro en el núcleo de los AuNC@PepHLec2854 son más próximos en su empaquetamiento y están fuertemente unidos confiriéndoles mayor estabilidad. Ya que XPS es una técnica semicuantitativa, se logró calcular el porcentaje relativo de las especies Au(0) y Au(I) en cada una de las nanoestructuras por la integración de los espectros obtenidos para los dobletes 4f. De este modo, se determinó el porcentaje de la especie reducida Au(0) que estarían conformando el núcleo metálico y la especie en estado oxidado Au(I) que estaría presente en los complejos de coordinación [Au(I)-L] en la superficie metálica (Tawil, Sacher, Boulais, Mandeville, & Meunier, 2013). En los AuNC@PepHLec2854 las abundancias de Au(0) y Au(I) es del 76,8 y 23,14% respectivamente; en los AuNC@PepHLec2855, las especies Au(0) y Au(I) registraron porcentajes del 74,35 y 25,7%, respectivamente. Aunque las diferencias en la abundancia para cada especie Au(0) y Au(I) en los dos tipos de nanoestructuras no son muy amplias, un mayor porcentaje de abundancia de átomos en estado reducido en los AuNC@PepHLec2854 estaría indicando mayor estabilidad ya que habría una menor concentración de Au(I) por reducir.

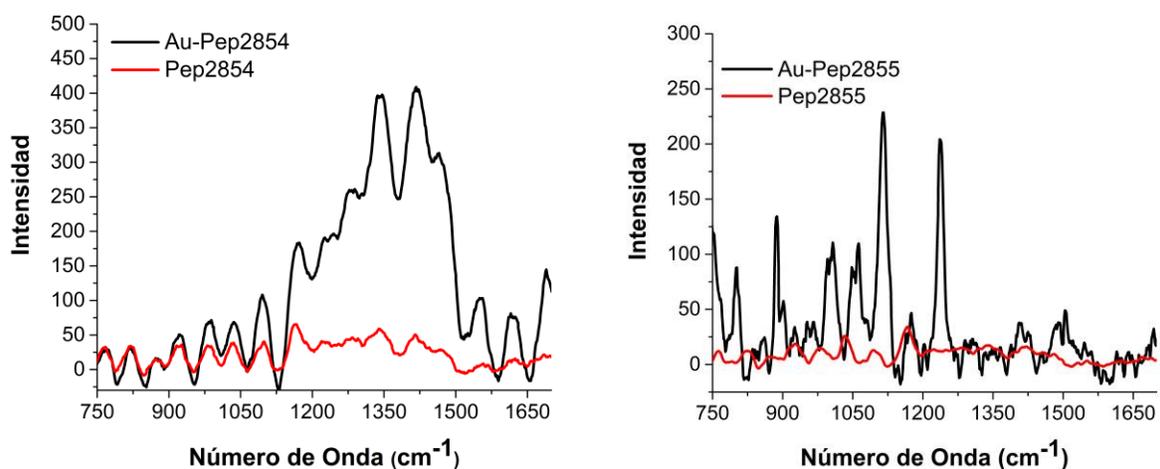
3.5.3.2 Análisis por espectroscopia Raman intensificada por efecto de superficie (SERS). La espectroscopia Raman intensificada por efecto de superficie ha sido una herramienta útil y confiable en la caracterización de péptidos y proteínas a partir de la observación en los corrimientos de las bandas vibracionales de grupos funcionales presentes en la secuencia aminoacídica, cuando estos grupos interactúan con la superficie de las nanoestructuras. A continuación, se presentan los espectros SERS de los AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855, los cuales fueron comparados con sus respectivos espectros Raman

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

normales de los péptidos libres como se muestra en la figura 33. En el análisis SERS mostrado, se observan unas bandas muy intensas en la región de 1100-1500 cm^{-1} , pese al ensanchamiento y levantamiento de la línea base debida a la emisión de fluorescencia del sistema AuNC@PepHLec2854. También se puede identificar las bandas a 833 y 851 cm^{-1} asignadas al doblete de resonancia de Fermi característico de la tirosina, que consiste en el modo de respiración en el plano del anillo y en un sobre tono del modo de respiración del anillo fuera del plano 1000-1030 cm^{-1} modo vibracional simétrico del anillo aromático de la fenilalanina, y a 1036 cm^{-1} flexión del C-H en el plano del anillo de la fenilalanina. A continuación, se consignan en la tabla 7 y tabla 8, las señales correspondientes a los modos vibracionales debidos a los grupos funcionales presentes en la secuencia peptídicas, algunos de ellos intensificados por el efecto SERS.

Figura 33

Espectros SERS de AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855



Nota. Los espectros en color rojo corresponden a los blancos de cada uno de los péptidos (PepHLec2854 y PepHLec2855) y los espectros en negro son los correspondientes a los AuNC

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Tabla 7

Modos vibracionales observados en el análisis Raman de los PepHLec2854 y el efecto SERS en las nanoestructuras AuNC@PepHLec2854.

Señales del PepHLec2854		
SERS [cm ⁻¹]	Raman [cm ⁻¹]	Asignación más probable
766	767	$\omega(\text{CO}_2)\text{Asn}$
821	819	$\rho(\text{CH}_2)$
922	922	$\gamma(\text{C-COOH})/\rho(\text{CH}_3)$
1162	1169	$\rho_{\text{as}}(\text{NH}_2)$
1220	1227	$\delta(\text{C-C}\alpha\text{-H})\text{Cys}$
1243-	-	$\rho(\text{NH}_3), \rho(\text{CH}_2)\text{Tyr}$
1346	1340	$\delta_{\text{s}}(\text{Nt-C}\alpha\text{-H})$
1417	1417	$\delta(\text{C}\alpha_2\text{H}_2)\text{Cys}$
1465	1470	$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
1555	1557	$\nu_{\text{anillo}}\text{Tyr}$
1617	1623	Amida I

Nota: ρ : balanceo; ν : estiramiento; γ : flexión fuera del plano; δ : flexión en el plano; ω : meneo; τ : torsión; s: simétrico; as: antisimétrico

Tabla 8

Modos vibracionales observados en el análisis Raman de los PepHLec2855 y el efecto SERS en las nanoestructuras AuNC@PepHLec2855

Señales del PepHLec2855		
SERS [cm ⁻¹]	Raman [cm ⁻¹]	Asignación
800	764	$\rho(\text{CH}_2)$
858	823	$\gamma(\text{CH})$
1114	1096	$\rho(\text{NH}_3), \rho(\text{CH}_2)$
1173	1167	$\rho_{\text{as}}(\text{NH}_2)\text{Tyr} /$

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

		$\nu(\text{C-C})$
1236	-	$\delta(\text{C-C}\alpha\text{-H})$ Cys
1306	-	
1351	1342	$\delta_s(\text{Nt-C}\alpha\text{-H})$ Pro
1407	1442	$\nu_s(\text{COO}^-)$ Phe / $\delta_{as}(\text{CH}_3)$
1508		$\gamma(\text{NH}_3^+)$, $\gamma(\text{CH})$, $\nu(\text{CO}_2)$

Nota: ρ : balanceo; ν : estiramiento; γ : flexión fuera del plano; δ : flexión en el plano; ω : meneo; τ : torsión; s: simétrico; as: antisimétrico

3.5.3.3 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los análisis por espectrometría de masas nos permitieron determinar una fórmula molecular construida a partir del número de átomo de oro en relación con un número de moléculas del ligando. Esta información estructural y molecular es imprescindible para comprender la fotoluminiscencia dependiente del tamaño sub-nanométrico de los nanoclusters.

En la figura 34, se presentan los espectros de masas comparativos entre los AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855 fluorescentes que fueron adquiridos usando una solución saturada de HCCA en un paso preparativo conocido como doble capa altamente reproducible para un modo de análisis *reflectron* con ionización positiva, adecuado para el análisis de biomoléculas como péptidos y proteínas y ha sido implementado también para analizar estas biomoléculas conjugadas a nanoestructuras metálicas.

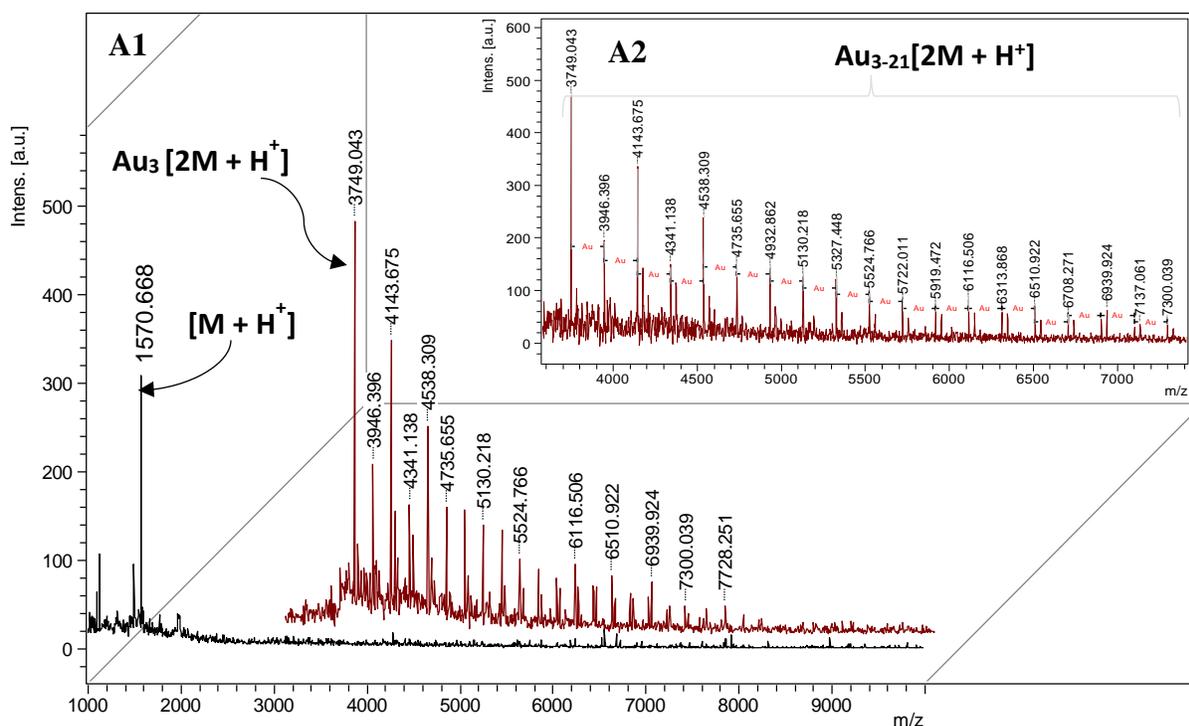
En el espectro de masas de los AuNC@PepHLec2854 (Figura 34A1) se presentan tanto el espectro del PepHLec2854 (color negro) en donde aparece el ion molecular $[\text{M}+\text{H}^+]$ con un valor m/z 1570,668. En el espectro correspondiente a los AuNC (color rojo) aparece una señal de más baja intensidad con relación m/z igual 3749,04 que correspondería al ion $[\text{Au}_3\text{L}_2 + \text{H}^+]$ (siendo L

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

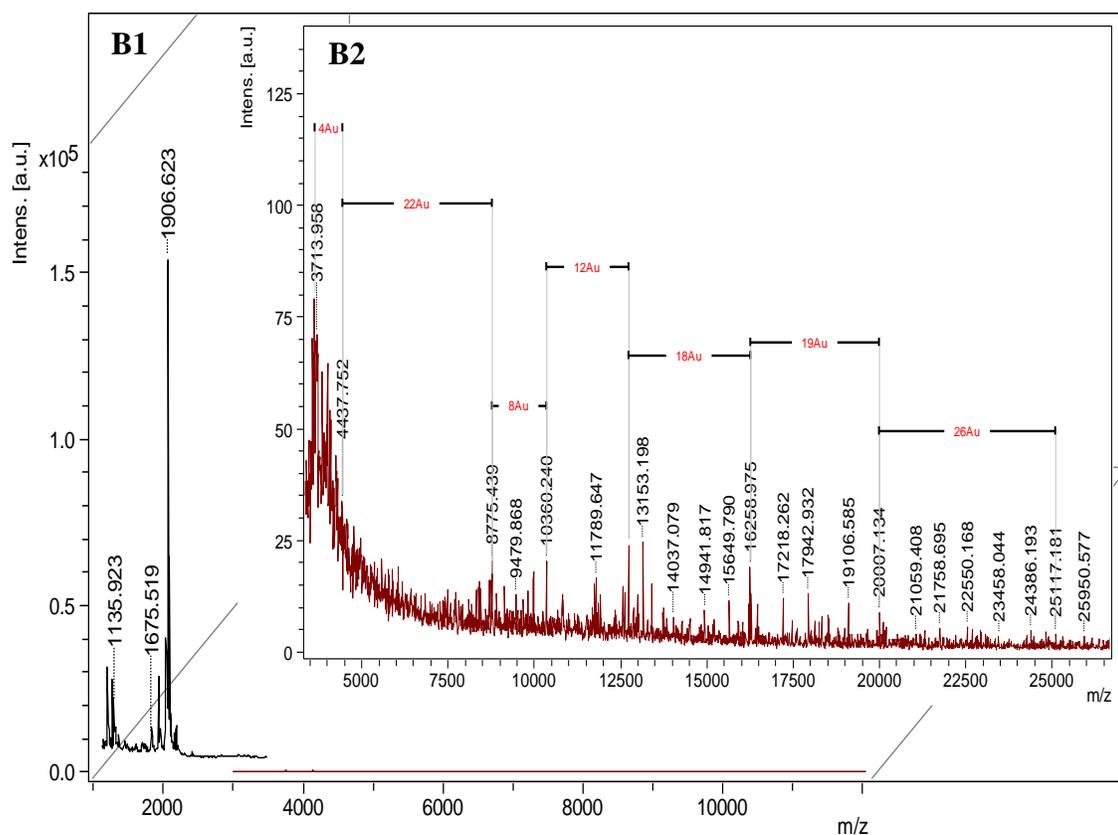
el péptido ligando); se observan más iones con un $\Delta m \sim 197,02$ hasta una relación m/z de 8000 Da. Este Δm correspondería al aumento de un átomo de Au ($n+1$) respecto al ion predecesor como se indicó en el espectro en la figura 34A2. Es evidente que las señales con un número impar de átomos de Au son las más abundantes, pero van disminuyendo en la medida aumenta la relación m/z . En este caso, se evidencian sistemas de AuNC@PepHLec2854 que van desde $[\text{Au}_3\text{L}_2 + \text{H}^+]$ hasta $[\text{Au}_{21}\text{L}_2 + \text{H}^+]$ lo cual corrobora la conformación y empaquetamiento de los AuNC respecto a un número mágico de átomos de Au.

Figura 34

Espectros de masa MALDI-TOF de AuNC@PepHLec2854 y AuNC@PepHLec2855



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS



Nota. **A1)** Sobreposición de espectros de masas de AuNC@PepHLec2854 (café) y PepHLec2854 (negro). **A2)** Ampliación del espectro masas AuNC@PepHLec2854 con asignación de átomos de Au con una relación $m/z \sim 197,02$ Da. **B1)** Sobre posición de espectros de masas de AuNC@PepHLec2855 (café) y PepHLec2855 (negro). **B2).** Ampliación del espectro masas AuNC@PepHLec2854 con asignación de átomos de Au con una relación $m/z \sim 197,02$ Da.

Por otra parte, en la figura 34B1, se muestra el espectro de masas para los PepHLec2855 en el que se evidencia el ion molecular $[M+H^+]$ con relación m/z igual a 1906,623 del PepHLec2855 (color negro) con una abundancia de 10^5 órdenes de magnitud. En la figura 33B2, el espectro de masas para AuNC@PepHLec2854 muestra un ion con relación m/z 3. Respecto al espectro adquirido para los AuNC basados en el PepHLec2855 se obtuvo una distribución de iones con relación m/z 3713,95 correspondiente al dipéptido PepHLec2855 $[2M+H^+]$, seguidamente aparece los siguientes iones: m/z 4437,75 que corresponde a la fórmula $[Au_4L_2 + H^+]$; m/z igual

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

a 8775,429 correspondiente a $[\text{Au}_{26}\text{L}_2 + \text{H}^+]$; m/z igual a 10360,24 correspondiente a $[\text{Au}_{34}\text{L}_2 + \text{H}^+]$; m/z igual a 12730,917 para los $[\text{Au}_{46}\text{L}_2 + \text{H}^+]$; m/z igual a 16258,752 $[\text{Au}_{64}\text{L}_2 + \text{H}^+]$; m/z igual a para la especie $[\text{Au}_{83}\text{L}_2 + \text{H}^+]$ y finalmente un ion con m/z igual a 25117,181 asignado a la especie $[\text{Au}_{109}\text{L}_2 + \text{H}^+]$. Este análisis fue concluyente para demostrar que existen diferencias representativas a nivel molecular y atómico entre los AuNC de este estudio.

El análisis de los espectros MALDI, demostraron que los AuNC@PepHLec2854 caracterizado por la ausencia de comportamiento plasmónico y una fuerte emisión de fluorescencia en la región del rojo, son las nanoestructuras con menor dispersión de especies moleculares comparado con el espectro de masas de los AuNC@PepHLec2855. Estas observaciones son explicadas desde el punto de vista de la agregación de átomos de Au que conforman el núcleo de los AuNC sintetizados a partir del péptido PepHLec2854 dando origen a estructuras tipo núcleo-coraza que se rige por un número mágico de átomos de Au, “n” que va desde 3 a 21 en un rango de masa de 3-10 kDa. En cuanto a los AuNC@PepHLec2855, el espectro de masas se evidenciaron especies moleculares con un número de átomos de Au “n” que toma valores desde 2 hasta 109 en un rango de relación m/z de 4-25 kDa.

Estos resultados demuestran con mayor profundidad y exactitud la organización y conformación de AuNC protegidos por ligando peptídicos fabricados en esta tesis doctoral. Se ha demostrado que la estructura electrónica responsable de las novedosas y atractivas propiedades luminiscentes está directamente ligada al empaquetamiento de los átomos de Au con un rigor cuántico. La separación de niveles de energía del continuo del *bulk* de oro en niveles de energía discretos y cuantizados que dan lugar a los estados electrónicos responsables del comportamiento de los AuNC dependerá entonces del empaquetamiento, del número de átomos y de las distancias interatómicas de estos en el núcleo metálico, adicional al efecto significativo de los ligandos sobre

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

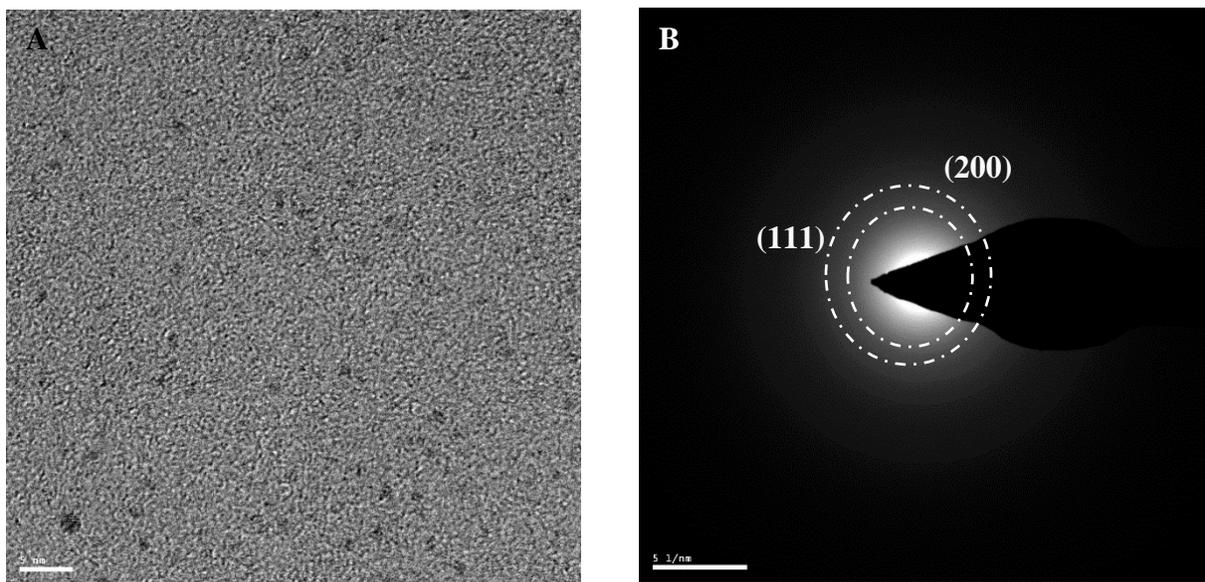
la superficie que no solo estabiliza y protege los *clusters*, también cambia las energías de la banda de separación de los orbitales HOMO-LUMO involucrados en las transiciones Metal-Metal primordiales en la fluorescencia.

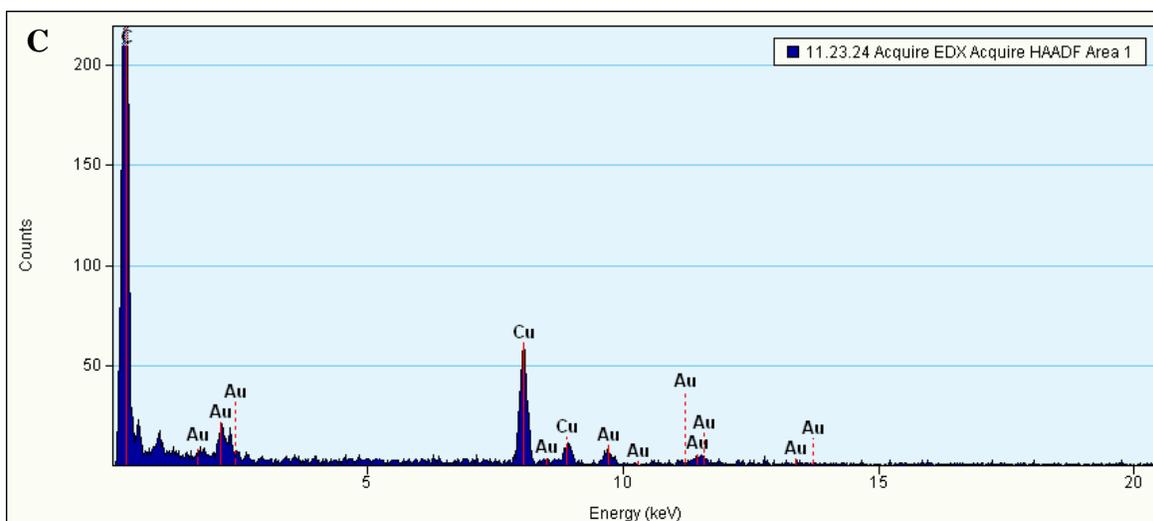
3.5.4 Determinación del tamaño y la forma de los AuNC@PepHLec2854 por TEM

En la figura 35A se presenta la micrografía de los AuNC@PepHLec2854 en un rango de escala de tamaño de 1 a 5 nm que demuestra el régimen de tamaño sub-nanométrico de estos sistemas nanoestructurados, verificando así que el PepHLec2854 permite sintetizar AuNC altamente estables y un tamaño reducido. Además, se muestra (Figura 35B) el patrón de difracción de un AuNC, donde se evidencia el patrón representativo (111) para una conformación octaédrica adoptada por el Au en dichos sistemas nanoestructurados. Finalmente, se realizó una verificación del contenido de Au en la muestra empleando la técnica de EDX como es presentado en la figura 35C.

Figura 35

Micrografías de AuNC@PepHLec2854 tomadas en un microscopio TEM





Nota. A). Micrografía TEM de alta resolución de los AuNC@PepHLec2854 en una escala de 5 nm. B) Patrón de difracción de área seleccionada (SAED) de los AuNC@PepHLec2854. C) Análisis por EDX que verifica la presencia de oro en los AuNC@PepHLec2854.

3.6 Conclusiones de la Síntesis de AuNC@PepHLec.

Se logró establecer una ruta de síntesis sencilla y eficiente para la fabricación de dos sistemas de AuNC fluorescentes basados en péptidos sintéticos homólogos a las lectinas (PepHLec2854 y PepHLec2855) como plantilla por un método clásico de reducción química de iones Au^{3+} usando NaBH_4 a una baja concentración y asistencia por Ultrasonido en 2 ciclos de 10 min ; en donde se establecieron las condiciones más adecuadas para obtener sistemas subnanométrico fuertemente estabilizados y que exhibieron novedosas propiedades optoelectrónicas.

Los AuNC@PepHLec2854 no plasmónicos, exhibieron fuerte fluorescencia a una longitud de onda de 635 nm independiente de la longitud de onda de excitación cuya máxima emisión se consiguió a 330 nm. Estos sistemas mostraron una relación del Au(0) en el núcleo del nanocluster del 76,8% y 23,4% de Au(I) al grupo tiol presente en el residuo de cisteína de la secuencia peptídica. La energía de enlace del doblete Au 4f fue de 81,66 eV (4f 7/2) y 84,06 eV (4f 5/2) cuyo desplazamiento a energías mayores respecto a la reportada en la literatura para el Au metálico

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

(84,05 eV) evidencia el tamaño en escala nanométrica de estos sistemas, los cuales registraron un diámetro de tamaño de ~ 1.5 nm el cual fue confirmado por TEM y un patrón de difracción (111) y (200) característico del Au evidenciado en el SAED. Estos AuNC presentaron una conformación molecular y atómica ultrafina de especies conformadas por dos moléculas de ligando y de 3 hasta 21 átomos de Au que obedecen a la fórmula, $[\text{Au}_{3-21}\text{L}_2]$ corroborado por espectrometría de masas.

Por otra parte, los AuNC@PepHLec2855 con mayor comportamiento plasmónico también exhibieron emisión de fluorescencia a una longitud de onda de máxima emisión a 645 nm independiente de la longitud de onda de excitación y con un bajo rendimiento cuántico. Estos clusters metálicos presentaron un porcentaje de Au(0) del 74,3% en el núcleo metálico y del 23,4% para las especies de Au oxidado. Este análisis también muestra el desplazamiento de la energía de enlace del doblete Au 4f (7/2) de 79,81 eV y (5/2) 83,44 eV que corroboran el tamaño nanométrico del material con una conformación atómica y molecular que va desde una fórmula mínima de $[\text{Au}_4\text{L}_2]$ hasta una fórmula máxima de $[\text{Au}_{109}\text{L}_2]$ como fue confirmado por la técnica MALDI-TOF.

Concluimos que dadas las propiedades mostradas por estos dos sistemas de AuNC los convierte en dos candidatos novedosos para el desarrollo de un biosensor óptico basado en fluorescencia para la detección de moléculas secretadas en la infección por Leishmaniasis, lo cual será discutido a profundidad en la sección 4.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

4. Evaluación de AuNC fluorescentes basados en PepHLec como un biosensor óptico para Leishmaniasis

En la última década, los AuNC fluorescentes se han convertido en una nueva clase de fluoróforos muy atractivos debido a su estructura electrónica única y en consecuencia a las propiedades optoelectrónicas que exhiben. Como se ha mencionado, el régimen de tamaño sub-nanométrico responsable de la fluorescencia, una elevada fotoestabilidad y la biocompatibilidad han despertado el interés en estas estructuras para diseñar y desarrollar nuevas pruebas de diagnóstico y plataformas de sensado en el ámbito biomédico. Como resultado de los métodos de síntesis de los AuNC en donde se incluyen péptidos y proteínas como ligando-estabilizador, los AuNC *per se* poseen un direccionamiento molecular atribuido al ligando biológicamente activo. Esta funcionalización en la superficie de los AuNC ha permitido reconocer moléculas involucradas en un gran número de infecciones causadas por parásitos, bacterias y fúngicas y virales. En la presente sección se discutirán los resultados obtenidos frente a la evaluación AuNC@PepHLec2854 como una plataforma de sensado de sAP y PPG, los cuales muestran resultados prominentes en el uso de estos sistemas nanoestructurados para la detección de sAP a través de fenómenos de intensificación de la señal de fluorescencia (EF) emitida por los nanoclusters fluorescentes al estar en presencia de sAP en un rango de concentraciones del orden de 10^{-9} M con un nivel mínimo de detección de $1,76 \text{ nM} \pm 0,20$. Los experimentos basados en la observación de cambios de la señal de emisión de fluorescencia ($\sim 635 \text{ nm}$) por la formación de complejos AuNC@PepHLec2854_sAP altamente estables permitieron demostrar que la EF es un fenómeno eficiente, sensible y prometedor en el desarrollo de métodos de detección basados en biosensores por fluorescencia.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

4.1 Biosensor

De acuerdo con la IUPAC un biosensor es un dispositivo integrado que permite obtener datos analíticos cuantitativos o semi-cualitativos de un medio específico usando un elemento biológico de reconocimiento y un elemento de transducción. La arquitectura típica de un biosensor está dada por un componente bioquímico como una enzima, proteína, anticuerpo u otra biomolécula que interactúa selectivamente con una especie de interés generando una señal primaria que aporta toda la información bioquímica, dicha señal es traducida por el elemento transductor que generalmente es un instrumento que transforma esta señal primaria (señal espectroscópica) en una secundaria, más fácil de manipular y medir. Esta señal puede ser de dominio óptico, electroquímico, térmico y piezoeléctrico, siendo el tipo de señal lo que clasifica los biosensores en cuestión según el transductor (X. Chen et al., 2014; Damborský, Švitel, & Katrlík, 2016; X. Wang, Lu, & Chen, 2014). En este contexto, sobresalen los sensores piezoelectrónicos que implican la medición en los cambios de la frecuencia de oscilación de un cristal piezoeléctrico susceptible a la acumulación de masa en su superficie producto de una interacción biomolecular (Sirohi & Chopra, 2000). Por otra parte, los biosensores térmicos se basan en la medición en los cambios térmicos cuando tiene lugar las reacciones bioquímicas que involucran cambios en la entalpia y el calor, para lo cual se emplean termistores altamente sensibles (Ramanathan, Jönsson, & Danielsson, 2001). En cuanto a los biosensores electroquímicos, pueden además clasificarse como amperométricos que miden la corriente producida durante procesos de óxido-reducción de especies electroactivas (Jolly et al., 2017; S. J. Li, Deng, Shi, & Liu, 2012), potenciométricos que miden la diferencia de potencial de un electrodo de sensado respecto a un electrodo de referencia (M. Xu, Wang, & Li, 2016) y los conductimétricos que miden los cambios en la conductancia producto de una reacción química (Kakefuda, Narita,

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Komeda, Yoshimoto, & Hasegawa, 2008; Latif & Dickert, 2011). Finalmente, los biosensores ópticos se basan en la cuantificación de la luz absorbida o emitida como consecuencia de una reacción o acoplamiento de pares molecular. Estos últimos reciben el mayor interés y aplicaciones ya que la señal generada puede ser analizada por diferentes técnicas espectroscópicas como la absorción, resonancia plasmónica superficial, luminiscencias y fluorescencia (H. C. Chang & Ho, 2015; J. C. Chen et al., 2006; Damborský et al., 2016; Saha, Basiruddin, Sarkar, Pradhan, & Jana, 2009; Vo-Dinh, Wang, & Scaffidi, 2010).

Desde el primer biosensor desarrollado en 1962, basado en detección de glucosa usando como receptor la glucosa oxidasa (Leland C. Clark, 1962), hasta hoy, un gran número de investigaciones se han enfocado en crear dispositivos y prototipos de biosensado para la detección de un amplia variedad de moléculas en el diagnóstico clínico, seguridad alimenticia y en el análisis ambiental (X. Wang et al., 2014). Los biosensores se han posicionado como los métodos de detección preferidos debido a la sensibilidad y selectividad, bajo costo, rapidez, fácil manipulación y análisis directo en tiempo real (Mukherji et al., 2013a; Yijia Wang et al., 2015).

4.1.1 Biosensores ópticos

Las propiedades exhibidas por la luz que por interacción con la materia puede modificarse ha hecho posible el diseño de dispositivos en donde la luz es ahora la señal analítica. Para este caso, es necesario conocer el efecto óptico involucrado en el funcionamiento del sensor y proponer un sistema de adquisición de datos adecuado (Damborský et al., 2016; Ligler, 2009). Los fenómenos propuestos hasta el momento para el desarrollo de un biosensor de este tipo son: la fotoluminiscencia, absorción y configuraciones de campo evanescente donde la señal puede ser analizada por técnicas espectrofotométricas. El avance tecnológico en esta área ha sido notable y

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

en la investigación y diseño de estos dispositivos confluyen otras áreas del conocimiento como la biología molecular, la nanobiotecnología y la fisicoquímica aplicada.

Actualmente, uno de los aspectos más novedosos en el desarrollo de biosensores es la implementación de estrategias nanotecnológicas con las cuales se aprovechan las propiedades opto-electrónicas de los materiales a escala manométricas, dichas propiedades son susceptibles a cambios en el ambiente químico, tamaño y efecto de ligando en la superficie (Baral et al., 2017; Yuanyuang Li et al., 2010). Aunque el número de nanomateriales que se sintetizan es cada vez mayor, los más utilizados en el campo de los biosensores ópticos son los nanoclusters metálicos (Au, Ag y Cu). En este sentido, se han desarrollado diversos dispositivos de biosensado respecto a la señal espectroscópica analizada. Fenómenos como la absorción han permitido la aplicación de biosensores colorimétricos desechables basados en los cambios y variaciones en longitud de onda y absorbancia el espectro del plasmón superficial como consecuencia de la agregación de NPs durante el bioensayo para la identificación de ADN y proteínas (Jauset-Rubio et al., 2016).

La SPR localizada observada en algunas nanoparticulas produce también un efecto de intensificación de bandas de absorción de moléculas ligadas a la superficie de la nanoparticulas plasmónicas que se ha utilizado usando diferentes técnicas analíticas. La SPR se refiere a las oscilaciones de densidad de carga excitadas que existen a lo largo del límite entre un metal y un dieléctrico. Cuando la orientación del vector de campo eléctrico de un haz de luz incidente coincide con el movimiento de electrones libres en el metal, las ondas (SPR) se pueden excitar y, en consecuencia, se pueden acoplar de manera eficiente con grandes cantidades de energía (Ligler, 2009). Desde entonces, los biosensores SPR han experimentado un rápido desarrollo en las últimas dos décadas y se han convertido en una valiosa plataforma para mediciones cuantitativas de interacciones biomoleculares con las ventajas de una alta sensibilidad, selección versátil de

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

moléculas *target* y detección en tiempo real (Smitha, Nissamudeen, Philip, & Gopchandran, 2008; F. Zhang, Lee, & Linhardt, 2015).

Este comportamiento plasmónico de las NPs es empleado para mejorar las señales espectroscópicas analizadas por otras técnicas como la espectroscopia Raman, a lo que se conoce como Raman intensificado por efecto de superficie (SERS) en donde algunos nanomateriales basados en oro y plata, son usado como sustratos para producir un efecto de intensificación superficial significativamente dramáticas (del orden 10^5 a 10^6 veces), lo cual ha permitido el desarrollo de una amplia variedad de métodos de detección de ácidos nucleicos, anticuerpos, proteínas y otras moléculas biológicamente activas que pueden ser posteriormente implementados en el diseño de biosensores (Huh & Erickson, 2010; J. Yang et al., 2013; H. Zhou, 2014).

Dado el avance nanotecnológico y el establecimiento de rutas confiables y robustas para la síntesis de nanoestructuras fluorescentes dependientes del tamaño, las alternativas respecto a sistemas de sensado altamente sensibles ha aumentado, tanto que el diseño y desarrollo de biosensores basado en fluorescencia son actualmente una de las aplicaciones mayoritarias en este campo. (Shi et al., 2015; S. Xu et al., 2017).

4.1.2 Biosensores basados en fluorescencia

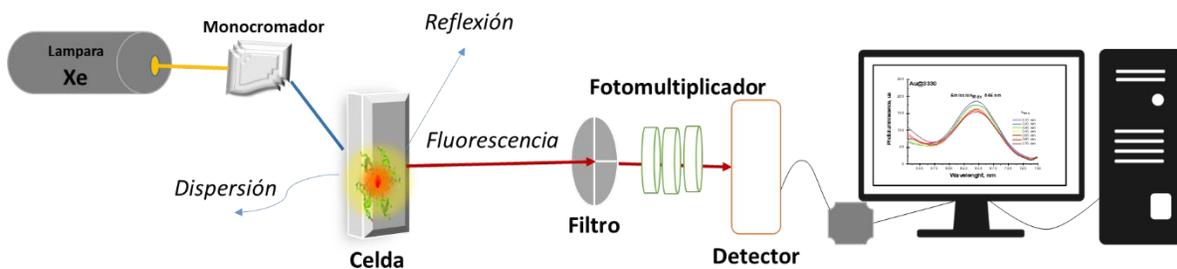
Los sensores con detección óptica han sido los sistemas de detección más destacados dentro de los métodos de transducción. La emisión de fluorescencia ha sido, sin duda, el método más aplicado con gran variedad de estrategias, los cuales combinan la elevada sensibilidad alcanzada por la técnica de fluorescencia y la selectividad respecto a interferencias de la matriz, ya que menos moléculas son capaces de emitir luminiscencia respecto que de absorber radiación. Además, es posible seleccionar longitudes de onda de excitación como las ventanas de emisión para cada muestra eliminando las interferencias de luz parasita (Study et al., 2013). Sumado a que

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

actualmente, en las espectroscopias se ha implementado el uso de componentes tales como láseres, arreglos de diodos, LEDs, fibras ópticas, dispositivos para la adquisición rápida de imágenes, registradores de datos y softwares inteligentes que han contribuido a la interdisciplinariedad de la espectroscopia de fluorescencia como técnica de análisis. En la Figura 36, se presenta un esquema general de un bioensayo basado en fluorescencia.

Figura 36

Esquema de los componentes principales para el análisis de la señal de fluorescencia en un bioensayo



Estos sistemas basados en fluorescencia requieren de un cambio en la señal de emisión en respuesta a la presencia del target. Este cambio puede ser en la intensidad, en el tiempo de vida de la señal o en la anisotropía del espectro del bioreceptor. Dentro de las características más demandantes para los sensores ópticos se encuentran la fiabilidad en la cuantificación y la capacidad para detectar concentraciones cada vez más pequeñas del target (Damborský et al., 2016). En cuanto a los biosensores basados en fluorescencia que miden la intensidad pueden cuantificar directamente la concentración del target si estos emiten luminiscencia aplicando la **Ecuación 1**.

$$I = k \cdot I_0 \cdot \phi \cdot \epsilon \cdot b \cdot C \quad \text{Ecuación 1}$$

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Donde I es la intensidad de la fluorescencia; k , una constante de proporcionalidad; I_0 , la intensidad de la luz incidente; ϕ , el rendimiento cuántico; ϵ , el coeficiente de absortividad molar; b , el paso óptico; C , la concentración del fluoróforo. Esta ecuación solo a bajas concentraciones del fluoróforo ($2,303 \cdot \epsilon \cdot b \cdot C < 0,05$). Además, los biosensores pueden hacer la cuantificación indirectamente, midiendo la atenuación o apagamiento (*quenching*) de la intensidad de emisión del fluoróforo cuando interactúan con el target de acuerdo con la **Ecuación 2**.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde I_0 , es la intensidad de fluorescencia en ausencia del quencher Q ; mientras que I es la intensidad de la fluorescencia en presencia de diferentes concentraciones de $[Q]$; y K_{SV} es la constante de Stern-Volmer (Senthilkumar et al., 2016; Y. Zhang et al., 2015).

4.1.3 Características de un biosensor óptico.

La demanda de sistemas de detección y de dispositivos sensores tiende a la miniaturización sin dejar de lado la fiabilidad, rapidez y capacidad para medir targets a nivel de trazas por lo cual existen ciertos parámetros de calidad que el biosensor debe suplir:

- Precisión y exactitud
- Selectividad que dependerá del componente de reconocimiento
- Sensibilidad que dependerá de la relación señal/ruido en el intervalo de trabajo

y puede ser expresado en términos del límite mínimo de detección (LOD) definido como el cociente entre 3 veces la desviación estándar (SD) de la señal del blanco y la pendiente de la gráfica de respuesta del detector vs concentración del target. Una vez determinado el LOD, también puede ser determinado el límite mínimo de cuantificación (LQD) como 3.33 veces el LOD.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Tiempo de respuesta, que se relaciona con la capacidad de realizar mediciones en tiempo real y una elevada frecuencia de análisis.
- Tiempo de vida, que deberá ser revisado en aplicaciones y metodología que involucren monitorización.
- Estabilidad y reversibilidad de la interfase sensora, que es considerado dos de los factores más importantes para el proceso de reconocimiento selectivo y a la viabilidad de reutilizar el sensor.

Los métodos de bioensayo e inmunoensayo basados en fluorescencia son numerosos y son varios los procesos, y mecanismos involucrados en la emisión radiativa. A continuación, se describen los procesos más comunes implicados en el funcionamiento de un biosensor por fluorescencia.

4.1.4 Transferencia de energía de resonancia Förster (FRET)

La estrategia en la detección se basa en la traducción de una interacción vinculante entre el target y el sitio de unión del bioreceptor que desencadena un cambio en la señal de emisión fluorescente directamente relacionada con la unión covalentemente a la proteína a través de fenómenos como FRET. En este caso, la molécula fotoluminiscente llamado donador puede transferir energía a una molécula aceptora si sus espectros de absorción y emisión son superponibles. La cantidad de energía transferida, así como la emisión total de la muestra dependerá de la proximidad del par molecular, target -receptor. De esta forma, el marcador fluorescente actúa como un pasivo cuya fluorescencia está sintonizada por la presencia (o ausencia) del target (L. Liu, He, Yu, & Wang, 2020).

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

4.1.5 Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

Recientemente se han diseñado ensayos basados para detectar e investigar las propiedades moleculares de las biomoléculas a nivel de una sola molécula o trazas de un target en muestras biológicas. La detección de una sola molécula representa el nivel máximo de sensibilidad y ha sido un objetivo de larga data de los métodos analíticos. Debido a su alta sensibilidad y a que una señal brillante aparece sobre un fondo oscuro, la FCS es una obvia elección para la detección de una sola molécula (Elson, 2011). Este método se basa en el análisis de las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia dependientes del tiempo como resultado de algún proceso dinámico, típicamente la difusión de las moléculas en un pequeño volumen definido que es atravesado por haz láser enfocado. Cuando el fluoróforo se difunde bajo un foco de luz, hay una ráfaga de fotones emitidos desde la muestra debido a múltiples ciclos de excitación-emisión del fluoróforo. Si el fluoróforo se difunde rápidamente fuera del volumen, la explosión de fotones tiene un tiempo de vida corto. Si el fluoróforo se difunde más lentamente, el fotón tendrá una duración más larga. Mediante el análisis de correlación de la emisión dependiente del tiempo se puede determinar el coeficiente de difusión del fluoróforo (Koynov & Butt, 2012).

4.1.6 Análisis del tiempo de vida media de la fluorescencia

En este proceso, la muestra es excitada con un breve pulso de radiación y posteriormente, se mide la disminución de la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo, lo cual está directamente relacionado con el tiempo que la molécula permanece en el estado excitado (vida media). La determinación del tiempo de vida media a partir de los desplazamientos de la señal de emisión dependerá de la frecuencia de las colisiones con el target (*quencher*), de la velocidad en la transferencia de energía y de la velocidad de la transición al estado excitado del fluoróforo (Breen, 2021).

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

4.1.7 Cambio de polarización o anisotropía de fluorescencia

En otros ensayos en que es difícil determinar la concentración real del fluoróforo debido a la fotodegradación o por la exudación, la concentración del target puede determinarse como un cociente entre las intensidades de fluorescencia medidas a dos longitudes de onda diferentes, ya sea de excitación o de emisión (LeTilly & Royer, 1993) . Otra posibilidad, es medir el cambio en la polarización o anisotropía de la fluorescencia del sistema fluorescente al interactuar con el target, de este modo los valores de anisotropía muestran el desplazamiento angular que sufre el fluoróforo en el momento de la absorción y posterior emisión de un fotón. Este fenómeno depende de la velocidad y de la magnitud de la difusión rotacional de las biomoléculas debido a que es comparable con el tiempo de atenuación o apagamiento del fluoróforo (Du, 2015).

4.2 Biosensores ópticos a partir de nanoestructuras

Los nanomateriales han atraído fuertemente la atención en la formulación de nuevos métodos de diagnóstico y aplicaciones en detección. Han sido usados como sistemas mediadores en el transporte de electrones debido a su buena conductividad, actividad electro-catalítica, elevada área superficial para la funcionalización, fuerte capacidad de absorción y propiedades de emisión radiativa. Actualmente, el desarrollo de sensores y métodos de detección basados en fluorescencia ha incorporado diferentes nanotecnologías que han permitido explorar y aprovechar diferentes fenómenos fisicoquímicos y propiedades de los nanomateriales para ampliar el campo de aplicación de los biosensores. Los nanoclusters metálicos (Au, Ag y Cu) son sin duda las nanoestructuras más innovadoras hasta el momento en la creación y diseño de bioensayos basados en fluorescencia. Los fenómenos de emisión de fluorescencia dependiente del tamaño sub-nanométrico y la modulación de dicho tamaño desde el control de parámetros de la ruta de síntesis ha abierto la posibilidad de una amplia variedad de estructuras con propiedades optoelectrónicas

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

únicas y alta biocompatibilidad comparada con los *Quantum dots*. Dichas propiedades, como ha sido mencionado hasta el momento, son el resultado de la estructura electrónica con relación directa al número de átomos reducidos y agregados que conforman el núcleo metálico. Por otra parte, las moléculas ligadas a su superficie cuya función no solo se limita a la estabilización también afecta las transiciones electrónicas entre niveles energéticos del núcleo. conferirá la funcionalidad bioquímica al sistema nanoestructurado.

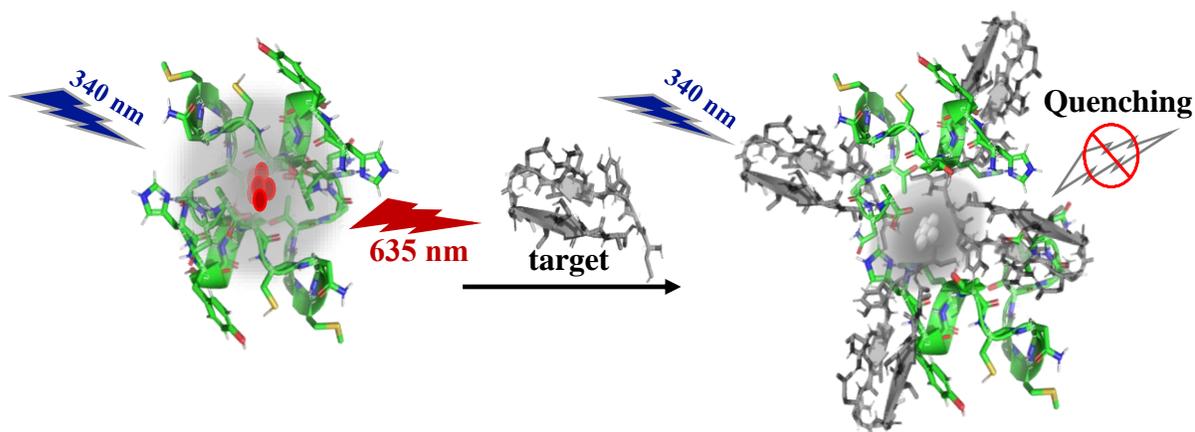
Existen una amplia variedad de sistemas nanoestructurados con propiedades químicas y optoelectrónicas adecuadas para ser empleados como componentes de un biosensor. Generalmente, el nanomaterial está vinculado a un receptor o ligando que le confiere estabilidad y una sinergia de sus propiedades, así como reactividad bioquímica. La elevada relación superficie/volumen de estas nanoestructuras frente a las biomoléculas garantiza la interacción de mayor número de biomoléculas a nivel de superficie (Draz et al., 2012; Goswami et al., 2011).

En este sentido, para crear un biosensor a partir de nanoclusters metálicos basta con incluir como ligando una molécula biológicamente activa; comúnmente se usan péptidos, proteínas, oligonucleótidos y cadenas ADN complementario que dotan a los AuNC de reconocimiento molecular y especificidad. La emisión de fluorescencia de los AuNC es sensible a los elementos que interactuaran en la superficies y proximidad del nanocluster como se ilustra en la Figura 37.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Figura 37.

Apagamiento de la señal de emisión de fluorescencia por la interacción entre AuNC con un apagador.



Las estrategias químicas más empleadas para unir los nanoclusters al ligando o receptor se enumeran a continuación:

- Unión covalente: Formación de un enlace químico entre los grupos funcionales presentes en la superficie de la nanoestructura y la biomolécula de interés. Esta interacción permite mayor estabilidad y reproducibilidad ya que disminuye la fisisorción inespecífica. Las reacciones clásicas de acoplamiento son del tipo amidación y entrecruzamiento (Bartczak & Kanaras, 2011; Kalkhof & Sinz, 2008).

- Unión ligando-ligando: Muchos sistemas nanoestructurados pueden ser directamente sintetizados con grupos funcionales apropiados para la unión directa al receptor o por conjugación a proteínas, péptidos y polímeros con funciones específicas, los cuales se unen a la superficie de la nanoestructura por formación de complejos del tipo Ligando-Metal (P. D. Nguyen et al., 2017; You & Tseng, 2019). Estos biosensores han proporcionado alta reproducibilidad en la inmovilización e incluso pueden aumentar la

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

biocompatibilidad de los nanomateriales ya que logran retener la funcionalidad de la molécula ligando (H. Liu, Wu, Zhang, Burda, & Zhu, 2012).

- Adsorción electrostática: En su mayoría, la superficie de nanopartículas y nanoclusters queda con una carga eléctrica atribuida a los iones circundantes absorbidos (Ho, Tsai, Lin, & Chen, 2004; You & Tseng, 2019). La presencia de dicha carga superficial propicia interacciones del tipo electrostáticas con biomoléculas cargadas positiva o negativamente de acuerdo con las fuerzas atractivas.

- Inmovilización vía interacciones supramoleculares o coordinativas: Son sistemas de nanoestructuras de ligando-receptor basados en afinidad, no covalentes, en el que el sistema biomolécula-receptor puede unirse al sustrato a través de puentes de hidrógeno y puentes salinos (Abánades Lázaro & Forgan, 2019; Murugadoss & Sakurai, 2011). La principal ventaja respecto a otros métodos de inmovilización es la reversibilidad, ya que es posible recuperar el nanomaterial y el bio-receptor modificado.

4.3 Antecedentes en la Detección de Leishmaniasis Usando Nanoestructuras.

El diagnóstico de la Leishmaniasis ha sido uno de los mayores retos clínicos junto con la detección diferenciada de otras coinfecciones como la tuberculosis, malaria, enfermedad de Chagas y VIH, con las cuales, la Leishmaniasis presentan una reactividad cruzada en la mayoría de las pruebas de detección inmunológica (Daltro et al., 2019; Kohanteb & Ardehali, 2005). La presencia de estas coinfecciones no solo dificulta la detección, también eleva drásticamente la morbilidad en los pacientes, aunque se ha evidenciado que en el caso de los parásitos de la malaria y la leishmaniasis no compiten por la misma célula huésped y su interacción no es directa aunque la respuesta inmune es deteriorada (Agusto & ELmojtaba, 2017). Por otra parte, la coinfección de LV y tuberculosis ha incrementado los problemas en Salud Pública ya que la infección por

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Leishmania cambia respuesta inmune a la vacuna contra la tuberculosis, sumado a que la tuberculosis es un inmunosupresora del sistema inmune lo cual promueve la progresión de la leishmaniasis a estados crónicos de la enfermedad. Los métodos clínicos actuales incluyen procedimientos invasivos y de alto riesgo como el aspirado de parásitos desde del bazo y el hígado para la identificación de los protozoos por cultivo celular. Los tests de inmunoensayo empleados incluyen técnicas como la aglutinación directa, pruebas de ELISA para rK39 y pruebas moleculares como la PCR, sin embargo, la mayor dificultad de ellas está relacionada con la baja producción de anticuerpos y en la respuesta asintótica de un gran número de pacientes positivos (Thakur, Joshi, & Kaur, 2020).

Como se ha mencionado hasta el momento, el control y la detección temprana de la leishmaniasis requiere ha requerido la combinación de diferentes estrategias que incluyen tanto pruebas inmunológicas, ensayos moleculares y test parasitológicos para lograr un diagnóstico acertado en el tipo de tratamiento necesario para el paciente. Las limitaciones en la aplicación de cada uno de métodos demandan el desarrollo contante de nuevas estrategias, más rápidas e innovadoras muchas de ellas basadas en biosensores y nuevas nanotecnologías. En numerosos estudios se ha reportado la obtención de nanoestructuras metálicas, poliméricas y dendríticas, y QDots que pueden interactuar y reconocer con una diana biológica específica y como resultado de dicha interacción generar una señal espectroscópica de fácil análisis haciendo uso de diferentes técnicas analíticas (He, Li, & Liu, 2015; J. M. Liu et al., 2013; Ma, Rehman, Sims, & Zeng, 2015; Soler et al., 2019; S. Xu et al., 2017) . Muchos investigadores se han enfocado en el uso de estos biosensores nanoestructurados para realizar el diagnóstico clínico de la Leishmaniasis de forma más efectiva, con mayor especificidad y menor costo respecto a los métodos convencionales como PCR, ELISA, *WestenBlot* y cultivo celular (Ashrafmansouri et al., 2015; Sarkari et al., 2014).

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

En 2010, Á. Perinoto y colaboradores desarrollaron un biosensor para el diagnóstico diferencial de parásitos de *Leishmania amazonensis* y *Trypanosoma cruzi*. La detección rápida y eficiente de la infección por *Leishmania* tuvo lugar a partir bicapas de proteoliposomas en los cuales se incorporaron las proteínas antigénicas. Estos fueron inmovilizados en electrodos capa por capa junto con dendrímeros de PAMAN de cuarta generación. Las medidas de capacitancia permitieron el reconocimiento selectivo de IgG extraídas del suero sanguíneo de ratones BALB/c sanos e infectados por *L. amazonensis* y *T. cruzi*. Adicionalmente, mediante el uso métodos de análisis quimiométricos como PCA (Principal Components Analysis) se logró la diferenciación entre los sueros de ratón estudiados y un límite de detección de IgG de 10^{-5} mg·mL⁻¹ (Perinoto et al., 2010).

A lo anterior se suman los investigadores S. Mohan y R. Prakash quienes diseñaron un biosensor basado en nanoestructuras de óxido de níquel (NiO) para la detección del ADN de *Leishmania donovani* a quien es atribuido los brotes de leishmaniasis visceral (Kala-azar) en la India. El sensor fue desarrollado a partir de nanopartículas NiO sintetizadas por la estrategia de “sol-gel” y depositadas en una película delgada de óxido de indio estaño (ITO). Este microfilm nanoestructurado fue ligado un electrodo de vidrio. Luego de verificar la estabilidad del electrodo, se inmovilizó en la superficie de este, una hebra de un oligonucleótido (ss-DNA) identificado desde el gen 18S r-ARN del parásito *Leishmania*. La respuesta del bioelectrodo, ss-DNA/NiO/ITO, se determinó por voltametría cíclica pulsada en presencia de azul de metileno como mediador redox. Se logró un rango de respuesta lineal entre 2.0 pg·mL⁻¹ y 2.0 µg·mL⁻¹ de ADN complementario. Los resultados constituyen una evidencia promisorio para el diagnóstico de *Kala-azar* por medio de estos sistemas nanoestructurados de detección y pueden ser una

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

alternativa para el estudio de otras enfermedades parasitarias (Mohan, Srivastava, Maheshwari, Sundar, & Prakash, 2011).

Dos años más tarde, *C. Anish y colaboradores* publicaron un trabajo de investigación basado en la detección y diagnóstico de parásito *Leishmania* a través de los glicanos presentes en la superficie de la célula. El biosensor se diseñó como un microarreglo del tetra sacárido Gal-(1→4)-Man, homólogo a la estructura de los glicanos epitopes presentes en los lipofosfoglicanos (LPG) de la superficie de parásitos *L. donovani* y *L. chagasi*. Los LPGs cumplen un rol importante en la patología de la enfermedad y en la generación de anticuerpos como respuesta inmune por lo cual son un blanco atractivo en el diagnóstico de la leishmaniasis y teniendo mayor prevalencia en la etapa promastigote de *Leishmania*. Los anticuerpos para Gal-(1→4)-Man fueron extraídos desde ratones inmunizados, a los cuales se les inyectó el tetrasacárido previamente inmovilizado en una proteína transportadora CMR (Anish et al., 2013). Los glicoconjugados han resultado ser de gran interés como target en la detección de parásitos y bacterias. En el caso de la *Leishmania spp*, los glicoconjugados como el proteoglicano y la fosfatasa ácida son ricos en manosa, y una hipótesis favorable es que las interacciones lectina-sacárido están involucradas en el reconocimiento de estos parásitos. Investigaciones publicadas por *Bárbara Padilla* y colaboradores en la cual explican y resaltan el rol de las lectinas de unión a manosa (MBL de sus siglas en inglés: Manosa binding lectin) en la respuesta inmune frente a las enfermedades parasitarias. Las MBL se unen a la superficie de los parásitos por reconocimiento de carbohidratos tanto en helmintos como protozoarios actuado como opsoninas (mediadores de fagocitosis) (Padilla-Docal et al., 2009). De este modo, otros resultados divulgados por *Santos* y colaboradores mostraron que una MBL podía unirse a un carbohidrato específico de la *Leishmania braziliensis*

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

activando la vía del complemento y que sus niveles elevados en el suero sanguíneo estaban correlacionados con el desarrollo de leishmaniasis visceral (Santos et al., 2001).

La adquisición fácil de la muestra y el desarrollo de metodologías menos invasivas para la detección de las afecciones causadas por la *Leishmania* ha sido el reto de la mayoría de los ensayos clínicos recientes y los estudios también ha sido extendidos al diagnóstico a otras especies animales como perros, gatos y roedores (Fleta, Rodríguez, & Clavel, 2001); ya que son considerados también huéspedes y reservorios durante el ciclo de vida del parásito (Pinedo-Cancino, Laurenti, Kesper, & Umezawa, 2016; Zambrano-Hernandez et al., 2015). En este sentido, en 2016 se reportó el diseño de un biosensor piezoeléctrico basado en nanopartículas de oro y un antígeno recombinante para detectar anticuerpos producidos durante la infección de la Leishmaniasis atribuida a la especie de *L. infantum* en muestras de suero sanguíneo de perros. (Ramos-Jesus, Pontes-de-Carvalho, Melo, Alcântara-Neves, & Dutra, 2016).

Otros estudios en la detección de parásitos de *Leishmania* involucran la identificación de ADN específico, como es el caso del trabajo presentado el año pasado por *Dimitra Toubanaki* y su grupo de investigación sobre un biosensor de flujo lateral basado en nanopartículas de oro para la detección visual de productos de amplificación de ADN específicos para *Leishmania spp.* Estos sensores de flujo lateral (LFBs de sus siglas en inglés) son dispositivos de diagnóstico en los cuales se emplea papel como material de corrida, en el cual se ha revestido de un agente que reacciona de forma específica al contacto con la muestra. En este estudio se emplearon oligonucleótidos *primers*, complementarios al ADN de la mayoría de las especies de *Leishmania*, los cuales fueron conjugados a AuNP. Este biosensor permitió la amplificación y detección por PCR de hasta 10^{-12} moles de DNA de forma visual, la cual tardó unos 20 min sobre muestras de suero sanguíneo de perros infectados con *Leishmania spp.*, de forma rápida y específica (Toubanaki, Athanasiou, &

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Karagouni, 2016) En el mismo año, *N. Sattarahmady* y colaboradores desarrollaron un nuevo método de detección basado en AuNPs ligadas a una hebra simple de kADN del kinetoplasto de *L. major*. La dispersión y agregación de las AuNPs conjugadas en presencia o ausencia de una secuencia de kADN complementario permitió la observación de cambios significativos en el espectro UV-Vis, así como en la coloración de la solución coloidal. Los resultados indicaron que el método es útil para el reconocimiento de material genético de *L. major* y de otras especies de parásitos con un límite de detección de $70 \text{ pg-}\mu\text{L}^{-1}$ (Sattarahmady, Movahedpour, Heli, & Hatam, 2016). Mas adelante, *N. Vanani* y *Sattarahmady*, y su grupo de investigadores reportó la implementación de un sensor electroquímico usando un electrodo de captura recubierto con nanopartículas de oro sobre el que fue inmovilizada una secuencia de ADN complementario al ADN de *L. infantum*. La respuesta analítica del biosensor se fundamentó en la hibridación de la secuencia de ADN de captura y el ADN sintético de parásito usando azul de toluidina como indicador de la hibridación en un rango de concentraciones de 15 a 50 ng-L^{-1} . Este prototipo de sensor mostró una alta estabilidad durante la regeneración de la sonda de captura y reproducibilidad (Nazari-Vanani et al., 2018).

En 2019, *M.F. Diouani* y colaboradores, propusieron un método de biosensor usando nanopartículas de oro conjugadas a caseína para la detección amperométrica de leishmanolisina, también conocida como GP63, una proteasa abundante en la superficie de los parásitos cuya función es degradar sustratos como la caseína, hemoglobina, fibrógeno y albumina. En estos ensayos, las AuNP modificadas con la caseína fueron mezcladas e incubadas con los parásitos de *L. infantum* en solución para finalmente ser recolectadas por centrifugación y dispuestas en un electrodo de carbono serigrafiado para realizar las medidas crono-amperométricas. Mediante este estudio fue posible detectar parásitos en un rango de concentración de 2×10^2 y 2×10^5 parásitos-

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

mL⁻¹. La GP63 es una molécula secretada directamente por parásitos *Leishmania* por lo cual se ha convertido en blanco de estudio para el avance y formulación de nuevos métodos de detección para la Leishmaniasis (Diouani, Ouerghi, Belgacem, & Sayhi, 2019).

Recientemente, *Ahman Mobed* y coinvestigadores reportaron la construcción de un biosensor para Leishmaniasis visceral con posibles aplicaciones en el análisis de muestras de plasma sanguíneo humano. El genosensor basado en la hibridación ADN de *Leishmania spp* con una secuencia target complementaria (cADN) vía detección espectrofotométrica fue preparado a partir de una secuencia tiolada específica del genoma de los parásitos que posteriormente fue inmovilizada en la superficie de AuNPs@Poli-etilenglicol en un electrodo de vidrio. Los resultados demostraron que las AuNP juegan un rol importante en la intensificación y calidad de la señal electroquímica, la cual fue analizada de la usando la técnica de voltametría de onda cuadrática (SWV) en un rango de 10^{-6} a 10^{-21} M de cADN con un límite de detección de 1 zM. Se observó, que las AuNP favorecieron interacciones estables entre los átomos de azufre de la hebra de ADN tiolada y la superficie de oro a través del enlace Au-S, lo cual le confirió al genosensor una mayor sensibilidad sin efectos negativos en el proceso de hibridación con la cADN en un medio acuoso que contenía Fe(CN)₆ (0.1 M)/KCl y toluidina como indicador redox a una temperatura de 37°C. Los autores concluyeron que el uso de AuNP como recubrimiento en los electrodos permite mayor versatilidad en cuanto a la inmovilización de diferentes hebras de ADN que tengan disponibles átomos de azufre para ser fijadas, esto sumado a las propiedades estructurales de estos nanomateriales incluida la excelente conductividad y estabilidad permite el desarrollo de genosensores ultrasensibles para el diagnóstico de una amplia variedad de enfermedades causadas por patógenos a una concentración de material genético muy baja (10^{-21} M) como en el caso de la leishmaniasis visceral (Mobed, Mehri, Hasanzadeh, & Mokhtarzadeh,

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

2020). A este estudio, se suma la optimización de un biosensor basado en electrodos papel nanolitografiado para la detección de ADN realizada por *Fatemed Farshchi* y colaboradores en el mismo año. Los electrodos de papel fueron preparados por escritura directa usando nanoprismas de plata (AgNPr) y puntos cuánticos de carbono (CQDot), adicionalmente, la superficie de estos electrodos fue impregnada con nanopartículas de oro funcionalizadas con cisteamina (CsyA-AuNP) para posteriormente inmovilizar sobre estas un *primer* de ADN monocatenario. La hibridación del ADN con el material genético complementario presente en muestras de plasma sanguíneo permitió la detección de *L. infantum* en un rango de concentración entre 1.0 μM a 1.0 zM por análisis de la señal electroquímica usando cronoamperometría con una alta sensibilidad y selectividad (Farshchi, Saadati, & Hasanzadeh, 2020). La implementación de sensores basados en el reconocimiento e identificación de ADN ha brindado amplias ventajas respecto discriminación equivocada y precisa entre especies diferentes de parásitos *Leishmania*, así como la calidad de las señales electroquímicas que se pueden analizar para traducir la interacción entre el target y el receptor. Sin embargo, la compatibilidad que debe tener la superficie del electrodo respecto al target, así como la inmovilización de receptores compatibles y estables en un ambiente redox sigue siendo una fuerte limitante para estos biosensores.

Así mismo, esta investigación ha sido motivada en la búsqueda constante de nuevos métodos de diagnóstico que sean robustos, específicos y selectivos, y que adicionalmente sean de bajo costo y de fácil acceso para los pacientes con leishmaniasis ya que sigue siendo un reto vigente para la comunidad científica. La exploración de gran variedad de nanomateriales que emitan o amplifiquen una señal medible y diferenciable con una elevada sensibilidad y sensibilidad son necesario para superar las desventajas que actualmente presentan los métodos disponibles.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

4.4 Metodología para la Evaluación de los AuNC@PepHLec2854 como un Biosensor Óptico para la Detección de Leishmaniasis.

Para el análisis de los AuNC@PepHLec2854 como posible prototipo para el biosensado de Leishmaniasis se analizó la señal de emisión de fluorescencia de estos AuNC en presencia del proteoglicano y de fosfatasa ácida, moléculas que juegan un rol muy importante en los procesos de infección y evasión de la respuesta inmune. Estas dos moléculas fueron adquiridas comercialmente para observar el efecto de la adición de concentraciones fijas de dichas moléculas a cada uno de los AuNC obtenidos. Estos ensayos permitieron establecer un rango dinámico lineal de la respuesta de los nanoclusters de oro frente a la adición de diferentes concentraciones de las moléculas target; así como determinar la concentración mínima de estas (PPG y sAP) para producir un cambio significativo en la banda de emisión propia de los AuNC, entendiendo estos cambios como un desplazamiento de la longitud de máxima emisión, intensificación de la señal o apagamiento de esta. Se fijaron parámetros de operación para la adquisición de espectros de fluorescencia como la ganancia, el tiempo de adquisición e integración de la señal y la longitud de onda de excitación a la cual tuvo lugar la máxima emisión.

4.4.1 Análisis de las propiedades luminiscentes de los AuNC en presencia de PPG y sAP comerciales

Inicialmente, se adquirieron moléculas comerciales de PPG (>120kDa) y sAP (~96kDa) de Sigma Aldrich (USA). Se prepararon diluciones seriadas en un rango de concentraciones que posteriormente fueron mezcladas con los nanoclusters fluorescentes de AuNC@PepHLec2854 en experimentos individuales. Se analizaron los espectros de emisión de los AuNC@PepHLec2854 al interactuar con la sAP y el PPG en concentraciones seriadas de 10^{-2} $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 10^3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

4.4.2 Análisis de los AuNC@PepHLec2854 frente sueros sanguíneos de ratón

Tanto los sueros de ratones sanos como los de ratones infectados fueron probados empleando la técnica de espectroscopia de fluorescencia adquiriendo los espectros de emisión de cada uno de AuNC@PepHLec2854 mezclados con cada una de las muestras de suero sanguíneas de ratones BALB/c que desarrollaron Leishmaniasis posterior a la inoculación con parásitos de *Leishmania braziliensis*, una especie presente en el territorio colombiano causante de Leishmaniasis cutánea y mucocutánea (Neira, Peña, Vera, Mantilla, & Escobar, 2019). Se empleó como control negativo, el suero sanguíneo de ratones sanos. Las muestras de suero fueron suministradas por el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP) siguiendo los protocolos de bioseguridad establecidos.

Para este ensayo se dispuso de 200 μL de AuNC en cada uno de los pozos de una microplaca de ELISA a los que seguidamente se adicionó 50 μL de cada muestra de suero sanguíneo previamente diluido con 150 μL de buffer MES (10mM; pH 6.5). La mezcla fue incubada durante 12 horas a temperatura ambiente bajo agitación constantes a 200 rpm. Posteriormente, se extrajo cada volumen de mezcla desde cada uno de los pozos y se dispuso en filtros de amicón de 60 kDa que fueron posteriormente centrifugados a 14000 rpm a 10°C. Se realizaron 2 lavados sucesivos usando buffer MES (pH 6.5) para eliminar las moléculas y especies no ligadas a los sistemas de AuNC. Finalmente, el sobrenadante del filtro fue recolectado y suspendido nuevamente a un volumen de 200 μL de agua deionizada. Cada una de las mezclas de AuNC-Suero fueron analizadas por espectroscopía de fluorescencia y se analizó el comportamiento de la señal de emisión de fluorescencia de los AuNC@PepHLec2854 en presencia de cada muestra de suero, tanto un control negativo de suero sanguíneo proveniente de ratones sanos y el suero sanguíneo de ratones inoculados previamente con parásitos *Leishmania*. Los

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

cambios observados en la banda de emisión como corrimientos en la longitud máxima de emisión, intensificación o apagamiento de la señal fluorescente fueron atribuidos posiblemente a la interacción entre los AuNC@PepHLec2864 y las moléculas objetivo (PPG y sAP) presentes en el suero sanguíneo de ratón infectado.

4.5 Análisis de Resultados de los AuNC@PepHLec2854 como un Biosensor Óptico.

4.5.1 Biosensado de sAP y PPG Comerciales.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el comportamiento de las propiedades luminiscentes de los AuNC@PepHLec2854 al ponerse en contacto con diferentes concentraciones de sAP y PPG. Las concentraciones empleadas para los ensayos fueron iguales a las concentraciones usadas en la determinación de la constante de afinidad por SPR y cuyos resultados fueron presentados previamente en el Capítulo 2.

Los resultados obtenidos para la evaluación de los AuNC@PepHLec2854 como una plataforma de sensado basado en fluorescencia para la detección de sAP y el PPG evidencia la diferencia de afinidades de unión del péptido PepHLec2854 por cada una de las moléculas. En los resultados discutidos en el Capítulo 2, el péptido PepHLec2854 mostró mayor afinidad para la sAP con una K_D ($1,48 \text{ nM} \pm 0.10$) y para el PPG una K_D ($5.0 \text{ nM} \pm 0.26$) lo cual influye significativamente en la facilidad con la que el péptido ligado a los AuNC podría interactúa con los targets.

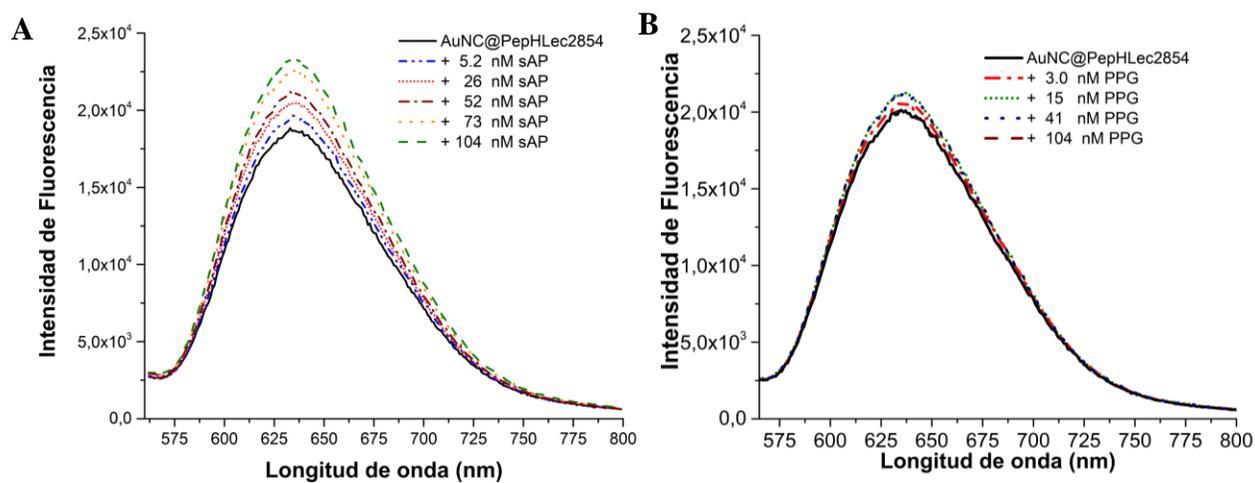
Como se presenta en la figura 38, la adición de la sAP al sistema de AuNC@PepHLec2854 afecta directa y proporcionalmente la intensidad en la emisión de fluorescencia de los nanoclusters. En el espectro se puede observar cómo al aumentar la concentración de la sAP, la intensidad de fluorescencias de los AuNC se incrementa. Este efecto, conocido como intensificación de fluorescencia (EF), es uno de los fenómenos más estudiados para el desarrollo de biosensores ya

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

que no solo logran estabilizar y sensibilizar las señales fluorescentes sino también mejoran el rendimiento cuántico que cambian el tiempo de vida de esta.

Figura 38

Comportamiento de la emisión de fluorescencia de AuNC@PepHLec2854 con la adición de sAP y PPG a diferentes concentraciones.



Nota. A) Espectros de Emisión de AuNC@PepHLec2854 en contacto con sAP en un rango de concentraciones de 5,2-104 nM. B) Espectros de Emisión de AuNC@PepHLec2854 en contacto con PPG en un rango de concentraciones de 3-104 nM. Todos los espectros al excitar con una longitud de onda de ~330 nm

En este sentido, la EF resulta de la interacción entre el fluoróforo (AuN@PepHLec2854) y el target (sAP) en donde factores como la proximidad, la fotoestabilidad del complejo molecular formado (AuNC@PepHLec_sAP), el incremento del rendimiento cuántico y alargamiento del tiempo de decaimiento de la fluorescencia juegan un papel muy importante (Behera & Ram, 2013; Stamplecoskie & Kamat, 2014). Cotidianamente, en la mayoría de los ensayos por fluorescencia, la tasa de decaimiento radiativo no se modifica porque esto depende únicamente del coeficiente de extinción del fluoróforo y el espectro de absorción. Sin embargo, en recientes estudios se ha observado el comportamiento inusual de la tasa de decaimiento radiativo de algunos fluoróforos a

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

interactuar o estar en proximidad (10 a 60 nm) con superficies de sensado basadas en nanoestructuras de metales nobles (Kadir Aslan, Joseph R. Lakowicz, Henryk Szmecinski, 2004).

En nuestro estudio, observamos que la sAP se comportó como un amplificador selectivo de la señal fluorescencia intrínseca de los AuNC@PepHLec2854. Este efecto de intensificación por el contrario no fue observado cuando el mismo sistema de nanoclusters fue evaluado frente al PPG. Este comportamiento de los AuNC@PepHLec2854 al interactuar con la sAP podría estar influenciado por varios factores relacionado tanto con la afinidad y formación de un complejo molecular estable entre la molécula target y los nanoclusters, y con fenómenos de transferencia de carga-energía y procesos de relajación no radiativos que se modifican por acción de moléculas aceptora y/o donadoras en la vecindad del fluoróforo.

En el resultado previo en el análisis de los parámetros cinéticos (k_{on} y k_{off}) y de afinidad (K_d) empleando la técnica de SPR, el complejo sAP-PepHLec2854 registró un tiempo de vida media más largo ($0,004 \text{ s}^{-1}$), representado por la k_{off} . Este valor está directamente relacionado con la estabilidad y el tiempo que dura la interacción molecular. Es de esperarse que PepHLec2854 que actúa como ligando protector del *core* de Au nanoestructurados retenga la misma afinidad por la sAP que la del péptido libre ($K_D = 1,48 \text{ nM}$), por tanto, el complejo formado AuNC@PepHLec2854_sAP sea altamente estable. Como se muestra en los espectros de emisión de la figura 38A, la longitud de onda de emisión de fluorescencia del complejo AuNC@PepHLec2854_sAP corresponde a $\sim 635 \text{ nm}$, la misma longitud de onda de emisión de los nanocluster de oro individuales. Esta observación estaría indicando que el núcleo metálico no sufre modificaciones drásticas que comprometan en su conformación estructural y su fluorescencia intrínseca al formar el complejo molecular. Sin embargo, el incremento de la señal de emisión podría indicar que el complejo AuNC@PepHLec2854-sAP exhibe un mayor rendimiento cuántico

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

y foto-estabilidad (Jeong, Kook, Lee, & Koh, 2018). Diferentes estudios han reportado que la EF en los nanoclusters de oro tiene lugar a través de procesos transferencia de carga desde el ligandos tiolados hacia el núcleo de átomos de Au (Govindaraju, Ankireddy, Viswanath, Kim, & Yun, 2017; D. Li, Chen, & Yang, 2016). En el capítulo anterior discutimos que la fluorescencia de los AuNC se atribuye principalmente a las transiciones electrónicas de los átomos del Metal \rightarrow Metal que tienen por la aparición de estados energéticos discretos que tienen lugar en un régimen de tamaño sub-nanométrico para esos sistemas. Para el caso de la sAP que es una proteína fosforilada rica en serina y treonina podrían actuar fácilmente como agente donador de carga al aproximarse a la superficie los AuNC@PepHLec mediada por la afinidad con el péptido ligado, y eventualmente también competir con el ligando. Por ende, el efecto de EF debida a la interacción de las nanoestructuras de oro con el target mejoraría la carga y su transferencia evitando los procesos de decaimiento no radiativo desde el estado excitado del fluoróforo hacia los estados vibracionales del singulete y triplete del sistema; también disminuye de las pérdidas del brillo por reabsorción de la radiación emitida (H. Y. Huang et al., 2019; J. Zhou, Liu, Feng, Sun, & Li, 2015). Dicha relajación vibracional tiene lugar cuando las moléculas excitadas del fluoróforo colisionan con moléculas del solvente o moléculas circundantes más pequeñas posicionadas a una distancia adecuada a las que el fluoróforo en el estado excitado les transfiere energía para retornar al estado basal (Berezin & Achilefu, 2010). En este sentido, el aumento de la emisión fluorescente observado al adicionar la sAP podría favoreciendo el relajamiento radiativo (emisión) y no los procesos no radiativos. Consecuencia del impedimento estérico que hace una biomolécula más grande al lograr sustituir al péptido ligando en la superficie de los nanoclusters de oro y de este modo dar lugar a una mayor estabilidad y flexibilidad del enlace de coordinación entre los núcleos de Au(0) y el ligando sustituto (X. Zhang, Wu, Liu, Gu, & Chen, 2014). Es de mencionar que este

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

efecto intensificador en la señal es proporcional a la distancia entre el núcleo metálico emisor de fluorescencia y las moléculas de sAP; por lo cual, el EF es linealmente proporcional a la concentración de sAP (Qin, Ma, & Du, 2018). Esta dependencia de la intensidad de fluorescencia permitió la determinación el nivel mínimo de detección (LOD), el cual se define como la mínima variación de concentración de sAP que produjo un incremento en la señal de fluorescencia detectable con una relación señal-ruido superior a 3 veces la desviación estándar (SD) de la señal del blanco (AuNC@PepHLec2854). El LOD registró un valor de $1,73 \pm 0,15$ nM que fue calculado a partir de la ecuación de la recta en el rango dinámico lineal donde la señal del detector es proporcional a la concentración del target con coeficiente de correlación (R^2) igual a 0,967 como se describe en el Anexo H. Adicionalmente, se determinó el límite mínimo de cuantificación (LQD) a partir de $5,77 \pm 0,15$ nM.

Por otra parte, la figura 38B, muestra los espectros de emisión de los AuNC@PepHLec2854 una vez fueron adicionadas diferentes concentraciones de PPG. La EF de los AuNC@PepHLec es casi nula, y no se observó una tendencia proporcionalidad respecto al concentración de PPG agregado. Pese alta afinidad de unión ($K_D = 5,0$ nM), para la formación del complejo PPG-PepHLec2854, no se observa evidencia contundente respecto a la capacidad de los AuNC@PepHLec2854 para generar un señal diferenciable y proporcional a la presencia del proteoglicano. Estos resultados posiblemente podrían estar relacionados a cambios de conformación del péptido que al estar unido, estabilizando el núcleo de Au(0) modificaría su afinidad intrínseca y especificidad por el PPG. Además, en los ensayos por SPR, la estabilidad del complejo PPG-Pep2854 una vez formado fue significativamente baja, ya que el valor tomado para la k_{off} , el cual es interpretado como la rapidez con la que se disocia el par molecular fue mucho más alto ($0,014$ s⁻¹) más alto que la k_{off} del sAP-PepHLec2954 ($0,004$ s⁻¹) (Tian, Maile, Collins, &

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Frelinger, 2007). Hasta aquí, hemos demostrado que el diseño por modelamiento molecular de péptidos como bioreceptores basados en la afinidad de unión por los targets de interés en nuestro estudio ha sido satisfactorio, ya que no solo los parámetros cinéticos de los péptidos sintéticos libres fueron verificados experimentalmente, sino que estos resultados del análisis por fluorescencia dan un indicio claro de que dichos parámetros son retenido aún en el péptido ligado a la superficie de los AuNC y juegan un papel determinante para media y facilitar la detección de sAP con mayor especificidad que con el PPG.

Nuestros resultados son consecuentes con otros estudios reportados hasta el momento donde la fluorescencia de metales nobles (Au, Ag y Cu) es intensificada o apagada por acción de ciertas moléculas de interés presentes circundantes en el medio. Estos targets, con las cuales interactúan de forma específica y selectiva tienen un efecto significativo en los procesos de emisión, absorción y transferencia de energía de los fluoróforo nanoestructurados convirtiéndolos en candidatos novedosos y eficientes en el diseño de pruebas diagnósticas y plataformas de sensado basadas en fluorescencias. Como se ha reportado, la sensibilidad de estos métodos ópticos es de cerca de más de 3-6 órdenes de magnitud más alta respecto a otras técnicas espectroscópicas, por lo cual permite que sea una técnica ampliamente aplicada en el campo clínico donde la concentración de targets es inferior a 1nM. (Y. Chen et al., 2013; Goswami et al., 2011; Halawa et al., 2018; C. C. Huang et al., 2007; M. Liu et al., 2019; Mukherji et al., 2013b; Libing Zhang & Wang, 2014).

4.5.2 Evaluación de los AuNC@PepHLec2854 como un Biosensor para la Detección de Leishmaniasis en muestras de Suero Sanguíneo de Ratón

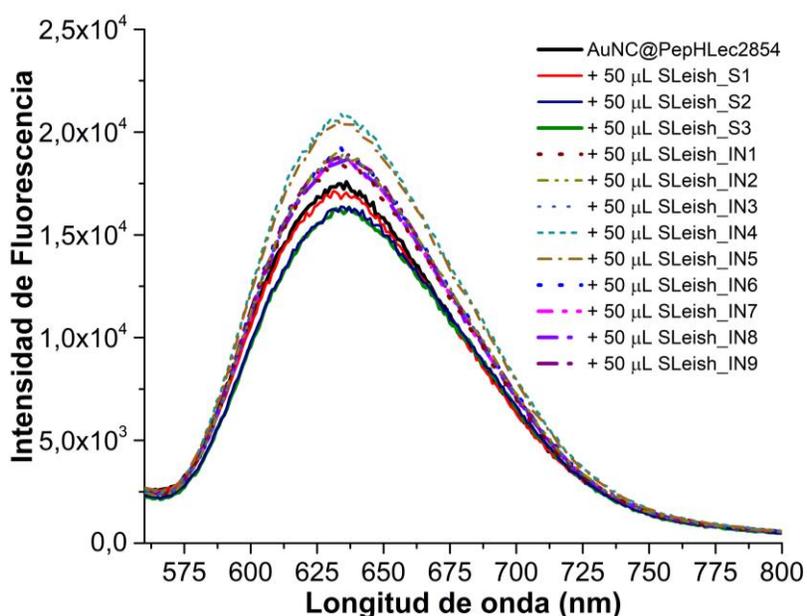
A continuación, se presentan los resultados obtenidos del análisis de la emisión de fluorescencia de los AuNC@PepHLec2854 empleados como un sistema para el biosensado de

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Leishmaniasis en suero sanguíneo de ratones BALB/c infectados. Los espectros de emisión fueron obtenidos una vez finalizado el tiempo de incubación (24 h) de los nanoclusters de oro con cada una de las muestras de suero sanguíneo (pre-tratado) disponibles para este estudio como es presentado en la figura 39. Los sueros de ratón infectados fueron designados como SLeish_IN y los sueros sanguíneos de ratones sanos marcados como SLeish_S.

Figura 39.

Evaluación de los AuNC@PepHLec2854 como un sistema de sensado de Leishmaniasis en suero sanguíneo de ratón infectado.



Nota. Longitud de onda de excitación ~330 nm. IN: Suero infectado; S: suero sano.

En los espectros de emisión de los AuNCs@PepHLec2854 incubados con los sueros sanguíneos de ratones sanos (SLeish_S1; SLeish_S2 y SLeish_S3) se observa un fenómeno de apagamiento o *quenching* de la señal de fluorescencia que puede ser atribuido a varios factores. El primero de ellos, la agregación y posterior aumento de tamaño de los nanoclusters de oro al entrar en contacto con moléculas presentes en el suero sanguíneo, lo cual puede inducir modificaciones drásticas en la superficie de oro nanoestructurado. El suero sanguíneo de ratón está constituido por

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

azúcares como glucosa, proteasas, fosfatasas alcalinas, transferasas, quinasas, peptidasas, ácido úrico y lípidos (Caridad et al., 2011) que podrían interactuar de forma inespecífica con el sistema de AuNC@PepHLec2854. Esto podría explicar el apagamiento de la señal de fluorescencia en los nanoclusters en la presencia de suero sanguíneo sano como resultado de procesos de agregación de los AuNC@PepHLec2854 que induciría la formación de nanoestructuras más grandes y complejos con baja emisión de fluorescencia o por la degradación del péptido ligado por acción de proteasas y peptidasas, lo cual modificaría estados de transición de los AuNC en los cuales intervienen las moléculas de ligando en la superficie de los nanoclusters pero esta situación se evidenciaría en un corrimiento de la longitud de onda de emisión respecto a la longitud de onda de emisión de los nanocluster sin adición del suero (~635 nm), lo cual no es observado en nuestros experimento.

De este modo, es más probable que el factor influyente en el apagamiento de estas señales tiene lugar por procesos de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) en donde algunas las moléculas presentes en el suero sanguíneo actuarían como aceptores de la energía del estado excitado de los AuNC@PepHLec2854 a través de procesos de relajación no radiativa (G. Chen, Song, Xiong, & Peng, 2013; Sengupta & Sengupta, 2002). Se ha reportado que la bilirrubina puede actuar como *quencher* de la fluorescencia de AuNC@HSA por lo cual este comportamiento ha sido recomendado para el desarrollo de un biosensor basado en fluorescencia para la detección de bilirrubina libre en suero sanguíneo humano con un LOD de 248 ± 12 nM (Santhosh, Chinnadayala, Kakoti, & Goswami, 2014). Sin embargo, dada la complejidad de la muestra tratada es difícil atribuir el apagamiento de la emisión de los AuNC@PepHLec2854 a un solo factor o al efecto de un solo tipo de moléculas presentes en el suero sanguíneo.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

De este modo, es más probable que el factor influyente en el apagamiento de estas señales tiene lugar por procesos de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) en donde algunas las moléculas presentes en el suero sanguíneo actuarían como aceptores de la energía del estado excitado de los AuNC@PepHLec2854 a través de procesos de relajación no radiativa (G. Chen et al., 2013; Sengupta & Sengupta, 2002). Se ha reportado que la bilirrubina puede actuar como *quencher* de la fluorescencia de AuNC@HSA por lo cual este comportamiento ha sido recomendado para el desarrollo de un biosensor basado en fluorescencia para la detección de bilirrubina libre en suero sanguíneo humano con un LOD de 248 ± 12 nM (Santhosh et al., 2014). Sin embargo, dada la complejidad de la muestra tratada es difícil atribuir el apagamiento de la emisión de los AuNC@PepHLec2854 a un solo factor o al efecto de un solo tipo de moléculas presentes en el suero sanguíneo.

5. Conclusiones.

Se demostró que los AuNC@PepLec2854 pueden ser empleados como una plataforma de bioensayo de sAP, una proteína secretada mayoritariamente por parásitos *Leishmania ssp.* durante la infección por leishmaniasis. En este sentido la sAP actuó como un intensificador de la fluorescencia de los AuNC@PepHLec2854 mostrando una fuerte dependencia de la concentración de sAP con un LOD de $1,76 \pm 0,15$ nM de sAP y un LQD igual a $5,77 \pm 0,15$ nM con un coeficiente de correlación lineal (R^2) de 0,968. En la formación de complejos moleculares, AuNC@PepHLec2854-sAP, la adición de sAP no supone la pérdida de la emisión de fluorescencia intrínseca de los nanoclusters de oro, la cual permaneció constante a una longitud de onda máxima de 635 nm, esto evidencia que estos sistemas nanoestructurados son altamente estables y que el

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

efecto sobre sus propiedades fotoluminiscente está dado sobre los procesos de relajación no radiativa al favorecer el incremento en la emisión de fluorescencia.

Pese a la afinidad del péptido PepHLec2854 por el PPG (K_D 5,0 nM), los AuNC@PepHLec2854 no lograron detectar de forma proporcional la presencia de PPG de acuerdo con la concentración adicionada. Este hecho, fue positivo al mostrar que existe una preferencia de los AuNC@PepHLec2854 por interactuar con las moléculas de sAP, reforzando el criterio de selectividad que debe tener un sistema de bioensayo para distinguir y reconocer un target con una elevada especificidad.

Finalmente, se logró diseñar y sintetizar un prototipo de biosensor basado en AuNC@PepHLec2854 partiendo de una ruta sintética en donde el péptido sintético PepHLe2854, fue el mejor candidato para formar nanoclusters de oro estables y con propiedades fotoluminiscentes novedosas y únicas capaz de detectar sAP en solución. Lo cual fue aprovechado para proponer e implementar un biosensor basado en la intensificación de la señal de fluorescencia emitida por los nanoclusters en una muestra real de suero sanguíneo proveniente de ratones BALB/c infectado con leishmaniasis. Sorprendentemente, se obtuvo una señal diferenciable de aquellos fueron infectado y el suero sano pese a tratarse de una muestra biológica bastante compleja sin ningún pretratamiento. Aunque el número de muestras reales en nuestros ensayos fue baja, la intensificación de la fluorescencia observada para los AuNC@PepHLec2854 en contacto con los sueros de ratones infectados contrastada con del apagamiento observado cuando los AuNC@PepHLe2854 evaluados con los sueros sanos da una evidencia de alto valor científico y analítico para asegurar la viabilidad, eficiencia y aplicabilidad del sistema de AuNC@PepHLec2854 como una plataforma de detección de la Leishmaniasis.

Referencias Bibliográficas

- Abánades Lázaro, I., & Forgan, R. S. (2019). Application of zirconium MOFs in drug delivery and biomedicine. *Coordination Chemistry Reviews*, 380, 230–259. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.09.009>
- Afzelius, L., Zamora, I., Ridderström, M., Andersson, T. B., Karlén, A., & Masimirembwa, C. M. (2001). Competitive CYP2C9 inhibitors: Enzyme inhibition studies, protein homology modeling, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis. *Molecular Pharmacology*, 59(4), 909–919. <https://doi.org/10.1124/mol.59.4.909>
- Agusto, F. B., & ELmojtaba, I. M. (2017). Optimal control and cost-effective analysis of malaria/visceral leishmaniasis co-infection. In *PLoS ONE* (Vol. 12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171102>
- Aizpurúa Sánchez, M. D. C. (2010). *Estudio de la Interacción de los promastigotes de Leishmania infantum con el suero no inmune de ratón*. Retrieved from <http://eprints.ucm.es/10751/>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Andrade, A. F. B., & Saraiva, E. M. B. (1999). Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. *Parasitology Research*, 85(7), 576–581. <https://doi.org/10.1007/s004360050597>
- Anish, C., Martin, C. E., Wahlbrink, A., Bogdan, C., Ntais, P., Antoniou, M., & Seeberger, P. H. (2013). Immunogenicity and diagnostic potential of synthetic antigenic cell surface glycans of leishmania. *ACS Chemical Biology*, 8(11), 2412–2422. <https://doi.org/10.1021/cb400602k>
- Ashrafmansouri, M., Sarkari, B., Hatam, G., Habibi, P., & Abdolahi Khabisi, S. (2015). Utility of

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- western blot analysis for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Iranian Journal of Parasitology*, 10(4), 599–604.
- Avila-Salas, F., González, R. I., Riós, P. L., Araya-Durán, I., & Camarada, M. B. (2020). Effect of the Generation of PAMAM Dendrimers on the Stabilization of Gold Nanoparticles. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(6), 2966–2976. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00052>
- Baral, A., Basu, K., Ghosh, S., Bhattacharyya, K., Roy, S., Datta, A., & Banerjee, A. (2017). Size specific emission in peptide capped gold quantum clusters with tunable photoswitching behavior. *Nanoscale*, 9(13), 4419–4429. <https://doi.org/10.1039/c7nr00353f>
- Bartczak, D., & Kanaras, A. G. (2011). Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir*, 27, 10119–10123. <https://doi.org/10.1021/la2022177>
- Bash, E. (2015). Peptides as Drugs: Discovery and Development. In Bernd Groner (Ed.), *WILEY-VCH* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Behera, M., & Ram, S. (2013). Spectroscopy-based study on the interaction between gold nanoparticle and poly(vinylpyrrolidone) molecules in a non-hydrocolloid. *International Nano Letters*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-3-17>
- Bejarano, E. E., Uribe, S. I., Pérez-Doria, A., Egurrola, J., Dib, J. C., & Porter, C. H. (2015). Nuevos hallazgos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Acta Biologica Colombiana*, 20(1), 221–224. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.45176>
- Berezin, M. Y., & Achilefu, S. (2010). Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chemical Reviews*, 110(5), 2641–2684. <https://doi.org/10.1021/cr900343z>

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Bhattarai, N., Black, D. M., Boppidi, S., Khanal, S., Bahena, D., Tlahuice-Flores, A., ... Jose-Yacaman, M. (2015). ESI-MS Identification of Abundant Copper–Gold Clusters Exhibiting High Plasmonic Character. *The Journal of Physical Chemistry C*, p. 150211133134003. <https://doi.org/10.1021/jp510893h>
- Blaszczyk, M., Ciemny, M. P., Kolinski, A., Kurcinski, M., & Kmiecik, S. (2019). Protein-peptide docking using CABS-dock and contact information. *Briefings in Bioinformatics*, 20(6), 2299–2305. <https://doi.org/10.1093/bib/bby080>
- Boyer, P., Mènard, D., & Meunier, M. (2010). Nanoclustered Co-Au particles fabricated by femtosecond laser fragmentation in liquids. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(32), 13497–13500. <https://doi.org/10.1021/jp912162g>
- Breen, J. (2021). The Fluorescence Lifetime and Quenching. In *CHM 331 Advances Analytical Chemistry* (pp. 9–11).
- Brogden, K. A. (2011). Perspectives and peptides of the next generation. In D. Drider & S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic antimicrobial peptides: Genes to Applications* (1st ed., pp. 423–440). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_1
- Bruker. (2015). *Instructions for Use - Bruker Guide to MALDI Sample Preparation - Revision E*. Retrieved from www.bruker.com/care
- Bueren-Calabuig, J. A. (2014). Dinámica molecular. *Bioinformática*, 425–442. Retrieved from <https://zenodo.org/record/1066360#.WxiEknqFPIU>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(421), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Can, H., Döşkaya, M., Özdemir, H. G., Şahar, E. A., Karakavuk, M., Pektaş, B., ... Gürüz, Y.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- (2016). Seroprevalence of Leishmania infection and molecular detection of Leishmania tropica and Leishmania infantum in stray cats of Izmir, Turkey. *Experimental Parasitology*, 167, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.05.011>
- Caparrós, E., Serrano, D., Puig-Kröger, A., Riol, L., Riol, F., Martínez, F., ... Colmenares, M. (2005). Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in Leishmania interaction with host phagocytes. *Immunobiology*, 210(2–4), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.05.013>
- Caridad, L. G. A., Diuris, B., Amelia, P., Marisel, R., Bárbara O, G., María E, A., ... Axel, M. (2011). Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. *Revista Electronica de Veterinaria*, 12(11).
- Chang, H. C., & Ho, J. A. A. (2015). Gold Nanocluster-Assisted Fluorescent Detection for Hydrogen Peroxide and Cholesterol Based on the Inner Filter Effect of Gold Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 87(20), 10362–10367. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02452>
- Chang, H., & Chang, Y. (2014). Facile Preparation of High-Quantum-Yield Gold Nanoclusters: Application to Probing Mercuric Ions and Biothiols. *ACS Applied Materials & ...*, 6, 18824–18831. <https://doi.org/10.1021/am504546f>
- Chen, C., & Li, S. (2018). Valence Electron Density-Dependent Pseudopermittivity for Nonlocal Effects in Optical Properties of Metallic Nanoparticles. *ACS Photonics*, 5(6), 2295–2304. <https://doi.org/10.1021/acsphotonics.8b00122>
- Chen, G., Song, F., Xiong, X., & Peng, X. (2013). Fluorescent Nanosensors Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52, 11228–11245. <https://doi.org/10.1021/ie303485n>
- Chen, J. C., Kumar, A. S., Chung, H. H., Chien, S. H., Kuo, M. C., & Zen, J. M. (2006). An

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- enzymeless electrochemical sensor for the selective determination of creatinine in human urine. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 115(1), 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.10.015>
- Chen, P. C., Yeh, T. Y., Ou, C. M., Shih, C. C., & Chang, H. T. (2013). Synthesis of aluminum oxide supported fluorescent gold nanodots for the detection of silver ions. *Nanoscale*, 5(11), 4691–4695. <https://doi.org/10.1039/c3nr00713h>
- Chen, X., Wang, Y., Zhang, Y., Chen, Z., Liu, Y., Li, Z., & Li, J. (2014). Sensitive electrochemical aptamer biosensor for dynamic cell surface N-glycan evaluation featuring multivalent recognition and signal amplification on a dendrimer-graphene electrode interface. *Analytical Chemistry*, 86(9), 4278–4286. <https://doi.org/10.1021/ac404070m>
- Chen, Y., Wang, Y., Wang, C., Li, W., Zhou, H., Jiao, H., ... Yu, C. (2013). Papain-directed synthesis of luminescent gold nanoclusters and the sensitive detection of Cu²⁺. *Journal of Colloid and Interface Science*, 396, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.01.031>
- Cheng, Q., Benson, D. R., Rivera, M., & Kuczera, K. (2006). Influence of point mutations on the flexibility of cytochrome b5: molecular dynamics simulations of holoproteins. *Biopolymers*, 83(3), 297–312. <https://doi.org/10.1002/bip>
- Crasto, D., Malola, S., Brososky, G., Dass, A., & Häkkinen, H. (2014). Single crystal XRD structure and theoretical analysis of the chiral Au₃₀(S-t-Bu)₁₈ cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 136(13), 5000–5005. <https://doi.org/10.1021/ja412141j>
- Dai, Z., Tan, Y., He, K., Chen, H., & Liu, J. (2020). Strict DNA Valence Control in Ultrasmall Thiolate-Protected Near-Infrared-Emitting Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 142(33), 14023–14027. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c00443>
- Daltro, R. T., Leony, L. M., Maron Freitas, N. E., Oliveira Silva, Â. A., Santos, E. F., Del-Rei, R.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- P., ... Neves Santos, F. L. (2019). Cross-Reactivity Using Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens: Diagnostic performance in settings where Chagas disease and American cutaneous or visceral leishmaniasis are coendemic. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(8), 1–10. <https://doi.org/10.1128/JCM.00762-19>
- Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 91–100. <https://doi.org/10.1042/EBC20150010>
- Dave, K. a, Headlam, M. J., Wallis, T. P., & Gorman, J. J. (2011). Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, Chapter 16(February), Unit 16.13. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1613s63>
- de Paiva-Cavalcanti, M., de Morais, R. C. S., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L. A. M., Gonçalves-de-Albuquerque, S. da C., Tavares, D. de H. C., ... Pereira, V. R. A. (2015a). Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. *Cell and Bioscience*, *5*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>
- de Paiva-Cavalcanti, M., de Morais, R. C. S., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L. A. M., Gonçalves-de-Albuquerque, S. da C., Tavares, D. de H. C., ... Pereira, V. R. A. (2015b). Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. *Cell and Bioscience*, *5*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>
- de Paiva Cavalcanti, M., Felinto de Brito, M. E., de Souza, W. V., de Miranda Gomes, Y., & Abath, F. G. C. (2009). The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, *182*(2), 356–358. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.05.018>
- Díez, H., Guzmán, F., Alba, M. P., Cuéllar, A., Thomas, M. C., López, M. C., ... Puerta, C. J.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- (2007). Immunological and structural characterization of an epitope from the *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein. *Peptides*, 28(8), 1520–1526. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.06.017>
- Ding, H., Yang, D., Zhao, C., Song, Z., Liu, P., Wang, Y., ... Shen, J. (2015). Protein–Gold Hybrid Nanocubes for Cell Imaging and Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(8), 4713–4719. <https://doi.org/10.1021/am5083733>
- Diouani, M. F., Ouerghi, O., Belgacem, K., & Sayhi, M. (2019). Casein-Conjugated Gold Nanoparticles for Amperometric Detection of *Leishmania infantum*. *Biosensors*, 9(68), 1–13.
- Draz, M. S., Fang, B. A., Li, L., Chen, Z., Wang, Y., Xu, Y., ... Chen, F. F. (2012). Hybrid nanocluster plasmonic resonator for immunological detection of Hepatitis B virus. *ACS Nano*, 6(9), 7634–7643. <https://doi.org/10.1021/nn3034056>
- Du, Y. (2015). Fluorescence Polarization Assay to Quantify Protein-Protein Interactions in an HTS Format. *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications: Second Edition*, 1278, 529–544. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7>
- Duan, H., & Nie, S. (2007). Etching colloidal gold nanocrystals with hyperbranched and multivalent polymers: A new route to fluorescent and water-soluble atomic clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 129(9), 2412–2413. <https://doi.org/10.1021/ja067727t>
- Ejazi, S. A., Bhattacharyya, A., Choudhury, S. T., Ghosh, S., Sabur, A., Pandey, K., ... Ali, N. (2018). Immunoproteomic Identification and Characterization of *Leishmania* Membrane Proteins as Non-Invasive Diagnostic Candidates for Clinical Visceral Leishmaniasis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30546-y>
- Elmahallawy, E. K., Sampedro Martínez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M., & Gutierrez Fernández, J. (2014). Diagnosis of leishmaniasis.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Journal of Infection in Developing Countries*, 8(8), 961–972.
<https://doi.org/10.3855/jidc.4310>
- Elson, E. L. (2011). Fluorescence correlation spectroscopy: Past, present, future. *Biophysical Journal*, 101(12), 2855–2870. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.012>
- Fabris, L., Antonello, S., Armelao, L., Donkers, R. L., Polo, F., Toniolo, C., & Maran, F. (2006). Gold nanoclusters protected by conformationally constrained peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), 326–336. <https://doi.org/10.1021/ja0560581>
- Farshchi, F., Saadati, A., & Hasanzadeh, M. (2020). Optimized DNA-based biosensor for monitoring: *Leishmania infantum* in human plasma samples using biomacromolecular interaction: A novel platform for infectious disease diagnosis. *Analytical Methods*, 12(39), 4759–4768. <https://doi.org/10.1039/d0ay01516d>
- Fleta, J., Rodríguez, G., & Clavel, A. (2001). Leishmaniasis visceral y cutaneomucosa: aspectos epidemiológicos y clínicos. *Medicina Integral*, 38, 264–269. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-leishmaniasis-visceral-cutaneomucosa-aspectos-epidemiologicos-13020963>
- Fonseca, L., Capó de Paz, V., López, M. C., & Gutierrez, A. (2011). Detección por inmunohistoquímica de *Leishmania infantum* en hámster infectado experimentalmente. *Rev Cubana Med Trop*, 63(3), 257–262.
- Forestier, C. L., Gao, Q., & Boons, G. J. (2014). *Leishmania* lipophosphoglycan: How to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(January), 193. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00193>
- Forward, J. M., Bohmann, D., Fackler, J. P., & Staples, R. J. (1995). Luminescence Studies of

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Gold (I) Thiolate Complexes. *Inorganic Chemistry*, 34(I), 6330–6336.
<https://doi.org/10.1021/ic00129a019>
- Franco, L. H., Beverley, S. M., & Zamboni, D. S. (2012). Innate immune activation and subversion of mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of Parasitology Research*, Vol. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/165126>
- Gao, B., Sherman, P., Luo, L., Bowie, J., & Zhu, S. (2009). Structural and functional characterization of two genetically related meucin peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides. *FASEB Journal*, 23(4), 1230–1245.
<https://doi.org/10.1096/fj.08-122317>
- General, I. J., Dragomirova, R., & Meirovitch, H. (2011). New method for calculating the absolute free energy of binding: The effect of a mobile loop on the avidin/biotin complex. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(1), 168–175. <https://doi.org/10.1021/jp1076752>
- Goswami, N., Giri, A., Bootharaju, M. S., Xavier, P. L., Pradeep, T., & Pal, S. K. (2011). Copper quantum clusters in protein matrix: Potential sensor of Pb²⁺ ion. *Analytical Chemistry*, 83(24), 9676–9680. <https://doi.org/10.1021/ac202610e>
- Goswami, N., Lin, F., Liu, Y., Leong, D. T., & Xie, J. (2016). Highly Luminescent Thiolated Gold Nanoclusters Impregnated in Nanogel. *Chemistry of Materials*, 28(11), 4009–4016.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b01431>
- Goswami, N., Yao, Q., Luo, Z., Li, J., Chen, T., & Xie, J. (2016). Luminescent Metal Nanoclusters with Aggregation-Induced Emission. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(6), 962–975.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b02765>
- Govindaraju, S., Ankireddy, S. R., Viswanath, B., Kim, J., & Yun, K. (2017). Fluorescent Gold Nanoclusters for Selective Detection of Dopamine in Cerebrospinal fluid. *Scientific Reports*,

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep40298>

Gregory Schaaff, T., & Whetten, R. L. (2000). Giant gold-glutathione cluster compounds: Intense optical activity in metal-based transitions. *Journal of Physical Chemistry B*, *104*(12), 2630–2641. <https://doi.org/10.1021/jp993691y>

Guzmán, F., & Barberis, S. (2007). Peptide synthesis : chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, *10*(2), 279–314. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue2-fulltext-13>

Häkkinen, H., Walter, M., & Grönbeck, H. (2006). Divide and protect: Capping gold nanoclusters with molecular gold-thiolate rings. *Journal of Physical Chemistry B*, *110*(20), 9927–9931. <https://doi.org/10.1021/jp0619787>

Halawa, M. I., Lai, J., & Xu, G. (2018). Materials Today Nano Gold nanoclusters : synthetic strategies and recent advances in fluorescent sensing. *Materials Today Nano*, *3*, 9–27. <https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2018.11.001>

Haney, E. F., Nazmi, K., Lau, F., Bolscher, J. G. M., & Vogel, H. J. (2009). Novel lactoferrin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin. *Biochimie*, *91*(1), 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>

Hatam, G. R., Ghatee, M. A., Hossini, S. M. H., & Sarkari, B. (2009). Improvement of the newly developed latex agglutination test (Katex) for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *23*(4), 202–205. <https://doi.org/10.1002/jcla.20312>

He, Y., Li, J., & Liu, Y. (2015). Reusable and Dual-Potential Responses Electrogenerated Chemiluminescence Biosensor for Synchronously Cytosensing and Dynamic Cell Surface N-Glycan Evaluation. *Analytical Chemistry*, *87*(19), 9777–9785. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02048>

Herrera-Nieto, P., Pérez, A., & De Fabritiis, G. (2020). Small Molecule Modulation of Intrinsically

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Disordered Proteins Using Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(10), 5003–5010. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00381>
- Herrera, G., Castillo, A., Ayala, M. S., Flórez, C., Cantillo-Barraza, O., & Ramirez, J. D. (2019). Evaluation of four rapid diagnostic tests for canine and human visceral Leishmaniasis in Colombia. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4353-0>
- Ho, K. C., Tsai, P. J., Lin, Y. S., & Chen, Y. C. (2004). Using biofunctionalized nanoparticles to probe pathogenic bacteria. *Analytical Chemistry*, 76(24), 7162–7168. <https://doi.org/10.1021/ac048688b>
- Hong, S., & Li, X. (2013). Optimal size of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy under different conditions. *Journal of Nanomaterials*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/790323>
- Huang, C. C., Yang, Z., Lee, K. H., & Chang, H. T. (2007). Synthesis of highly fluorescent gold nanoparticles for sensing mercury(II). *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(36), 6824–6828. <https://doi.org/10.1002/anie.200700803>
- Huang, H. Y., Cai, K. Bin, Talite, M. J., Chou, W. C., Chen, P. W., & Yuan, C. T. (2019). Coordination-induced emission enhancement in gold-nanoclusters with solid-state quantum yields up to 40% for eco-friendly, low-reabsorption nano-phosphors. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40706-3>
- Huang, J., Gao, X., Jia, J., Kim, J., & Li, Z. (2014). Graphene oxide-based amplified fluorescent biosensor for Hg(2+) detection through hybridization chain reactions. *Analytical Chemistry*, 86(6), 3209–3215. <https://doi.org/10.1021/ac500192r>
- Huang, X., Li, B., Li, L., Zhang, H., Majeed, I., Hussain, I., & Tan, B. (2012). Facile Preparation of Highly Blue Fluorescent Metal Nanoclusters in Organic Media. *The Journal of Physical*

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Chemistry C, 116, 448–455. <https://doi.org/10.1021/jp209662n>

Huh, Y. S., & Erickson, D. (2010). Aptamer based surface enhanced Raman scattering detection of vasopressin using multilayer nanotube arrays. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(5), 1240–1243. [https://doi.org/DOI 10.1016/j.bios.2009.09.040](https://doi.org/DOI%2010.1016/j.bios.2009.09.040)

Ibarra-Meneses, A. V., Moreno, J., & Carrillo, E. (2020). New Strategies and Biomarkers for the Control of Visceral Leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 36(1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.005>

Ielasi, F. S., Alioscha-perez, M., Donohue, D., Claes, S., Sahli, H., Schols, D., & Willaert, R. G. (2016). Lectin-Glycan Interaction Network-Based Identification of Host. *MBio*, 7(4), 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00584-16.Invited>

Ilg, T., Stierhof, Y. D., Wiese, M., Overath, P., & McConville, M. J. (1994). Characterization of phosphoglycan-containing secretory products of Leishmania. *Parasitology*, 108(S1), S63–S71. <https://doi.org/10.1017/S0031182000075739>

Ilg, Thomas, Demar, M., & Harbecke, D. (2001). Phosphoglycan Repeat-deficient Leishmania mexicana Parasites Remain Infectious to Macrophages and Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 4988–4997. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008030200>

Jauset-Rubio, M., Svobodová, M., Mairal, T., McNeil, C., Keegan, N., Saeed, A., ... O'Sullivan, C. K. (2016). Ultrasensitive, rapid and inexpensive detection of DNA using paper based lateral flow assay. *Scientific Reports*, 6(November), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep37732>

Jeong, Y., Kook, Y. M., Lee, K., & Koh, W. G. (2018). Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: General approaches and a review of recent developments. *Biosensors and Bioelectronics*, 111, 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.007>

Jin, R., Zeng, C., Zhou, M., & Chen, Y. (2016). Atomically Precise Colloidal Metal Nanoclusters

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- and Nanoparticles: Fundamentals and Opportunities. *Chemical Reviews*, 116(18), 10346–10413. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00703>
- Jolly, P., Zhuravski, P., Hammond, J. L., Miodek, A., Liébana, S., Bertok, T., ... Estrela, P. (2017). Self-assembled gold nanoparticles for impedimetric and amperometric detection of a prostate cancer biomarker. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 251, 637–643. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.040>
- Joseph, D., & Geckeler, K. E. (2014). Synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters using egg white proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115, 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.11.017>
- Júnior, W. L. B., De Araújo, P. S. R., De Andrade, L. D., Dos Santos, A. M. A., Da Silva, M. A. L., Dantas-Torres, F., & Medeiros, Z. (2015). Rapid tests and the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome coinfection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(5), 967–969. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0798>
- Kaatz, F. H., & Bultheel, A. (2019). Magic Mathematical Relationships for Nanoclusters—Errata and Addendum. *Nanoscale Research Letters*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3115-7>
- Kadir Aslan, Joseph R. Lakowicz, Henryk Szmanski, C. D. G. (2004). Metal-Enhanced Fluorescence Solution-Based Sensing Platform. *J Fluoresc.*, 14(6), 1–7. <https://doi.org/10.1023/B>
- Kakefuda, Y., Narita, K., Komeda, T., Yoshimoto, S., & Hasegawa, S. (2008). Synthesis and conductance measurement of periodic arrays of gold nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 93(16), 16–19. <https://doi.org/10.1063/1.3001938>

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Kalkhof, S., & Sinz, A. (2008). Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2231-5>
- Kawasaki, H., Hamaguchi, K., Osaka, I., & Arakawa, R. (2011). Ph-dependent synthesis of pepsin-mediated gold nanoclusters with blue green and red fluorescent emission. *Advanced Functional Materials*, 21(18), 3508–3515. <https://doi.org/10.1002/adfm.201100886>
- Kelsey C. Martin Mhatre V. Ho, J.-A. L. (2012). Persistent homology analysis of protein structure, flexibility and folding. *Int J Numer Method Biomed Eng*, 30(8), 814–844. <https://doi.org/10.1002/cnm.2655>. Persistent
- Kohanteb, J., & Ardehali, S. (2005). Cross-reaction of sera from patients with various infectious diseases with *Leishmania infantum*. *Medical Principles and Practice*, 14(2), 79–82. <https://doi.org/10.1159/000083915>
- Koynov, K., & Butt, H. J. (2012). Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 17(6), 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.09.003>
- Kubo, R. (1962). Electronic Properties of Metallic Fine Particles. I. *Journal of the Physical Society of Japan*, Vol. 17, pp. 975–986. <https://doi.org/10.1143/JPSJ.17.975>
- Kumar, A., Ma, H., Zhang, X., Huang, K., Jin, S., Liu, J., ... Liang, X. J. (2012). Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and targeted peptides for cancer treatment. *Biomaterials*, Vol. 33, pp. 1180–1189. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.058>
- La, P., Biggin, P. C., Tieleman, D. P., & Sansom, M. S. P. (1999). *Simulation studies of the interaction of antimicrobial peptides and lipid bilayers*. 1462, 185–200.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., Mcwilliam, H., ...

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Applications Note*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Latif, U., & Dickert, F. L. (2011). Conductometric sensors for monitoring degradation of automotive engine oil. *Sensors*, 11(9), 8611–8625. <https://doi.org/10.3390/s110908611>
- Leland C. Clark, C. L. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals New York Academy of Science*, 102, 29–45.
- LeTilly, V., & Royer, C. A. (1993). Fluorescence Anisotropy Assays Implicate Protein-Protein Interactions in Regulating trp Repressor DNA Binding. *Biochemistry*, 32(30), 7753–7758. <https://doi.org/10.1021/bi00081a021>
- Li, D., Chen, Z., & Yang, T. (2016). Fluorescence enhancement of DHLA protected gold nanoclusters in the presence of salt. *New Journal of Chemistry*, 40(4), 3781–3785. <https://doi.org/10.1039/c6nj00127k>
- Li, H., Huang, H., Feng, J. J., Luo, X., Fang, K. M., Wang, Z. G., & Wang, A. J. (2017). A polypeptide-mediated synthesis of green fluorescent gold nanoclusters for Fe³⁺ sensing and bioimaging. *Journal of Colloid and Interface Science*, 506, 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.062>
- Li, Q., Zhou, M., So, W. Y., Huang, J., Li, M., Kauffman, D. R., ... Jin, R. (2019). A Monocuboctahedral Series of Gold Nanoclusters: Photoluminescence Origin, Large Enhancement, Wide Tunability, and Structure-Property Correlation. *Journal of the American Chemical Society*, 141(13), 5314–5325. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b13558>
- Li, S. J., Deng, D. H., Shi, Q., & Liu, S. R. (2012). Electrochemical synthesis of a graphene sheet and gold nanoparticle-based nanocomposite, and its application to amperometric sensing of dopamine. *Microchimica Acta*, 177(3–4), 325–331. <https://doi.org/10.1007/s00604-012->

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

0782-9

- Li, Yinhan, Peng, W., & You, X. (2017). Determination of dopamine by exploiting the catalytic effect of hemoglobin-stabilized gold nanoclusters on the luminol-NaIO₄ chemiluminescence system. *Microchimica Acta*, *184*(9), 3539–3545. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2374-1>
- Li, Yuanyuang, Schluesener, H. J., & Xu, S. (2010). Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin*, *43*(1), 29–41. <https://doi.org/10.1007/BF03214964>
- Ligler, F. S. (2009). Perspective on optical biosensors and integrated sensor systems. *Analytical Chemistry*, *81*(2), 519–526. <https://doi.org/10.1021/ac8016289>
- Lin, C. A. J., Yang, T. Y., Lee, C. H., Huang, S. H., Sperling, R. A., Zanella, M., ... Chang, W. H. (2009). Synthesis, characterization, and bioconjugation of fluorescent gold nanoclusters toward biological labeling applications. *ACS Nano*, *3*(2), 395–401. <https://doi.org/10.1021/nn800632j>
- Lin, H., Li, L., Lei, C., Xu, X., Nie, Z., Guo, M., ... Yao, S. (2013). Immune-independent and label-free fluorescent assay for Cystatin C detection based on protein-stabilized Au nanoclusters. *Biosensors and Bioelectronics*, *41*(1), 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.030>
- Liu, C. L., Wu, H. T., Hsiao, Y. H., Lai, C. W., Shih, C. W., Peng, Y. K., ... Chou, P. T. (2011). Insulin-directed synthesis of fluorescent gold nanoclusters: Preservation of insulin bioactivity and versatility in cell imaging. *Angewandte Chemie - International Edition*, *50*(31), 7056–7060. <https://doi.org/10.1002/anie.201100299>
- Liu, H., Wu, X., Zhang, X., Burda, C., & Zhu, J. J. (2012). Gold nanoclusters as signal amplification labels for optical immunosensors. *Journal of Physical Chemistry C*, *116*(3), 2548–2554. <https://doi.org/10.1021/jp206256j>

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Liu, J. M., Chen, J. T., & Yan, X. P. (2013). Near infrared fluorescent trypsin stabilized gold nanoclusters as surface plasmon enhanced energy transfer biosensor and in vivo cancer imaging bioprobe. *Analytical Chemistry*, 85(6), 3238–3245. <https://doi.org/10.1021/ac303603f>
- Liu, L., He, F., Yu, Y., & Wang, Y. (2020). Application of FRET Biosensors in Mechanobiology and Mechanopharmacological Screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.595497>
- Liu, M., Tang, F., Yang, Z., Xu, J., & Yang, X. (2019). Recent Progress on Gold-Nanocluster-Based Fluorescent Probe for Environmental Analysis and Biological Sensing. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1–10.
- Luna, D. M. N., Oliveira, M. D. L., Nogueira, M. L., & Andrade, C. A. S. (2014). Biosensor based on lectin and lipid membranes for detection of serum glycoproteins in infected patients with dengue. *Chemistry and Physics of Lipids*, 180, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.02.008>
- Ma, F., Rehman, A., Sims, M., & Zeng, X. (2015). Antimicrobial susceptibility assays based on the quantification of bacterial lipopolysaccharides via a label free lectin biosensor. *Analytical Chemistry*, 87(8), 4385–4393. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00165>
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., ... Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Manikas, A. C., Causa, F., Della Moglie, R., & Netti, P. A. (2013). Tuning gold nanoparticles interfaces by specific peptide interaction for surface enhanced raman spectroscopy (SERS) and separation applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(16), 7915–7922.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

<https://doi.org/10.1021/am401998m>

- Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2010). A fast method for large-scale de novo peptide and miniprotein structure prediction. *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 31, pp. 726–738. <https://doi.org/10.1002/jcc.21365>
- McConville, M. J., Schnur, L. F., Jaffe, C., & Schneider, P. (1995). Structure of Leishmania lipophosphoglycan: Inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochemical Journal*, 310(3), 807–818. <https://doi.org/10.1042/bj3100807>
- Merida-de-Barros, D. A., Chaves, S. P., Belmiro, C. L. R., & Wanderley, J. L. M. (2018). Leishmaniasis and glycosaminoglycans: a future therapeutic strategy? *Parasites & Vectors*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2953-y>
- Mobed, A., Mehri, P., Hasanzadeh, M., & Mokhtarzadeh, A. (2020). Binding of Leishmania spp with gold nanoparticles supported polyethylene glycol and its application for the sensitive detection of infectious photogenes in human plasma samples: A novel biosensor. *Journal of Molecular Recognition*, 33(7), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jmr.2839>
- Mohan, S., Srivastava, P., Maheshwari, S. N., Sundar, S., & Prakash, R. (2011). Nano-structured nickel oxide based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Analyst*, 136(13), 2845–2851. <https://doi.org/10.1039/C1AN15031F>
- Mollica, L., Baias, M., Lewandowski, J. R., Wylie, B. J., Sperling, L. J., Rienstra, C. M., ... Blackledge, M. (2012). Atomic-resolution structural dynamics in crystalline proteins from NMR and molecular simulation. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(23), 3657–3662. <https://doi.org/10.1021/jz3016233>
- Monfregola, L., Vitale, R. M., Amodeo, P., & De Luca, S. De. (2009). A SPR strategy for high-throughput ligand screenings based on synthetic peptides mimicking a selected subdomain of

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- the target protein: A proof of concept on HER2 receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(19), 7015–7020. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.08.004>
- Monge-Maillo, B., & López-Vélez, R. (2013). Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs*, 73(17), 1889–1920. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0132-1>
- Mukherji, R., Samanta, A., Illathvalappil, R., Chowdhury, S., Prabhune, A., & Devi, R. N. (2013a). Selective imaging of quorum sensing receptors in bacteria using fluorescent Au nanocluster probes surface functionalized with signal molecules. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(24), 13076–13081. <https://doi.org/10.1021/am404093m>
- Mukherji, R., Samanta, A., Illathvalappil, R., Chowdhury, S., Prabhune, A., & Devi, R. N. (2013b). Selective imaging of quorum sensing receptors in bacteria using fluorescent au nanocluster probes surface functionalized with signal molecules. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(24), 13076–13081. <https://doi.org/10.1021/am404093m>
- Murugadoss, A., & Sakurai, H. (2011). Chitosan-stabilized gold, gold-palladium, and gold-platinum nanoclusters as efficient catalysts for aerobic oxidation of alcohols. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 341(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2011.03.019>
- Narla, S. N., Pinnamaneni, P., Nie, H., Li, Y., & Sun, X. L. (2014). BSA-boronic acid conjugate as lectin mimetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 562–567. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.006>
- Nazari-Vanani, R., Sattarahmady, N., Yadegari, H., Delshadi, N., Hatam, G. R., & Heli, H. (2018). Electrochemical quantitation of *Leishmania infantum* based on detection of its kDNA genome and transduction of non-spherical gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 1041, 40–49.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.036>

Neira, L. F., Peña, D. P., Vera, A. M., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2019). Leishmaniasis cutánea inducida por especies de *Leishmania Viannia* en ratones BALB/c y eficacia de un tratamiento tópico. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 51(1), 33–42. <https://doi.org/10.18273/revsal.v51n1-2019004>

Ngamdee, K., Tuntulani, T., & Ngeontae, W. (2015). L-Cysteine modified luminescence nanomaterials as fluorescence sensor for Co^{2+} : Effects of core nanomaterials in detection selectivity. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 216, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.04.019>

Nguyen, P. D., Cong, V. T., Baek, C., & Min, J. (2017). Fabrication of peptide stabilized fluorescent gold nanocluster/graphene oxide nanocomplex and its application in turn-on detection of metalloproteinase-9. *Biosensors and Bioelectronics*, 89(1), 666–672. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.031>

Nguyen, T. A. D., Jones, Z. R., Goldsmith, B. R., Buratto, W. R., Wu, G., Scott, S. L., & Hayton, T. W. (2015). A Cu₂₅ Nanocluster with Partial Cu(0) Character. *Journal of the American Chemical Society*, 137(41), 13319–13324. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b07574>

Nogueira, P. A., & Teófilo, L. F. (2012). A probabilistic approach to organic component detection in *Leishmania* infected microscopy images. *IFIP Advances in Information and Communication Technology*, 381 AICT(PART 1), 1–10. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33409-2_1

Padilla-Docal, B., Dorta-Contreras, A., Bu-Coifiu, R., & Callol-Barroso, J. (2009). Rol de la lectina de unión a manosa en infecciones parasitarias. *Rev Panam Infecto*, 11(3), 45–48.

Pakiari, a H., & Jamshidi, Z. (2007). Interaction of amino acids with gold and silver clusters. *The*

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Journal of Physical Chemistry. A*, *111*, 4391–4396. <https://doi.org/10.1021/jp070306t>
- Pearson, W. R. (2013). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. In *Curr Protoc Bioinformatics* (Vol. 42, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>. An
- Pedone, E., Saviano, M., Bartolucci, S., Rossi, M., Ausili, A., Scirè, A., ... Tanfani, F. (2005). Temperature-, SDS-, and pH-induced conformational changes in protein disulfide oxidoreductase from the archaeon *Pyrococcus furiosus*: A dynamic simulation and fourier transform infrared spectroscopic study. *Journal of Proteome Research*, *4*(6), 1972–1980. <https://doi.org/10.1021/pr050152z>
- Peláez, E. C., Estevez, M. C., Portela, A., Salvador, J. P., Marco, M. P., & Lechuga, L. M. (2018). Nanoplasmonic biosensor device for the monitoring of acenocoumarol therapeutic drug in plasma. *Biosensors and Bioelectronics*, *119*(August), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.011>
- Perinoto, Â. C., Maki, R. M., Colhone, M. C., Santos, F. R., Migliaccio, V., Daghasanli, K. R., ... Zucolotto, V. (2010). Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: Innovations in bioanalytics for a neglected disease. *Analytical Chemistry*, *82*(23), 9763–9768. <https://doi.org/10.1021/ac101920t>
- Pilolli, R., Ditaranto, N., Monopoli, A., Nacci, A., Palmisano, F., Sabbatini, L., & Cioffi, N. (2014). Designing functionalized gold surfaces and nanostructures for Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry. *Vacuum*, *100*, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2013.07.032>
- Pinedo-Cancino, V., Laurenti, M. D., Kesper, N., & Umezawa, E. S. (2016). Evaluation of *Leishmania (Leishmania) infantum* excreted-secreted antigens for detection of canine leishmaniasis. *Acta Tropica*, *161*, 41–43. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.05.010>

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Pomastowski, P., & Buszewski, B. (2019). Complementarity of matrix-and nanostructure-assisted laser desorption/ionization approaches. *Nanomaterials*, 9(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/nano9020260>
- Prada, Y. A., Guzmán, F., Rondón, P., Escobar, P., Ortiz, C., Sierra, D. A., ... Mejía-Ospino, E. (2016). A New Synthetic Peptide with In vitro Antibacterial Potential Against Escherichia coli O157:H7 and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(3), 134–140. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9219-9>
- Qian, H., Zhu, M., Wu, Z., & Jin, R. (2012). Quantum sized gold nanoclusters with atomic precision. *Accounts of Chemical Research*, 45(9), 1470–1479. <https://doi.org/10.1021/ar200331z>
- Qin, H., Ma, D., & Du, J. (2018). Distance dependent fluorescence quenching and enhancement of gold nanoclusters by gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 189, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.08.025>
- Ramanathan, K., Jönsson, B. R., & Danielsson, B. (2001). Sol-gel based thermal biosensor for glucose. *Analytica Chimica Acta*, 427(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01095-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01095-3)
- Ramos-Jesus, J., Pontes-de-Carvalho, L. C., Melo, S. M. B., Alcântara-Neves, N. M., & Dutra, R. F. (2016). A gold nanoparticle piezoelectric immunosensor using a recombinant antigen for detecting Leishmania infantum antibodies in canine serum. *Biochemical Engineering Journal*, 110, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.027>
- Ray, K., Szmazinski, H., & Lakowicz, J. R. (2009). Enhanced fluorescence of proteins and label-free bioassays using aluminum nanostructures. *Analytical Chemistry*, 81(15), 6049–6054. <https://doi.org/10.1021/ac900263k>

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Reiter-Owona, I., Rehkaemper-Schaefer, C., Arriens, S., Rosenstock, P., Pfarr, K., & Hoerauf, A.

(2016). Specific K39 antibody response and its persistence after treatment in patients with imported leishmaniasis. *Parasitology Research*, *115*(2), 761–769. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4801-8>

Rogers, M. E. (2012). The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Frontiers in Microbiology*, *3*(JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00223>

Romero, G. A. S., Orge, M. D. L. G. O., Guerra, M. V. D. F., Paes, M. G., Macêdo, V. D. O., & De Carvalho, E. M. (2005). Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* or *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Brazil. *Acta Tropica*, *93*(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.005>

Roy, M. J., Winkler, S., Hughes, S. J., Whitworth, C., Galant, M., Farnaby, W., ... Ciulli, A. (2019). SPR-Measured Dissociation Kinetics of PROTAC Ternary Complexes Influence Target Degradation Rate [Brief-report]. *ACS Chemical Biology*, *14*(3), 361–368. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00092>

Russell, B. A., Jachimska, B., Kralka, I., Mulheran, P. A., & Chen, Y. (2016). Human serum albumin encapsulated gold nanoclusters: Effects of cluster synthesis on natural protein characteristics. *Journal of Materials Chemistry B*, *4*(42), 6876–6882. <https://doi.org/10.1039/c6tb01827k>

Saha, A., Basiruddin, S. K., Sarkar, R., Pradhan, N., & Jana, N. R. (2009). Functionalized Plasmonic - Fluorescent Nanoparticles for Imaging and Detection. *J. Phys. Chem. C*, 18492–18498. <https://doi.org/10.1021/jp904791h>

Salud, I. N. de. (2006). Guía protocolo para la vigilancia en salud pública de leishmaniasis. *Plan*

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Nacional de Salud Pública, 1–27. Retrieved from <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion->

[Vigilancia/sivigila/Protocolos%5CnSIVIGILA/PRO%5CnLeishmaniasis.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%5CnSIVIGILA/PRO%5CnLeishmaniasis.pdf)

Santhosh, M., Chinnadayala, S. R., Kakoti, A., & Goswami, P. (2014). Selective and sensitive detection of free bilirubin in blood serum using human serum albumin stabilized gold nanoclusters as fluorometric and colorimetric probe. *Biosensors and Bioelectronics*, *59*, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.04.003>

Santos, I. K. F. D. E. M., Costa, C. H. N., Krieger, H., Feitosa, M. F., Zurakowski, D., Fardin, B., ... Ezekowitz, R. A. B. (2001). Mannan-Binding Lectin Enhances Susceptibility to Visceral Leishmaniasis. *Infectio*, *69*(8), 5212–5215. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.5212>

Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *13*(4), 1518–1524. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00028>

Sarkari, B., Ashrafmansouri, M., Hatam, G. R., Habibi, P., & Khabisi, S. A. (2014). Performance of an ELISA and indirect immunofluorescence assay in serological diagnosis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, *2014*, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2014/505134>

Sattarahmady, N., Movahedpour, A., Heli, H., & Hatam, G. R. (2016). Gold nanoparticles-based biosensing of *Leishmania major* kDNA genome : Visual and spectrophotometric detections. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, *235*, 723–731. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.023>

Savoia, D. (2015). Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *Journal of Infection in Developing Countries*, *9*(6), 588–596. <https://doi.org/10.3855/jidc.6833>

Schmidli, C., Rima, L., Arnold, S. A., Stohler, T., Syntychaki, A., Bieri, A., ... Braun, T. (2018).

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Miniaturized sample preparation for transmission electron microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(137), 1–12. <https://doi.org/10.3791/57310>
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 581–592. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>
- Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2002). The interaction of quercetin with human serum albumin: A fluorescence spectroscopic study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(3), 400–403. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02667-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02667-0)
- Senthilkumar, R., Marimuthu, P., Paul, P., Manojkumar, Y., Arunachalam, S., Eriksson, J. E., & Johnson, M. S. (2016). Plasma Protein Binding of Anisomelic Acid: Spectroscopy and Molecular Dynamic Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(12), 2401–2412. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00445>
- Shan, J., Chen, J., Nuopponen, M., Viitala, T., Jiang, H., Peltonen, J., ... Tenhu, H. (2006). Optical Properties of Thermally Responsive Amphiphilic Gold Nanoparticles Protected with Polymers. *Langmuir*, (27), 794–801. <https://doi.org/10.1021/la052579q>
- Shi, J., Chan, C., Pang, Y., Ye, W., Tian, F., Lyu, J., ... Yang, M. (2015). A fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor based on graphene quantum dots (GQDs) and gold nanoparticles (AuNPs) for the detection of mecA gene sequence of *Staphylococcus aureus*. *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.059>
- Singh, G., Pritam, M., Banerjee, M., Singh, A. K., & Singh, S. P. (2020). Designing of precise vaccine construct against visceral leishmaniasis through predicted epitope ensemble: A contemporary approach. *Computational Biology and Chemistry*, 86(December 2019), 107259. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107259>

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Sinha-Roy, R., Garc, P., Weissker, H., Rabilloud, F., Lyon, U., Claude, U., ... Lumie, I. (2017).

Classical and ab Initio Plasmonics Meet at Sub-nanometric Noble Metal Rods. *ACS Ph*, 4, 1484–1493. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.7b00254>

Sirohi, J., & Chopra, I. (2000). Fundamental understanding of piezoelectric strain sensors. *Journal*

of Intelligent Material Systems and Structures, 11(4), 246–257. <https://doi.org/10.1106/8BFB-GC8P-XQ47-YCQ0>

Smitha, S. L., Nissamudeen, K. M., Philip, D., & Gopchandran, K. G. (2008). Studies on surface

plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(1), 186–190. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.12.002>

Soko, K., Malola, S., Lahtinen, M., Saarnio, V., Permi, P., Lehtovaara, L., ... Ha, H. (2019).

Towards Controlled Synthesis of Water-Soluble Gold Nanoclusters : Synthesis and Analysis. *The Journal of Physical Chemistry C*, 123, 2602–2612. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b11056>

Soler, M., Estevez, M. C., Moreno, M. de L., Cebolla, A., & Lechuga, L. M. (2016). Label-free

SPR detection of gluten peptides in urine for non-invasive celiac disease follow-up. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.097>

Soler, M., Huertas, C. S., & Lechuga, L. M. (2019). Label-free plasmonic biosensors for point-of-

care diagnostics: a review. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 19(1), 71–81. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1554435>

Soulat, D., & Bogdan, C. (2017). Function of macrophage and parasite phosphatases in

leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 8(DEC), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01838>

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Sparks, R. P., Jenkins, J. L., & Fratti, R. (2019). Use of surface plasmon resonance (SPR) to determine binding affinities and kinetic parameters between components important in fusion machinery. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1860, pp. 199–210). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8760-3_12
- Stamplecoskie, K. G., & Kamat, P. V. (2014). Size-dependent excited state behavior of glutathione-capped gold clusters and their light-harvesting capacity. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(31), 11093–11099. <https://doi.org/10.1021/ja505361n>
- Stephen Altschul, Thomas Madden, Alejandro Schaffer, Jinghui Zhang, Aheng Zhang, Webb Miller, D. L. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*(17), 3389–3402.
- Stojmirović, A., Andreae, P., Boland, M., Jordan, T. W., & Pestov, V. G. (2013). PFMFind: A system for discovery of peptide homology and function. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, *8199 LNCS*, 319–324. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41062-8_32
- Study, T. F., Res, C. T., Cardiol, A. C., Pathol, C., Fgf, T., Rev, N., ... Res, C. (2013). *Chapter 9 Chapter 9. 1900*(1988), 304–312. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-806-1>
- Sun, C., Wu, X., Ding, H., Zhao, L., Wang, F., Yang, J., & Liu, X. (2009). The fluorescence enhancement of the protein adsorbed on the surface of ag nanoparticle. *Journal of Fluorescence*, *19*(1), 111–117. <https://doi.org/10.1007/s10895-008-0392-4>
- Sylvestre, J. P., Poulin, S., Kabashin, A. V., Sacher, E., Meunier, M., & Luong, J. H. T. (2004). Surface chemistry of gold nanoparticles produced by laser ablation in aqueous media. *Journal of Physical Chemistry B*, *108*(43), 16864–16869. <https://doi.org/10.1021/jp047134>
- Szöör, B. (2010). Trypanosomatid protein phosphatases. *Molecular and Biochemical*

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Parasitology, 173(2), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.05.017>

Tan, D., He, Y., Xing, X., Zhao, Y., Tang, H., & Pang, D. (2013). Aptamer functionalized gold nanoparticles based fluorescent probe for the detection of mercury (II) ion in aqueous solution. *Talanta*, 113, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.055>

Tao, Y., Ju, E., Li, Z., Ren, J., & Qu, X. (2014). Engineered CpG-antigen conjugates protected gold nanoclusters as smart self-vaccines for enhanced immune response and cell imaging. *Advanced Functional Materials*, 24, 1004–1010. <https://doi.org/10.1002/adfm.201302347>

Tawil, N., Sacher, E., Boulais, E., Mandeville, R., & Meunier, M. (2013). X-ray photoelectron spectroscopic and transmission electron microscopic characterizations of bacteriophage-nanoparticle complexes for pathogen detection. *Journal of Physical Chemistry C*, 117(40), 20656–20665. <https://doi.org/10.1021/jp406148h>

Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of Parasitic Diseases*, 44(2), 253–272. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>

Tian, S., Maile, R., Collins, E. J., & Frelinger, J. A. (2007). CD8 + T Cell Activation Is Governed by TCR-Peptide/MHC Affinity, Not Dissociation Rate. *The Journal of Immunology*, 179(5), 2952–2960. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.2952>

Toubanaki, D. K., Athanasiou, E., & Karagouni, E. (2016). Gold nanoparticle-based lateral flow biosensor for rapid visual detection of Leishmania-specific DNA amplification products. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.027>

Tuckerman, M. E., & Martyna, G. J. (2000). Understanding Modern Molecular Dynamics: Techniques and Applications. *J. Phys. Chem. B*, 104, 159–178.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Vanhee, P., van der Sloot, A. M., Verschueren, E., Serrano, L., Rousseau, F., & Schymkowitz, J. (2011). Computational design of peptide ligands. *Trends in Biotechnology*, 29(5), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.01.004>
- Vo-Dinh, T., Wang, H. N., & Scaffidi, J. (2010). Plasmonic nanoprobe for SERS biosensing and bioimaging. *Journal of Biophotonics*, 3(1–2), 89–102. <https://doi.org/10.1002/jbio.200910015>
- Wang, H., Li, X., Gao, L., Zhai, J., Liu, R., Gao, X., ... Zhao, L. (2016). Atomic structure of a peptide coated gold nanocluster identified using theoretical and experimental studies. *Nanoscale*, 8(22), 11454–11460. <https://doi.org/10.1039/c5nr08727a>
- Wang, J., Ye, J., Jiang, H., Gao, S., Ge, W., Chen, Y., ... Wang, X. (2014). Simultaneous and multisite tumor rapid-target bioimaging through in vivo biosynthesis of fluorescent gold nanoclusters. *RSC Advances*, 4(71), 37790–37795. <https://doi.org/10.1039/c4ra05021e>
- Wang, X., Lu, X., & Chen, J. (2014). Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, Vol. 2, pp. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.04.001>
- Wang, Yijia, Bai, X., Wen, W., Zhang, X., & Wang, S. (2015). Ultrasensitive Electrochemical Biosensor for HIV Gene Detection Based on Graphene Stabilized Gold Nanoclusters with Exonuclease Amplification. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(33), 18872–18879. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b05857>
- Wang, Yong, Chen, J. T., & Yan, X. P. (2013). Fabrication of transferrin functionalized gold nanoclusters/graphene oxide nanocomposite for turn-on near-infrared fluorescent bioimaging of cancer cells and small animals. *Analytical Chemistry*, 85(4), 2529–2535. <https://doi.org/10.1021/ac303747t>

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Wang, Yuling, Chen, J., & Irudayaraj, J. (2011). Nuclear targeting dynamics of gold nanoclusters for enhanced therapy of HER2 + breast cancer. *ACS Nano*, 5(12), 9718–9725. <https://doi.org/10.1021/nn2032177>
- Wang, Yun, Zhang, X., Xie, Y., Wu, A., Zai, X., & Liu, X. (2019). High-affinity phage-displayed peptide as a recognition probe for the detection of Cry2Ad2-3. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 562–567. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.164>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wei, W., Lu, Y., Chen, W., & Chen, S. (2011a). One-pot synthesis, photoluminescence, and electrocatalytic properties of subnanometer-sized copper clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 133(7), 2060–2063. <https://doi.org/10.1021/ja109303z>
- Wei, W., Lu, Y., Chen, W., & Chen, S. (2011b). One-Pot Synthesis and Dual Photoluminescence of Subnanometer-Sized Copper Clusters - Supporting Info. *Journal of the American Chemical Society*, 133(7), 1–9. <https://doi.org/10.1021/ja109303z>
- Wen, F., Dong, Y., Feng, L., Wang, S., Zhang, S., & Zhang, X. (2011). Horseradish peroxidase functionalized fluorescent gold nanoclusters for hydrogen peroxide sensing. *Analytical Chemistry*, 83(4), 1193–1196. <https://doi.org/10.1021/ac1031447>
- Wen, X., Yu, P., Toh, Y., & Tang, J. (2012). Structure-Correlated Dual Fluorescent Bands in BSA-Protected Au 25 Nanoclusters. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116, 11830–11836. <https://doi.org/10.1021/jp303530h>
- West, A. L., Griep, M. H., Cole, D. P., & Karna, S. P. (2014). DNase 1 retains endodeoxyribonuclease activity following gold nanocluster synthesis. *Analytical Chemistry*,

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

86(15), 7377–7382. <https://doi.org/10.1021/ac5005794>

WHO. (2015). Kala-azar elimination programme. In *World Health Organization*.

Wu, Z., MacDonald, M. A., Chen, J., Zhang, P., & Jin, R. (2011). Kinetic control and thermodynamic selection in the synthesis of atomically precise gold nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*, 133(25), 9670–9673. <https://doi.org/10.1021/ja2028102>

Xia, X., Long, Y., & Wang, J. (2013). Glucose oxidase-functionalized fluorescent gold nanoclusters as probes for glucose. *Analytica Chimica Acta*, 772, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.025>

Xie, J., Zheng, Y., & Ying, J. Y. (2009). Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*, 131(3), 888–889. <https://doi.org/10.1021/ja806804u>

Xu, M., Wang, R., & Li, Y. (2016). Rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation. *Talanta*, 148, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.082>

Xu, S., Feng, X., Gao, T., Wang, R., Mao, Y., Lin, J., ... Luo, X. (2017). A novel dual-functional biosensor for fluorometric detection of inorganic pyrophosphate and pyrophosphatase activity based on globulin stabilized gold nanoclusters. *Analytica Chimica Acta*, 958, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.026>

Yahia-ammam, A., Sierra, D., & Me, F. (2016). Self-Assembled Gold Nanoclusters for Bright Fluorescence Imaging and Enhanced Drug Delivery. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07596>

Yang, G., Nanda, J., Wang, B., Chen, G., & Hallinan, D. T. (2017). Self-Assembly of Large Gold

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(15), 13457–13470. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01121>
- Yang, J., Palla, M., Bosco, F. G., Rindzevicius, T., Alstrøm, T. S., Schmidt, M. S., ... Lin, Q. (2013). Surface-enhanced Raman spectroscopy based quantitative bioassay on aptamer-functionalized nanopillars using large-area Raman mapping. *ACS Nano*, 7(6), 5350–5359. <https://doi.org/10.1021/nn401199k>
- Yao, H. (2010). Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II. *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II*, 9(2010), 285–304. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-04701-5>
- Yau, S. H., Varnavski, O., & Goodson, T. (2013). An ultrafast look at Au nanoclusters. *Accounts of Chemical Research*, 46(7), 1506–1516. <https://doi.org/10.1021/ar300280w>
- You, J. G., & Tseng, W. L. (2019). Peptide-induced aggregation of glutathione-capped gold nanoclusters: A new strategy for designing aggregation-induced enhanced emission probes. *Analytica Chimica Acta*, 1078, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.069>
- Yu, Y., Chen, X., Yao, Q., Yu, Y., Yan, N., & Xie, J. (2013). Scalable and precise synthesis of thiolated Au₁₀₋₁₂, Au₁₅, Au₁₈, and Au₂₅ nanoclusters via pH controlled CO reduction. *Chemistry of Materials*, 25(6), 946–952. <https://doi.org/10.1021/cm304098x>
- Yuan, X., Luo, Z., Zhang, Q., Zhang, X., Zheng, Y., Lee, J. Y., & Xie, J. (2011). Synthesis of highly fluorescent metal (Ag, Au, Pt, and Cu) nanoclusters by electrostatically induced reversible phase transfer. *ACS Nano*, 5(11), 8800–8808. <https://doi.org/10.1021/nn202860s>
- Yue, Y., Liu, T.-Y., Li, H.-W., Liu, Z., & Wu, Y. (2012). Microwave-assisted synthesis of BSA-protected small gold nanoclusters and their fluorescence-enhanced sensing of silver(i) ions. *Nanoscale*, 4(7), 2251. <https://doi.org/10.1039/c2nr12056a>

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

- Zambrano-Hernandez, P., Ayala-Sotelo, M. S., Fuya-Oviedo, P., Montenegro-Puentes, C. A., Aya-Vanegas, N. M., Aguilera-Jaramillo, G., ... Rodríguez-Toro, G. (2015). Brote urbano de leishmaniasis visceral en Neiva, Colombia. *Revista de Salud Publica*, 17(4), 514–527. <https://doi.org/10.15446/rsap.v17n4.44663>
- Zang, J., Li, C., Zhou, K., Dong, H., Chen, B., Wang, F., & Zhao, G. (2016). Nanomolar Hg²⁺ Detection Using β -Lactoglobulin-Stabilized Fluorescent Gold Nanoclusters in Beverage and Biological Media. *Analytical Chemistry*, 88(20), 10275–10283. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03011>
- Zhang, F., Lee, K. B., & Linhardt, R. J. (2015). SPR biosensor probing the interactions between TIMP-3 and heparin/GAGs. *Biosensors*, 5(3), 500–512. <https://doi.org/10.3390/bios5030500>
- Zhang, Lei, Xu, J., Mi, L., Gong, H., Jiang, S., & Yu, Q. (2012). Multifunctional magnetic-plasmonic nanoparticles for fast concentration and sensitive detection of bacteria using SERS. *Biosensors and Bioelectronics*, 31(1), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.10.006>
- Zhang, Libing, & Wang, E. (2014). Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*, 9(1), 132–157. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.010>
- Zhang, X., Wu, F. G., Liu, P., Gu, N., & Chen, Z. (2014). Enhanced fluorescence of gold nanoclusters composed of HAuCl₄ and histidine by glutathione: Glutathione detection and selective cancer cell imaging. *Small*, 10(24), 5170–5177. <https://doi.org/10.1002/sml.201401658>
- Zhang, Y., Jiang, H., & Wang, X. (2015). Cytidine-stabilized gold nanocluster as a fluorescence turn-on and turn-off probe for dual functional detection of Ag⁺ and Hg²⁺. *Analytica Chimica Acta*, 870(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.016>
- Zheng, J. (2007). Highly Fluorescent Noble Metal Quantum Dots. *Annu Rev Phys Chem*, 58(1),

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

409–431. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2006.05.022>

Zheng, J., Zhang, C., & Dickson, R. M. (2004). Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots. *Physical Review Letters*, *93*(7), 5–8. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.077402>

Zheng, J., Zhou, C., Yu, M., & Liu, J. (2012). Different sized luminescent gold nanoparticles. *Nanoscale*, *4*(14), 4073–4083. <https://doi.org/10.1039/c2nr31192e>

Zhentaio Luo, Xun Yuan, Yue Yu, Qingbo Zhang, David Tai Leong, Jim Yang Lee, and J. X. (2012). From Aggregation-Induced Emission of Au(I)–Thiolate Complexes to Ultrabright Au(0)@Au(I)–Thiolate Core–Shell Nanoclusters. *J Am Chem Soc*, *134*(I), 16662–16670.

Zhou, H. (2014). *Label-Free Applications of SERS for Bacteria Analysis*.

Zhou, J., Liu, Q., Feng, W., Sun, Y., & Li, F. (2015). Upconversion luminescent materials: Advances and applications. *Chemical Reviews*, *115*(1), 395–465. <https://doi.org/10.1021/cr400478f>

Zhu, M., Aikens, C. M., Hollander, F. J., & Schatz, G. C. (2008). Correlating the Crystal Structure of A Thiol-Protected Au 25 Cluster and Optical Properties. *J. Am. Chem. Soc.*, *130*, 5883–5885. <https://doi.org/10.1021/ja801173r>

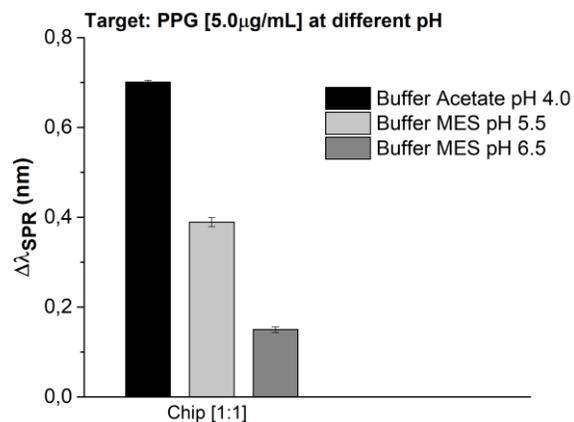
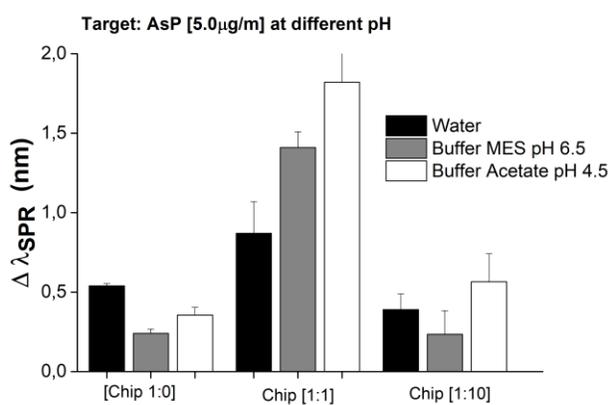
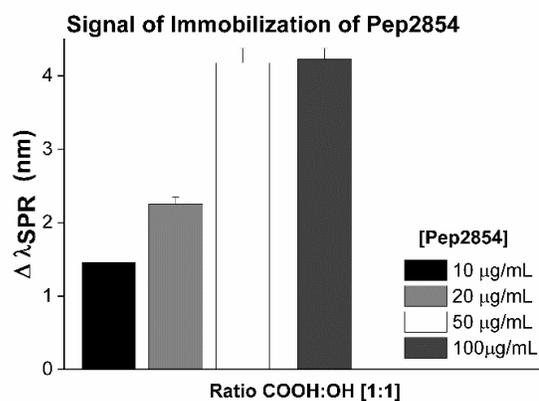
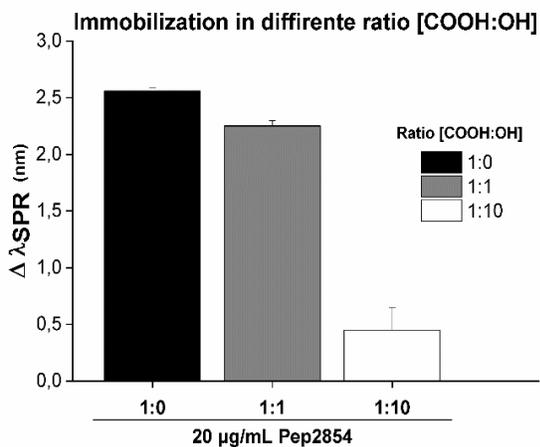
Zong, C., Huang, R., Condac, E., Chiu, Y., Xiao, W., Li, X., ... Boons, G. J. (2016). Integrated Approach to Identify Heparan Sulfate Ligand Requirements of Robo1. *Journal of the American Chemical Society*, *138*(39), 13059–13067. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b08161>

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Apéndices.

Apéndice A.

Condiciones óptimas para la inmovilización de los PepHLec en un chip de Au para el análisis por SPR.



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Apéndice B.

Análisis con CDPro usando dos algoritmos matemáticos para determinar la tendencia en la conformación estructural de los PpepHLec.

	2854TFE30%	2855 TFE30%	2856 TFE30%	2854 Agua	2855 agua	2856 agua
Alfa	0,000	0,862	0,000	0,004	0,647	0,182
beta	0,926	0,000	0,920	0,000	0,000	0,000
Turn	0,074	0,139	0,000	0,044	0,252	0,141
PP2	0,000	0,000	0,000	0,255	0,039	0,137
Unrd	0,000	0,000	0,080	0,698	0,062	0,541

RMSD	0,472	0,852	0,360	0,459	1,623	1,178
NRMSD	0,031	0,053	0,010	0,041	0,041	0,036

Algoritmo	Contin
Base de datos	SP37A

	2854TFE30%	2855 TFE30%	2856 TFE30%	2854 Agua	2855 agua	2856 agua
Alfa	0,396	0,436	0,397	ND	ND	ND
beta	0,074	0,067	0,073	ND	ND	ND
Turn	0,149	0,161	0,167	ND	ND	ND
PP2	0,190	0,168	0,148	ND	ND	ND
Unrd	0,194	0,178	0,215	ND	ND	ND

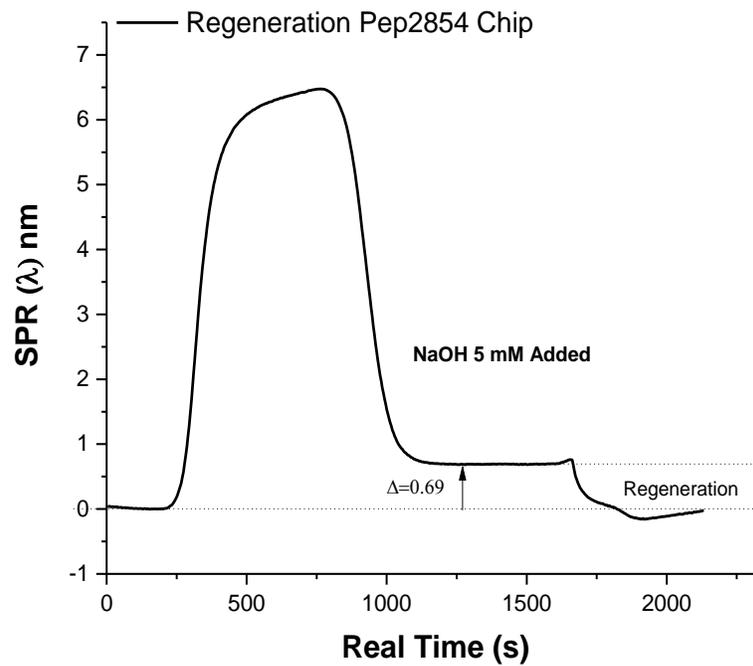
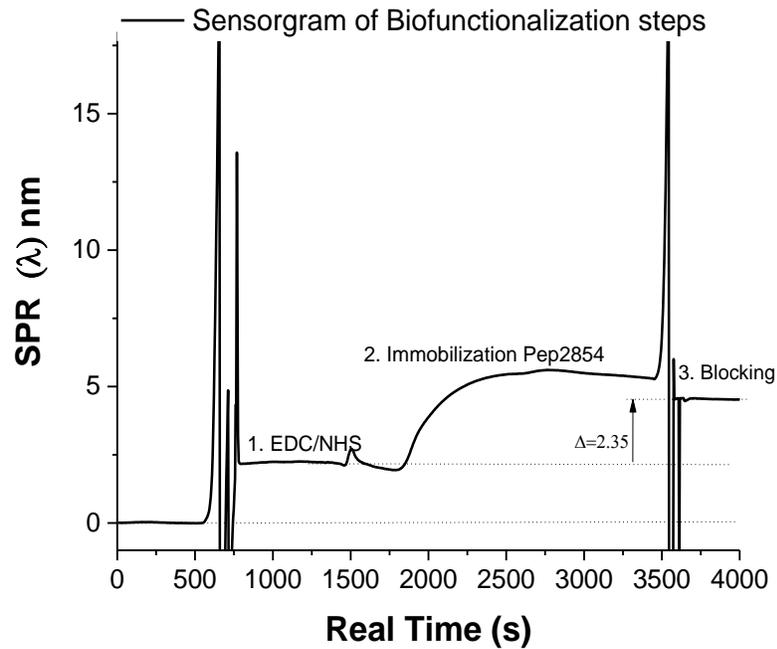
RMSD	0,947	1,759	5,146	ND	ND	ND
NRMSD	0,063	0,109	0,149	ND	ND	ND

Algoritmo	CDSSTR
Base de datos	SP37A

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Apéndice C.

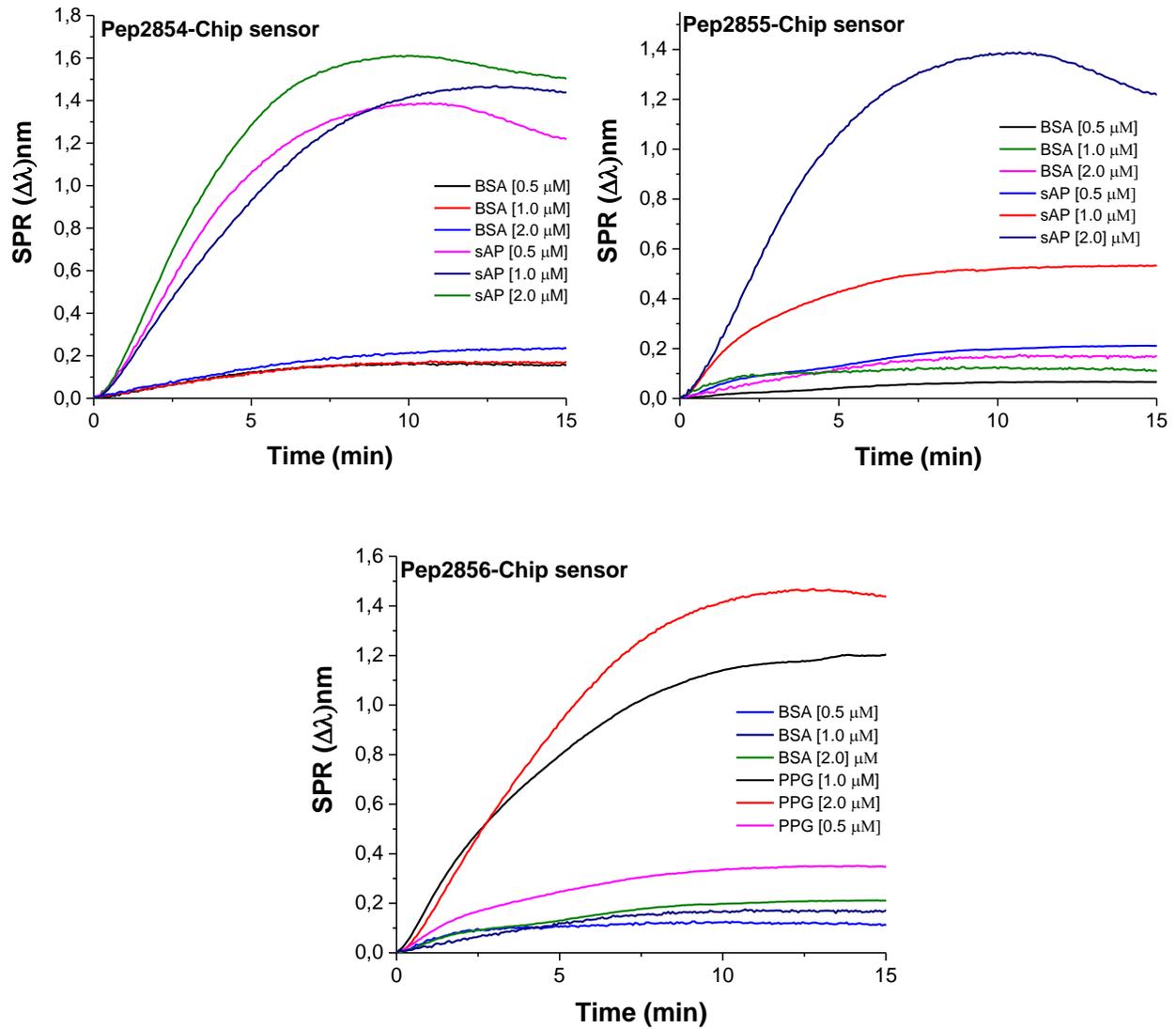
Sensogramas correspondientes a cada una de las etapas de inmovilización de los PepHLec sobre la superficie sensora de un chip de Au obtenidos por la técnica SPR.



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Apéndice D.

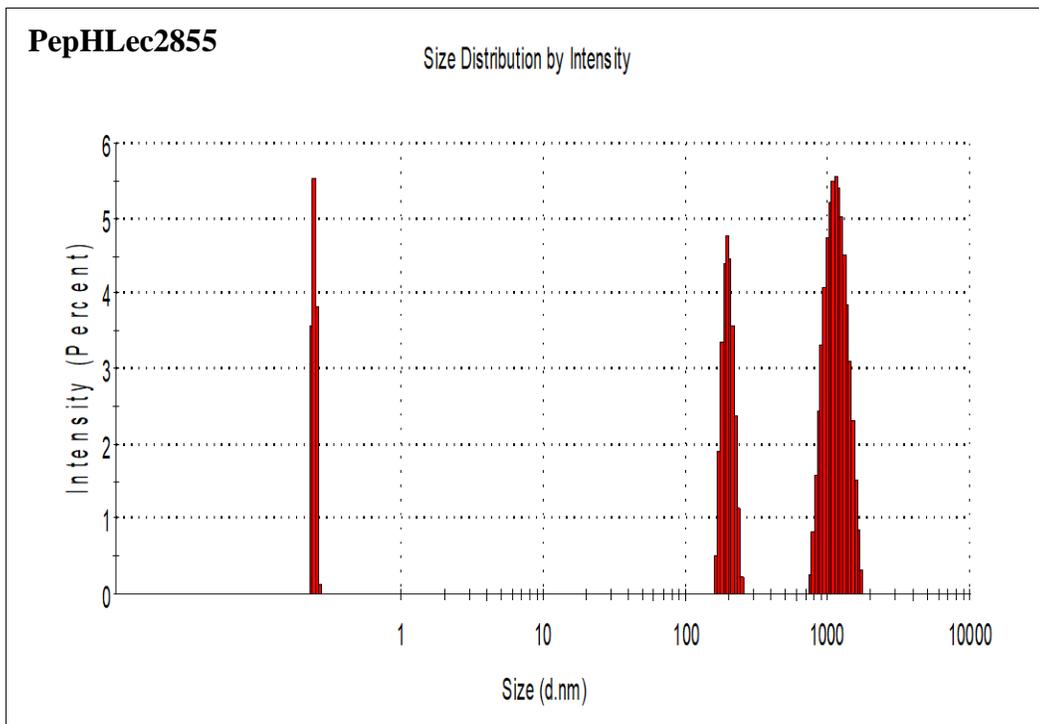
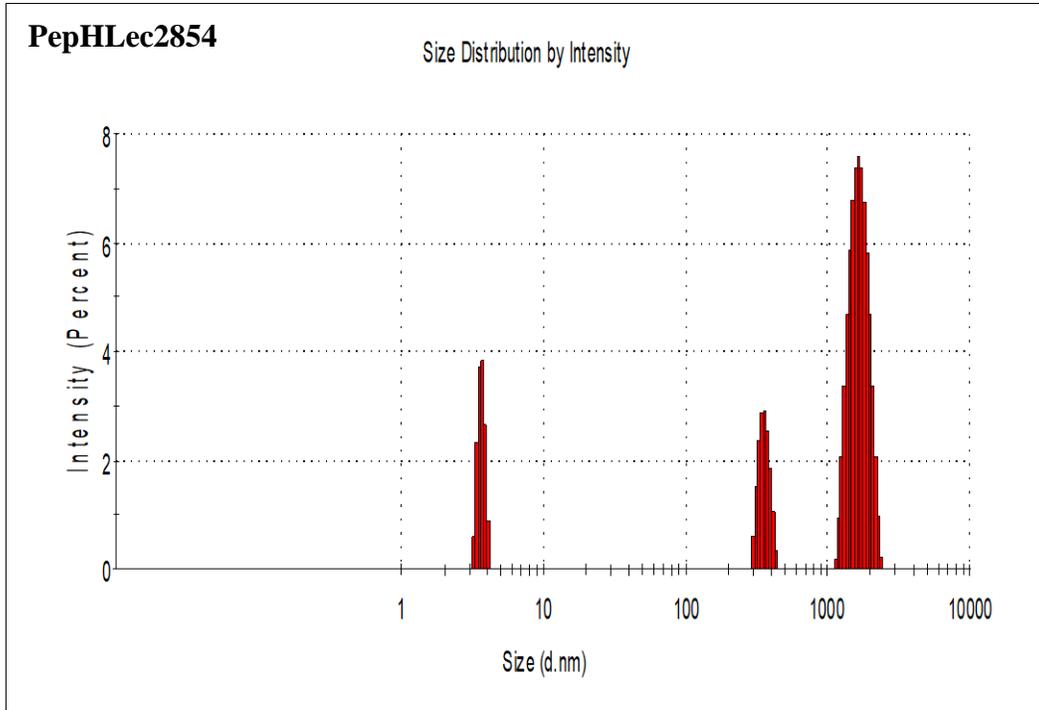
Ensayo de especificidad de los PepHLec empleando BSA en el análisis por SPR sobre un chip de Au funcionalizados con cada uno de los péptidos en ensayos independientes.



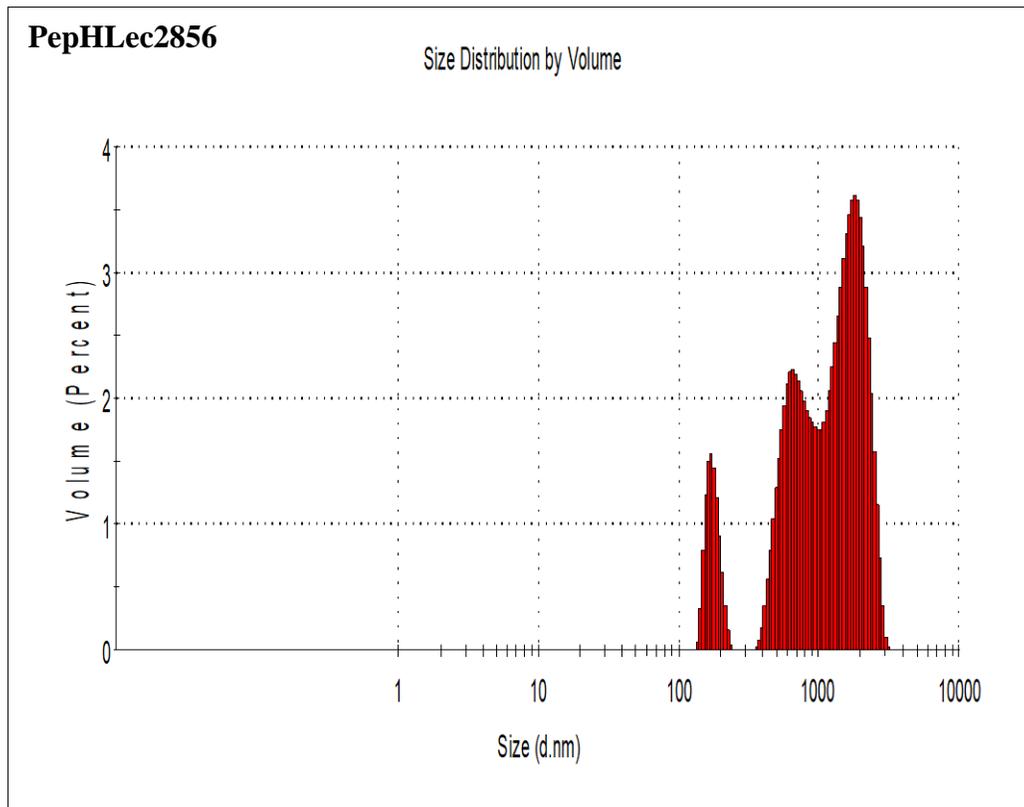
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Apéndice E.

Tamaño de partícula de los PepHLec determinado por la técnica de DLS.



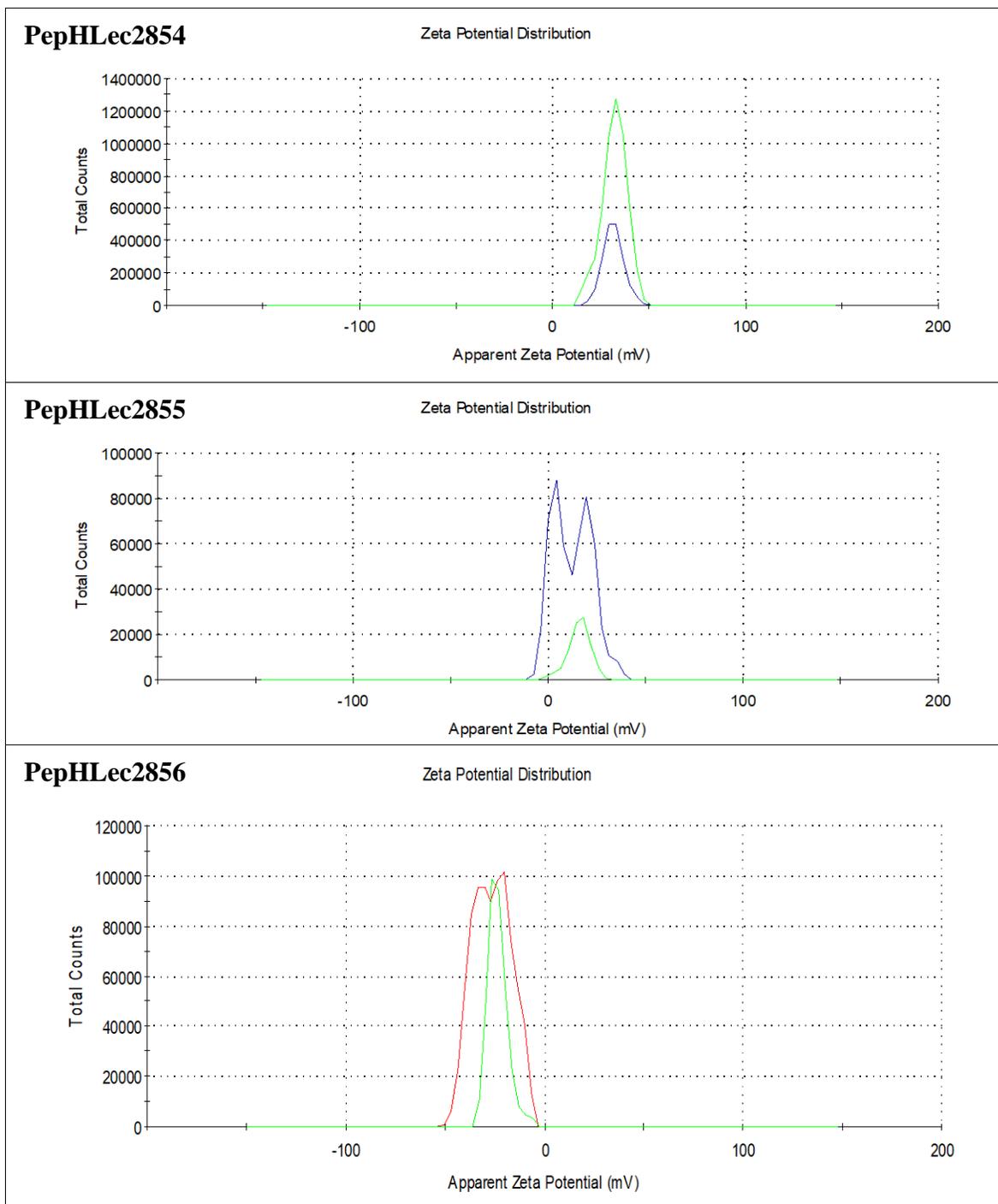
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Apéndice F.

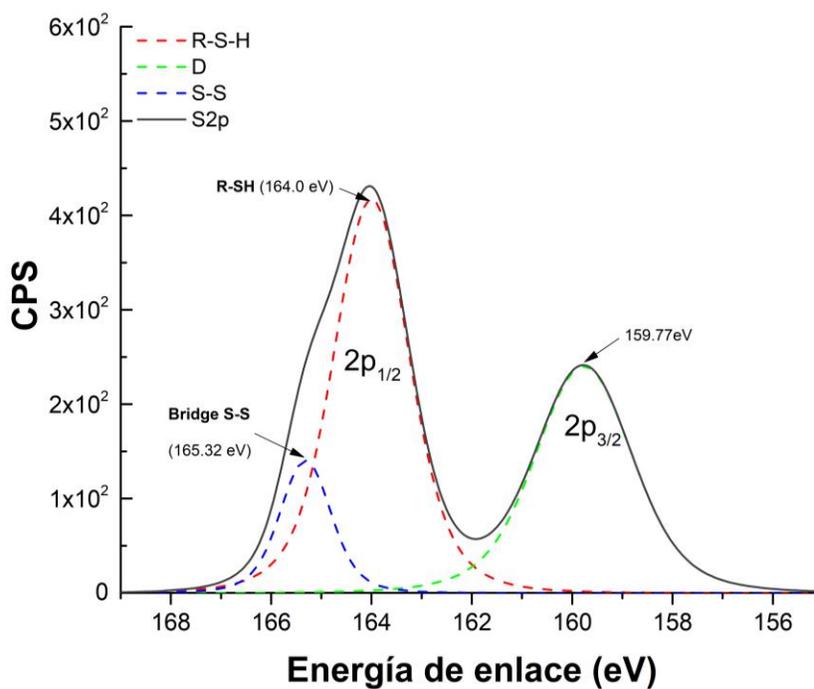
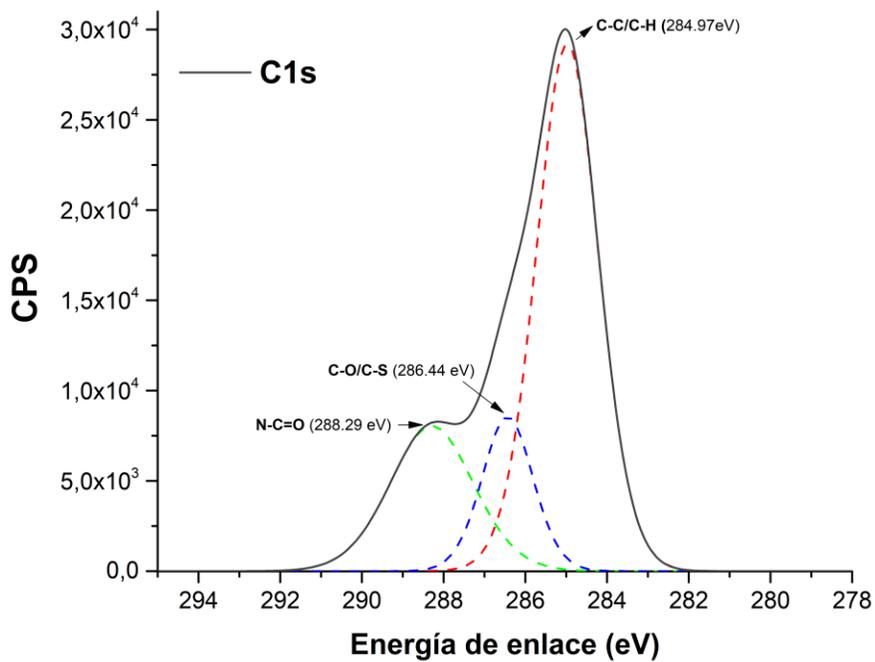
Determinación del potencial Zeta de los AuNC@PepHLec



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Apéndice G.

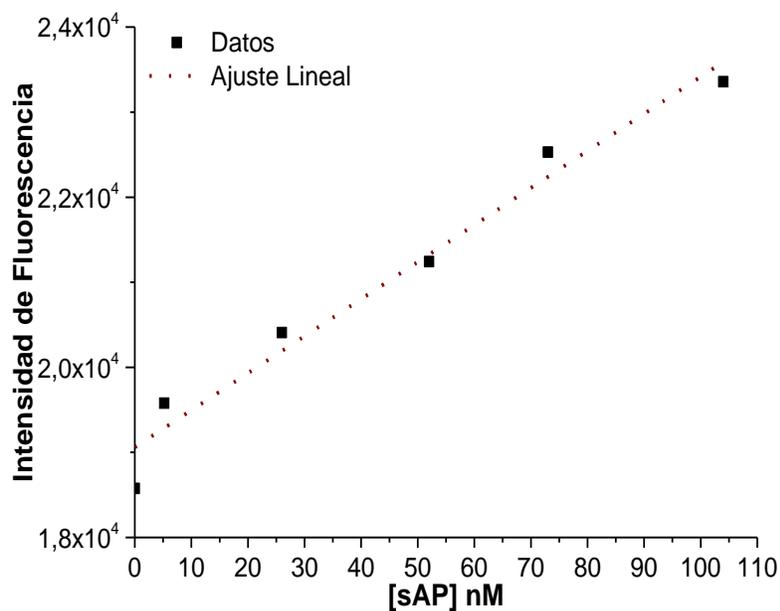
Espectros XPS de las componentes: C1s, S2p+Si y S2p, de los AuNC@PepHLec2854.



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LEISHMANIASIS

Apéndice H.

Regresión lineal de la respuesta como emisión de fluorescencia de los AuNC@PepHLec2854 respecto a la concentración de sAP en un rango de concentraciones de 5,2-104 nm empleada en la determinación del límite mínimo de detección.



$IP = 43.55[sAP] + 19060$; donde IP es la Intensidad de la fluorescencia.

$R^2 = 0.9685$

$LOD = 3SD/Y_{AuNC}$, donde Y_{AuNC} representa la señal del blanco (AuNC)

$LOD = 1,76 \pm 0,15 \text{ nM}$