



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.  
FACULTAD DE CIENCIAS.  
ESCUELA DE BIOLOGÍA.

**DESARROLLO DE UN BIOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE  
ENFERMEDADES PARASITARIAS TROPICALES**

Trabajo especial de grado presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de Venezuela por el Bachiller  
Yosué Manuel Francisco Sosa como requisito para optar  
al título de Licenciado en Biología.  
Tutor: Dr. Pedro J. Rodríguez G.

Caracas, Venezuela

Noviembre 2010

## INDICE

Introducción	3
Antecedentes	4
Objetivo General	26
Objetivos Específicos	26
Materiales y Métodos	27
1. Obtención de nanopartículas de oro por ablación por láser	27
2. Caracterización de nanopartículas de oro.	29
3. Unión del complejo nanopartícula-anticuerpo	30
4. Ensayo de unión del complejo anti-gp63-AuNP a parásitos de <i>L. major</i> .	33
5. Ensayo de unión del complejo anti-gp63-AuNP a parásitos de <i>L. major</i> en suspensión.	34
6. Ensayo de unión del complejo anti-gp63-AuNP con la proteína de gp63 aislada de la membrana plasmática de <i>Leishmania major</i> .	34
RESULTADOS	36
1. Caracterización de las nanopartículas oro	36
2. Unión del complejo nanopartícula-anticuerpo	53
3. Unión del complejo anti-gp63-AuNP a parásitos de <i>Leishmania major</i> en suspensión	54
4. Unión del complejo a parásitos <i>Leishmania mexicana</i>	56
5. Unión del complejo AuNP-PEG-anti-gp63 a un extracto de proteína gp63 extraída y purificada de la superficie de <i>Leishmania major</i>	57
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	74

## INTRODUCCIÓN

Uno de los campos de mayor actividad en medicina ha sido el desarrollo de métodos de diagnóstico efectivos para la detección de procesos infecciosos. Mundialmente se invierten grandes cantidades de dinero en investigaciones para la detección y el tratamiento de enfermedades como cáncer y SIDA. No obstante, existen pocos métodos de diagnóstico para otros padecimientos de gran importancia epidemiológica, especialmente en enfermedades tropicales. Estas enfermedades afectan a un importante sector de la población mundial, siendo las poblaciones pobres de las regiones tropicales, tradicionalmente excluidos de los sistemas de salud públicos, el grupo más vulnerable. Dentro de estas enfermedades se encuentran aquellas de origen parasitario, tales como leishmaniasis, malaria y la enfermedad de Chagas, las cuales son causantes de altas tasas de mortalidad en países tropicales y sub-tropicales. El presente trabajo pretende el desarrollo de un mecanismo de detección de agentes infecciosos en enfermedades parasitarias tropicales.

Existen ejemplos de mecanismos de detección de biomoléculas que son de uso común en diagnóstico clínico, algunos de estos métodos se basan en la utilización de anticuerpos como criterio de identificación. Tal es el caso de la prueba de *ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas*, ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), la cual es usada para la detección de infecciones virales, selección de anticuerpos monoclonales, etc. Se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa

o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Del mismo modo, han sido desarrollados métodos de transporte de fármacos y drogas que buscan aumentar la calidad de vida de los pacientes que reciben los tratamientos. Estos métodos buscan, en el caso de los agentes comúnmente utilizados en quimioterapias anticáncer, aumentar el espaciamiento entre las dosis al aumentar el tiempo de residencia en circulación y disminuir los efectos secundarios al conferir especificidad al agente terapéutico. Para esto han sido exploradas varias vías, entre las más estudiadas se encuentran las nanopartículas (poliméricas o metálicas) utilizadas como vehículo de transporte y entrega de drogas (*drug delivery*) a células blanco específicas.

## **ANTECEDENTES**

Se ha reportado el uso de nanopartículas poliméricas como vehículo para lograr el transporte efectivo de drogas a células blanco específicas (ver revisión en Hans y Lowman, 2006). De esta manera han sido desarrolladas nanopartículas y estructuras micelares sintetizadas a partir de polímeros, de los cuales los más ampliamente usados han sido el poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), el poli-ácido láctico (PLA), poli-ácido glicólico (PGA) y sus copolímeros, poli-láctico-co-glicólico o PLGA. Estos sistemas de entrega de drogas (*drug delivery*) han sido desarrollados de manera de aumentar la eficiencia de la acción de la droga y de minimizar los efectos colaterales. Sin embargo, su eficacia ha sido puesta en duda debido a su pronta eliminación del sistema circulatorio por fagocitosis

luego de la administración intravenosa. Esto último ha sido resuelto, en parte, al aumentar la hidrofiliidad de la capa externa de la partícula. En su trabajo, los autores mencionados anteriormente reportan numerosos métodos para incorporar drogas a las partículas; así, las drogas pueden estar atrapadas en la matriz polimérica, pueden estar encapsuladas en el cuerpo de la nanopartícula o estar químicamente conjugadas con la nanopartícula o adsorbidas a su superficie. Finalmente, los autores reportan aplicaciones del sistema de nanopartículas poliméricas en terapia antitumoral, en dosificación de vacunas, en el sistema linfático y en tejido pulmonar.

Del mismo modo, Kim y cols. (2008) reportan el uso de nanopartículas poliméricas de un tamaño entre 300-500 nm obtenidas a partir de glicolquitosano (peso molecular 250 kDa) modificado con ácido colánico hidrofóbico a fin de encapsular cisplatino (*cis*-diaminedicloroplatino(II), CDDP), el cual fue liberado en un tiempo más prolongado respecto a la inyección intravenosa de CDDP y generando menos efectos citotóxicos. La visualización del tumor alcanzado *in vivo* por las nanopartículas se logró mediante el marcaje de la nanopartícula con un fluoróforo (Cy5.5) y la observación de la fluorescencia acumulada en el tumor. Las nanopartículas preparadas mostraron mayor eficacia antitumoral y menor toxicidad comparada con la inyección intravenosa de CDDP tal y como lo muestran los cambios del volumen tumoral, el aumento del peso corporal y de la tasa de sobrevivencia. Igualmente, Sou y cols. (2008) reportan la exitosa entrega de curcumina (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadieno-3,5-diona, Cm) encapsulada en vesículas o nanoesferas de fosfolípidos hacia el interior de

macrófagos. La curcumina es un producto natural que exhibe propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales. Los autores reportan la presencia masiva de curcumina en macrófagos de la médula ósea y el bazo luego de 6 horas de inyección intravenosa.

De igual manera, se han desarrollado liposomas multivesiculares (*MVL's*) los cuales permiten una liberación sostenida del agente terapéutico prolongando la duración de la droga en la circulación y aumentando el espaciamiento entre las dosis, todo lo cual incrementa la calidad de vida de los pacientes sometidos a terapia. Destacan los trabajos de Katre y cols. (1998) quienes reportan el encapsulamiento de la proteína IGF-I (Insuline-like Growth Factor I) la cual posee variadas funciones metabólicas, entre las cuales se encuentra el desarrollo del sistema nervioso, el incremento de la entrada de glucosa a la célula y el estímulo de la función renal. Estos autores reportan el aumento del tiempo de permanencia de la IGF-I en sangre desde 2 días (luego de inyección subcutánea) a 7 días (para la proteína encapsulada en el *MVL*) a una misma concentración en el suero (100ng IGF-I/ml de suero). Igualmente, Zhong y cols. (2005) encapsularon breviscapina para el tratamiento de isquemias cerebrovasculares y cardiovasculares. Los autores citados reportan un aumento de 16.5 veces y 5.04 veces en el tiempo medio de residencia (*MRT*) con respecto al mismo compuesto encerrado en liposomas tradicionales (liposomas no multivesiculares) y a la inyección intravenosa respectivamente. Finalmente, Tayebbeh y cols. (2003) reportan la liberación lenta y sostenida de desferrioxamina, agente quelante de hierro, alcanzando el 57% de liberación a

los 9 días luego de la administración subcutánea de la droga encapsulada en liposomas multivesiculares.

Del mismo modo se ha reportado la utilización de inmunoliposomas como agentes de transporte de drogas a células blanco particulares (*drug delivery*), con el fin de aumentar la especificidad de la acción terapéutica minimizando la acción de las drogas sobre las células normales. En este sentido, Park y cols. (1995) reportan el uso de inmunoliposomas para lograr la inactivación de la proteína p185<sup>HER2</sup>, la cual actúa como factor de desarrollo del receptor de tirosinquinasa codificada en el protooncogen *HER2* (*c-erbB2*, *neu*). Ambos factores, oncogen y su producto proteico, juegan un papel importante en la patogénesis de varios tipos de cáncer en humanos. Esta proteína es sobreexpresada con un fenotipo muy estable en el 30% de los casos de cáncer de mama, lo cual la convierte en un blanco interesante para tratamientos de inmunoterapia anticáncer. Los autores nombrados describen el uso de liposomas acoplados al anticuerpo monoclonal rhuMAbHER2-Fab' para formar el complejo anti-p185<sup>HER2</sup>-liposoma como vehículo para alcanzar directamente a la célula tumoral *in vitro*, utilizando dos líneas celulares de cáncer de mama, SK-BR-3 y BT-474, las cuales sobreexpresan, ambas, a la proteína p185<sup>HER2</sup>. Encuentran que los inmunoliposomas vacíos –sin agente terapéutico cargado en su interior- exhiben un efecto antiproliferativo de la célula cancerosa superior al mostrado por el rhuMAbHER2-Fab' libre o por el anticuerpo intacto, lo cual indicaría que el anclaje del liposoma al anticuerpo potenciaría la actividad biológica de este último. Finalmente, reportan que inmunoliposomas cargados

con doxorubicina son marcadamente y específicamente citotóxicos contra las células que sobreexpresan a la proteína p185<sup>HER2</sup> *in vitro*. Por otro lado, Maruyama y cols. (1997) reportan la exitosa incorporación de inmunoliposomas acoplados a polietilenglicol (Fab'-PEG-inmunoliposomas) en tumores sólidos *in vivo*. Reportan que la incorporación al liposoma del fragmento que enlaza al antígeno (Fab'), en lugar del anticuerpo intacto, permite al liposoma evadir al sistema retículoendotelial (RES) aumentando la eficacia de la acción terapéutica al aumentar el tiempo de permanencia en circulación y acumulando liposomas en el tumor sólido. Los autores utilizan el anticuerpo monoclonal 21B2 (IgG1), el cual es específico para el antígeno carcinoembrionario humano (CEA) y la línea celular epitelial MKN-45, la cual es CEA positiva para cáncer gástrico humano, inoculada en ratones BALB/c *nu/nu*. De igual manera, Pagnan y cols. (1999) reportan el uso de drogas encapsuladas en inmunoliposomas a fin de lograr la localización selectiva de tumores sólidos. Los autores reportan el uso de fenretinida, droga que ha sido previamente reportada como un inductor de apoptosis en neuroblastoma (Ponzoni y cols., 1995), encapsulada en liposomas cubiertos con el anticuerpo 14.G2a (específicamente con la variante quimérica de humano y ratón ch14.18) el cual está dirigido contra GD2. En este caso, GD2, se trata de un disialogangliósido extensivamente expresado en tumores de origen neuroectodérmico, tales como el neuroblastoma y el melanoma, la cual se expresa de forma muy restringida en tejidos normales humanos, principalmente en cerebelo y nervios periféricos. Los liposomas fueron previamente estabilizados con PEG, el cual se une -en segundo término- de manera

covalente al anticuerpo señalado. Los autores reportan que los inmunoliposomas preparados de la manera descrita mostraron alta especificidad y competitividad en diez líneas celulares de melanoma (RPMI 7932; COLO 853; M 14; JR 8; PLF 2; MZ2-MEL; L.M.; L.P.; S.A. y SbCl 2), dos líneas celulares de neuroblastoma GD2-positivas (GI-LI-N y ACN) y varias líneas celulares GD2-negativas de origen no neuroectodérmico (A431; HeLa; y una suspensión de células Jurkat, K562 y HL-60 las cuales fueron usadas para verificar la selectividad del anticuerpo), al ser comparados con inmunoliposomas recubiertos con isotipos no específicos del anticuerpo y con liposomas no cubiertos con el anticuerpo, logrando, en todos los casos, una reducción significativa del desarrollo celular. El mismo equipo de trabajo (Pastorino y cols., 2003) reporta la inhibición total del desarrollo celular de neuroblastoma humano implantado en ratones desnudos (*nude mice*) al usar inmunoliposomas cargados con doxorubicina (DXR) y covalentemente acoplados al anticuerpo anti-GD2 completo (aGD<sub>2</sub>-SIL) o sólo al fragmento que enlaza el antígeno (Fab'-SIL). Los inmunoliposomas aGD<sub>2</sub>-SIL(DXR) y Fab'-SIL(DXR) mostraron mayores efectos citotóxicos que liposomas no acoplados a anticuerpos SL(DXR). Por otra parte, Xu y cols. (2002) desarrollaron un inmunoliposoma catiónico el cual presenta el fragmento de cadena sencilla de la región variable -marcada con lípidos- del anticuerpo (*lipid-tagged anti-TfR scFv*) contra el receptor humano de la transferrina (TfR). Los inmunoliposomas desarrollados demostraron ser vehículos eficaces en la transfección de genes en dos líneas celulares de cáncer humanas, la línea de cáncer de mama, MDA-MB-435 y la línea de cáncer de próstata, DU 145.

Por otro lado, se ha establecido la estrategia alternativa de utilizar proteínas y péptidos capaces de penetrar células (*cell-penetrating proteins and peptides, CPPs*) para la entrega intracelular de grandes moléculas y pequeñas partículas (ver revisión en Gupta y cols., 2005). Se trata de secuencias de 10-16 aminoácidos básicos anfipáticos (Arg y Lys, las cuales presentan carga catiónica) y en conformación  $\alpha$ -hélice, también llamados dominios de transducción de proteínas o *PTDs (Protein Transduction Domains)*. Los factores activadores de la transcripción que funcionan como PTD's más frecuentes son TAT (*Trans-activating transcriptional activator* proveniente de HIV-1), Penetratina (proveniente de *Drosophila*), VP22 (proveniente de herpes simplex tipo 1), pVEC (proveniente de cadherina vascular endotelial de murino), MAP, (Arg)<sub>7</sub>, MPG y Transportano (Zorko y Langel, 2005), los cuales han sido utilizados para llevar proteínas ( $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa, RNAasa A y el dominio III de la exotoxina A de *Pseudomonas*, entre otras), drogas (Bcl-xL, un activo neuroprotector utilizado en el tratamiento de la isquemia cerebral; FNK, fue efectivo en proteger células neuronales en cultivo contra neuroexcitotoxicidad y apoptosis), DNA y oligonucleótidos (en cuyo caso la unión al PTD lo estabiliza impidiendo su degradación por nucleasas) y otras macromoléculas a una amplia variedad de células *in vitro* e *in vivo*.

Las nanopartículas metálicas también han sido utilizadas en los sistemas de entrega de drogas (*drug delivery*). Así, Montet y cols. (2006a) emplean nanopartículas de hierro a modo de vehículo para acceder a células específicas. Los autores reportan dos ventajas principales al usar nanopartículas metálicas

con respecto a otro tipo de nanopartículas; por un lado un efecto de amplificación de la acción farmacológica, referida a la geometría de la nanopartícula la cual consiste en un núcleo compuesto por miles de moléculas de droga o átomos detectables (oro o hierro) cubiertos de un número mucho menor (de 1 a 50) de péptidos o anticuerpos dirigidos contra un blanco específico y por otro lado el aumento de la afinidad superficial multivalente; esto se refiere a interacciones múltiples y simultáneas que ocurren entre la superficie de la nanopartícula y la superficie de la célula objetivo. Los autores reportan el uso de un péptido cíclico llamado cRGD (arginina-glicina-ácido aspártico) acoplado a nanopartículas de hierro, el cual reconoce específicamente integrinas  $\alpha v \beta 3$  sobre-expresadas en células tumorales (línea celular BT-20, cáncer de mama humano, y 9L, gliosarcoma de rata) con el fin de obtener imágenes de los tumores implantados en ratones desnudos (*nude mice*). La nanopartícula de hierro utilizada está acoplada a dextrano (a fin de aumentar su tiempo de vida media en circulación), a Cy.5.5 (fluorocromo) y a cRGD el cual confiere especificidad de acción. El arreglo de nanopartícula y sus componentes asociados (*integrin-targeted nanoparticle cRGD-CLIO Cy5.5*) fue detectado por técnicas de FRI (imagen por fluorescencia reflejada), FMT (tomografía por fluorescencia molecular) y MRI (imagen de resonancia magnética) y con las mismas fue posible observar la ubicación y extensión de tumores en los animales de experimentación. Los autores reportan la acumulación de nanopartículas en los tumores, no así en los otros tejidos y órganos estudiados (páncreas, hígado, músculo, cerebro, piel y corazón, entre otros), luego de 21

horas de la inyección de las nanopartículas. Las nanopartículas no unidas a cRGD se acumularon en todos los órganos mencionados. Los mismos autores (Montet y cols., 2006b) reportan que la unión del péptido cRGD a la nanopartícula aumenta el tiempo de permanencia medio en sangre de 13 minutos a 108 minutos, del mismo modo disminuye de manera significativa el valor de  $EC_{50}$  (concentración efectiva 50, el cual se refiere a la concentración de droga a la cual se induce la mitad de la respuesta máxima) para cRGD-CLIO en el tumor implantado con respecto a la célula endotelial *in vivo*, lo que indicaría un aumento de la efectividad del tratamiento. Este hecho lo explican, como se mencionó anteriormente, al aumento de la afinidad superficial multivalente; es decir a las interacciones múltiples y simultáneas establecidas entre la superficie de la nanopartícula y la superficie de la célula tumoral.

Otra aplicación de las nanopartículas se refiere a la respuesta óptica que muestran al interactuar con luz visible. Un fenómeno físico conocido como Resonancia Plasmónica de Superficie o RPS (*surface plasmon resonance*, en inglés). Los plasmones superficiales son oscilaciones colectivas que sufren los electrones de la banda de conducción de los metales cuando sobre estos incide un haz de luz polarizada; esta por lo general incide con un determinado ángulo de resonancia para realizar la excitación de los plasmones del metal. Como resultado de esto se provoca la absorción de varias longitudes de onda dando como resultado que se reflecta una longitud de onda característica. Algunas de estas longitudes de onda suelen encontrarse en el rango de la luz visible y son dependientes tanto del tipo de material utilizado como del diámetro de la

nanopartícula (Nash y cols., 2010; Chuang y cols. 2010). Esta propiedad física ha sido utilizada para el desarrollo de nuevos métodos de detección molecular aplicados en varios campos de trabajo, incluyendo la biología molecular. De esta manera, un determinado diámetro de nanopartícula genera una dispersión particular del haz, dando al medio una intensidad y coloración características (Boozer y cols., 2006, Nash y cols., 2010). A partir de esta propiedad se puede establecer una relación entre la absorbancia del medio y un tamaño específico de nanopartícula, esto significa que el medio adquiere un color particular para un tamaño dado de nanopartícula. Esta característica puede ser utilizada para el diseño de un bioensayo sencillo que sirva como diagnóstico parasitológico simple en donde la unión de varias moléculas de anticuerpos acoplados a nanopartículas sobre un mismo parásito generaría un cambio óptico (coloración) equivalente a un aumento de tamaño de la nanopartícula (Chuang y cols. 2010). De esta forma sería posible detectar la presencia del parásito al observar un cambio colorimétrico en el medio líquido.

La caracterización espectroscópica de las nanopartículas obtenidas ha sido reportada por Chikate y cols. (2008) quienes generan nanopartículas de  $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  recubiertas con oleato, las cuales son posteriormente estudiadas con técnicas de difracción de rayos X, infrarrojo y XPS. La morfología y tamaño de las nanopartículas es estudiada mediante difracción de electrones y microscopía electrónica de transmisión convencional (TEM) y microscopía electrónica de barrido convencional (SEM).

Podemos mencionar también el trabajo de Booxer y cols. (2006), donde se reportan diversas aplicaciones de RPS en el estudio de interacciones moleculares, tales como interacciones péptidos-proteínas, interacciones proteínas-DNA, hibridación de DNA, entre otras. Dentro de las aplicaciones los autores comentan diversos trabajos en donde RPS es utilizado en estudios cinéticos y termodinámicos en uniones de receptores-ligandos, acciones terapéuticas de anticuerpos contra cáncer y en la selección de drogas particulares. El fenómeno de RPS depende del ángulo (o la longitud de onda) de la radiación que incide sobre la superficie del metal, de modo que a valores mayores que un ángulo crítico se obtienen valores mínimos de emisión de RPS, dado que los plasmones de superficie que se forman pueden absorber y transferir gran parte de la radiación incidente a otros electrones y otras moléculas metálicas. Otra variable que influye sobre este proceso es el índice de refracción del medio, ya que este determina la velocidad en la que viaja el haz de luz polarizada; las biomoléculas se ubican en la región cercana a la superficie de las nanopartículas y modifican localmente el índice de refracción, por lo se establece una relación directa entre cambio en el ángulo de incidencia y la señal de RPS con los cambios moleculares, haciendo posible medir en tiempo real los dichos procesos al registrar las variaciones ocurridas en la señal RPS .

La efectividad del método ha sido verificada por Chavane y cols. (2008) los cuales realizan una medición en tiempo de real de la concentración de anticuerpos bioactivos (que preservan su actividad inmunogénica) producidos en

un biorreactor de 3.5 L usando un equipo comercial de RPS, este método fue validado con análisis de densitometría y Western blotting tomando diferentes muestras del biorreactor a largo del tiempo. Los investigadores encontraron una buena correlación entre los datos arrojados por ambos métodos y los resultados obtenidos por el análisis de RPS concluyendo que efectivamente se da una cuantificación de los anticuerpos por este último, no obstante se agrega que para que ocurra una identificación, el *biochip* (la nanopartícula acoplada al ligando del anticuerpo) debe mantenerse inmóvil junto con los anticuerpos para que pueda ocurrir la identificación positiva, sin embargo a pesar esto al compararse las mediciones en línea (*online*) como las mediciones hechas fuera del biorreactor (*offline*) se encontró que efectivamente es posible realizar mediciones *in vivo* en tiempo real del proceso.

Ansari y cols. (2008) diseñan un biosensor de glucosa usando nanocestas de óxido de estaño ( $\text{SnO}_4$ ) unidas covalentemente a la enzima Glucosa oxidasa (GOx). Los autores fabrican las nanocestas a partir de  $\text{SnCl}_4 \cdot \text{XH}_2\text{O}$  con  $\text{O}_{2(g)}$  a temperatura de 90 °C en tubos de cuarzo, la deposición de las nanopartículas de óxido de estaño fue realizada sobre una capa porosa de alúmina, una lamina de aluminio cubierta de óxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), con poros de diámetro de 80nm a una temperatura de 350 a 450°C por 15 min, a una presión de 0.2 Torr por medio una deposición química por vapor de plasma. La caracterización de las nanopartículas se realiza por Microscopia Electrónica de Barrido por emisión por campo (FEEM), Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X y Espectrometría de Difracción de Rayos X. La inmovilización de la enzima GOx se realizó por

adsorción física sobre la película de estaño (aproximadamente 1000 unidades de enzima por 3 horas), encontrándose covalentemente unida al  $\text{SnO}_4$ , esto se verificó al observarse un pico de emisión de fotoelectrones en la banda de nitrógeno. La verificación de la presencia de glucosa no se realizó en este caso por RPS sino midiendo la corriente eléctrica generada por la liberación de los electrones al ocurrir la reacción de oxidación, la concentración de glucosa varió de 10 a 360 mg/dL y se encontró una sensibilidad lineal entre la corriente producida por el biosensor y las concentraciones trabajadas, por lo que los autores concluyen que efectivamente se produce una identificación positiva por parte del biosensor en presencia de glucosa.

De la misma manera se presentan en otros trabajos la fabricación de biosensores basados en el acoplamiento de proteínas particulares a nanopartículas metálicas para la detección biomoléculas. En este caso se sigue el mismo proceso anterior de utilizar una reacción electroquímica para la generación de señales eléctricas. Como ejemplo tenemos a Pingarron y cols. (2008) en donde se menciona la aplicación de nanopartículas de oro acopladas a enzimas particulares como la glucosa oxidasa o la peroxidasa de rábano (HRP) para determinación de los niveles de glucosa y de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , también se menciona la utilización de arreglos de anticuerpos como la IgG con oro coloidal acoplado a electrodos de nanotubos de carbono entre otros. Los autores mencionan también la utilización de las nanopartículas en estudios de hibridación de DNA, tomando en este caso que la unión del oro coloidal se da en cadenas de DNA sencillas por enlaces covalentes al azufre del grupo

Mercaptoetano del oligonucleótido. En este caso la señal generada tiene un alto grado de sensibilidad hasta el punto de distinguir por medio de la medición de voltaje si está ocurriendo o no un proceso de hibridación.

Otro caso es el desarrollo de un biosensor de Nitrato por parte de Dai y cols. (2008) en donde se inmoviliza una molécula de hemoglobina en nanoesferas huecas de CdS unida a un electrodo de carbón. En este caso ocurre una reacción de reducción de  $\text{NO}_2$  a NO en donde los electrones provinieron del átomo de hierro del grupo hemo de la hemoglobina. Se observó un pico de potencial eléctrico a los  $-286$  mV a una concentración de  $0.1$  M a pH 7 en buffer fosfato. El rango de linealidad se conservó de  $0.3$  a  $182$   $\mu\text{M}$  y el límite inferior en  $0.08$   $\mu\text{M}$ . Al final se concluye que proteínas inmovilizadas en una matriz metálica pueden funcionar como biosensores y contribuir al desarrollo de nuevos métodos de detección moleculares.

Cabe destacar que también ha sido utilizado el fenómeno de resonancia plasmónica de superficie como mecanismo de detección de enfermedades y de varios agentes patógenos. Nagel y cols. (2008) usan la señal RPS para la identificación serodiagnóstica de la enfermedad de Lyme, trastorno parasitario causado por *Borrelia burgdorferi*. Los investigadores trabajan con anticuerpos específicos inmovilizados sobre una superficie para la detección del parásito en el suero sanguíneo. Los autores trabajaron con una dilución 1/20 de suero en buffer HBS al 0.05% de Tween 20 y con 1 mg/mL de carboximetil dextrano para reducir la identificación no específica, trabajaron con anticuerpos contra

Ospc/pepC10, las cuales son proteínas integrales de la membrana del parásito, obteniéndose una sensibilidad del 92%, además también se trabajo con anticuerpos contra las proteínas VlsE/C6 obteniéndose una sensibilidad en este caso de 82 y 86% respectivamente, estos resultados fueron validados contra un Western Blotting arrojando una correlación del 96,5% con los resultados anteriores obtenidos por RPS. La ventaja del método RPS es que se tiene un monitoreo sensible y directo para determinar la presencia del parásito en la sangre y no es necesario en este caso realizar un inmunomarcaje secundario sobre la muestra.

En su revisión bibliográfica, Skottrup y cols. (2008) investigan el desarrollo de inmunobiosensores para la identificación de microorganismos tales como *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Listeria monocytogenes*. Mencionan que muchos de estos métodos trabajan con el anticuerpo retenido sobre una superficie fija y por medio de diferentes técnicas se evidencia la interacción del anticuerpo con su antígeno respectivo. Dentro de las técnicas que mencionan los autores se encuentra Resonancia Plasmónica de Superficie, Microbalanza de Cristal de Cuarzo, técnica que consiste en la medición de los cambios de frecuencia de un cristal de cuarzo piezoeléctrico (cristales que al ser sometidos a tensiones mecánicas inducen una polarización eléctrica de su masa) el cual es muy sensible a los cambios de masa, y por último las señales de cantilever, que son estructuras fabricadas que sirven de soporte para brazos o plataformas de otras construcciones. Estos soportes son construidos a partir de silicón, óxido de

silicio o cualquier otro polímero, la medición de las masas se realiza por los cambios de deflexión de del haz incidente, generalmente las mediciones en estas nanoestructuras son realizadas en un microscopio de fuerza atómica (AFM). Los autores concluyen que son métodos con una alta sensibilidad llegando a calcular incluso la masa de pequeñas partículas víricas.

Por último se puede nombrar el trabajo de Cui y cols. (2008), quienes diseñan un biosensor para la identificación de inmunoglobulinas humanas (HIgG). En este caso se utilizan dos anticuerpos, uno de ellos –el primario- está acoplado a una nanopartícula de oro coloidal a su vez unida a un nanotubo de carbono soportado sobre un electrodo de carbón. El otro -el secundario- se encuentra unido a otra nanopartícula de oro la cual, a su vez, se encuentra unida a la HRP. En este caso, ambos anticuerpos, primario y secundario, reconocen el mismo antígeno, la HIgG (ver figura 1). La señal utilizada para medir el experimento es el amperaje que se genera de la reacción electroquímica de degradación del  $H_2O_2$ .

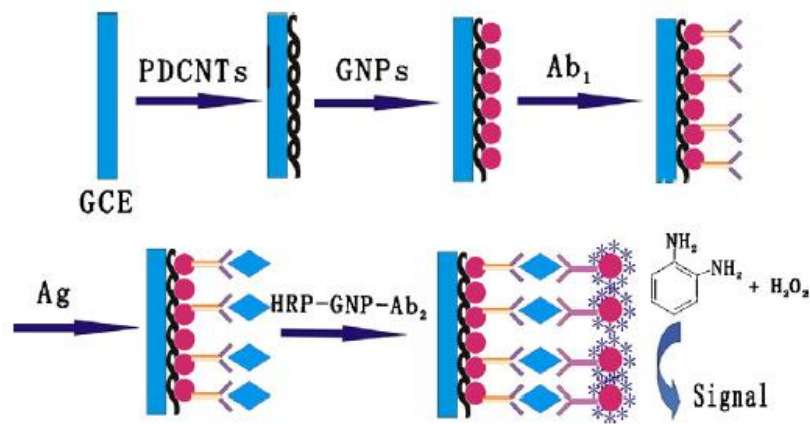


Figura1. Biosensor para la detección de inmunoglobulina humana (tomado de Cui y cols., 2008).

Como se puede observar han sido desarrollados diferentes mecanismos para la detección de señales generadas en sistemas biológicos, en primer lugar enfocadas para el transporte específico de drogas (*drug delivery*), usando para esto liposomas, nanopartículas poliméricas y nanopartículas metálicas, unidas todas estas a anticuerpos o a PTDs (dominios de transducción de proteínas), en segundo lugar se ha mencionado el surgimiento de nuevos métodos de detección basados en las propiedades conductoras y ópticas de las nanopartículas metálicas y su aplicación en varios estudios en biología molecular. Sobre la base de esto se pretende unir anticuerpos específicos a las nanopartículas para obtener un bioensayo que establezca la presencia de organismos parasitarios en una muestra problema.

En nuestro caso se desea trabajar con parásitos del genero *Leishmania*, protozoarios miembros del orden Kinetoplastida, de la familia Tripanosomatidae, los cuales tienen gran importancia epidemiológica (Kreiger, 1991; McGwire y cols., 2010) provocando dependiendo de la especie y de la respuesta inmunológica del individuo, una variedad de patologías como daños a nivel cutáneo, visceral o muco-cutáneo, un trastorno conocido como Leishmaniasis (Kreiger, 1991; Herwaldt, 1999, Amato y cols., 2008; Mitropoulos y cols., 2010). La familia Tripanosomatidae está formada por endoparásitos, cuyo ciclo de vida se caracteriza por tener un amplio rango de hospedadores. Entre ellos tenemos

organismos vertebrados, desde peces hasta mamíferos, y organismos invertebrados, conformados por las especies de insectos hematófagos *Phelobotomus* *sspp.*, y *Sergentomyia* *sspp.*, en el viejo mundo, y las especies *Lutzomyia* *sspp.*, y *Brumptomyia* *sspp.*, en el nuevo mundo (Herwaldt, 1999; Mutiso y cols., 2010).

La familia Tripanosomatidae tiene la propiedad de sufrir cambios morfológicos claramente identificables. Estos cambios se dan a lo largo de su ciclo de vida, siendo algunos característicos sólo dentro de determinados hospedadores. En el caso de *Leishmania* *sspp.*, se presentan dos estadios, uno móvil y flagelar, el promastigote que se da el intestino del vector invertebrado, el flebotomus, el otro inmóvil y aflagelar, el amastigote que se da en el interior del hospedador vertebrado, específicamente en el citoplasma de los macrófagos del sistema inmunitario. Estos parásitos poseen la propiedad de evadir la respuesta inmune (resistencia al complemento) al ser capaces de sobrevivir dentro del fagolisosoma de los macrófagos y de reproducirse dentro de la célula viva (Herwaldt, 1999; Kreiger, 1991; Mitropulos y cols., 2010).

El proceso de infección comienza dentro del intestino del flebótomo, donde el parásito en su estado de promastigote se reproduce dentro de los enterocitos, lo cual causa daños al vector entre los cuales se mencionan: pérdida de las microvellosidades, distensión intestinal y daño vacuolar y mitocondrial en los enterocitos (Kreiger, 1991). La infección en los hospedadores vertebrados se produce cuando el vector inocula el parásito en el

torrente sanguíneo, en este caso ocurre una regurgitación del parásito del intestino del vector. Una vez introducido el parásito dentro del hospedador se produce la respuesta del sistema inmunológico, en donde ocurre la fagocitosis de los promastigotes por parte de los macrófagos, estos logran sobrevivir en el interior del lisosoma gracias a la acción del lipofosfoglicano, que forma un glucocálix que rodea a la célula y evita la unión del lisosoma primario al fagosoma evitando la formación del lisosoma secundario, además el glucocálix permite la unión de *Leishmania spp.*, a los enterocitos por medio de la mediación de lectinas específicas para galactosa (Kreiger, 1991; Matmurray y cols., 2005).

Por otra parte se tiene la acción de la proteína GP63, una proteína de superficie presente en todas especies de *Leishmania spp.*, que posee actividad proteolítica la cual inhibe la acción de las enzimas lisosomales (Kreiger, 1991; Matmurray y cols., 2005). Una vez en el interior de la vacuola parasitófora se efectúa el cambio morfológico de promastigote a amastigote. En el estado de amastigote el parásito se reproduce en el interior del fagosoma, para esto se producen las enzimas superóxido catalasa y superóxido dismutasa que permiten al amastigote sobrevivir en medio ácido con un pH de 4-4.5 (Kreiger, 1991; Gupta y cols., 2009; Gupta y cols., 2010). El ciclo infeccioso se reinicia cuando un flebótomo sano pica a un hospedador infectado en donde, como se mencionó anteriormente, se reproduce el parásito nuevamente en el intestino del vector (Fig. 2)

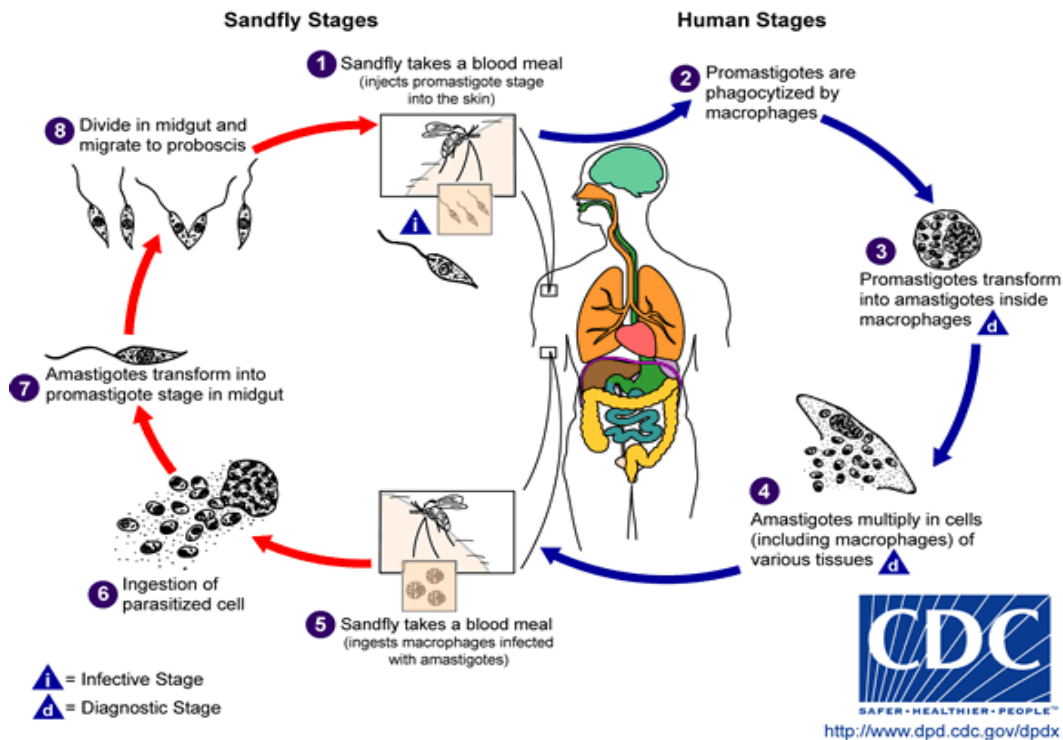


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

Reconocer la presencia de parásitos o de antígenos de superficie de cualquiera de los estadios en pacientes infectados, incluso en etapas tempranas de la enfermedad es de gran importancia para realizar un tratamiento farmacológico efectivo que mejore la calidad de vida de los pacientes de manera de evitar los daños posteriores de la enfermedad avanzada.

Mediante estudios genómicos y proteómicos ha sido posible identificar ambos estadios. De esta manera, el trabajo de Leifó y cols. (1989), reporta el análisis de la expresión de 8160 genes en *Leishmania major*, encontrando el

94% de estos expresados en ambos estadios, un 1.4% expresados únicamente en el estado de amastigote y un 1.5% exclusivos del estado de promastigote. Los mismos investigadores hallaron en promastigotes de *Leishmania infantum* y amastigotes axénicos (provenientes de un medio cultivo puro) una expresión diferenciada de 91 proteínas identificadas, donde 72% (66 proteínas) se presentaron en ambos estadios, un 8% (7 proteínas) se encontraron en el estado de amastigote y un 20% (18 proteínas) se observaron en el estado de promastigote.

Por otro lado, Sadick y Raff (1985) demostraron la expresión diferencial de proteínas superficiales de membrana en ambos estadios de *Leishmania tropica*, utilizando macrófagos susceptibles a promastigotes y macrófagos resistentes a amastigotes. Los autores encontraron -aplicando técnicas de *immunoblotting*, SDS-PAGE y marcaje radioactivo con Iodo 125 ( $I^{125}$ )- la expresión de 9 proteínas asociadas exclusivamente a la membrana plasmática en los promastigotes y una proteína y 3 antígenos (22, 25 y 29KDa) asociados exclusivamente a la membrana plasmática de amastigotes. Dichas proteínas captaron el ion radioactivo a través de un proceso de glicosilación.

Finalmente, Jaffe y Rachamim (1989) encontraron especificidad de cinco anticuerpos monoclonales contra amastigotes (nombrados desde T16 a T20) de *L. major*. Ninguno de estos anticuerpos reaccionó contra promastigotes de *L. major* o de *L. donovani*. El anticuerpo T16 reaccionó positivamente contra amastigotes de *L. mexicana*, *L. amazonensi* y *L. donovani*. Los autores

identificaron -mediante técnicas de *Western blotting* (*immunoblotting*) e inmunoprecipitación- que el anticuerpo T16 reacciona contra varias proteínas de amastigotes de *L. major* (entre 12 y 180 KDa). Los investigadores concluyen que estos anticuerpos pueden ser usados para la determinación de la presencia de *L. major* en biopsias de tejido humano.

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo consiste en la inmunodetección de parásitos tropicales mediante anticuerpos adsorbidos en la superficie de nanopartículas metálicas a fin de generar un método de detección de la infección que sea sensible y efectivo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar utilizando técnicas espectroscópicas la unión de anticuerpos contra antígenos de superficie expresados en la superficie de parásitos unicelulares (familia Trypanosomatidae) y nanopartículas metálicas.
2. Optimizar las condiciones de unión de nanopartículas metálicas y anticuerpos.
3. Evaluar la especificidad del arreglo nanopartícula-anticuerpo obtenido como agente de identificación de parásitos del genero *Leishmania*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Obtención de nanopartículas de oro por ablación por láser

Para la generación de nanopartículas de oro (AuNP) se empleará la técnica de ablación por láser (Ortega, 2007). Para ello la muestra se colocará de manera tal que el haz del láser incida directamente sobre la placa de oro.

Para la remoción del material de la placa de oro se empleará un láser pulsado Nd:YAG ( Continuum Surelite Q-Swiched), cuyas características se muestran en la tabla 1:

Tabla 1 características Surelite II

Longitud de onda	1064 nm	532 nm	355 nm
Energía	650 mJ	300 mJ	100/160 mJ
Tamaño del pulso	5-7 ns	4-6 ns	4-6 ns
Estabilidad	2.5%	3.5%	4.0%
Frecuencia de repetición	10 Hz		

Como se muestra en la tabla 1, éste láser pulsado puede generar radiación láser a tres longitudes de onda correspondientes a tres regiones del espectro electromagnético. En nuestro caso, se trabajó fundamentalmente a 520nm debido a que esta longitud de onda nos proporciona una energía suficiente como para arrancar material y así generar nanopartículas de oro. Se trabajó con agua desionizada como solvente y se realizo tres ensayos diferentes, el primero de ellos consistió en la síntesis de nanopartículas solo con el solvente, el segundo ensayo fue la síntesis de nanopartículas a una solución de  $10^{-3}$  M de dodecil sulfato sódico (SDS), y por último un tercer ensayo a distintas concentraciones de polietilenglicol (PEG) como agente emulsificante de

las AuNP. La razón de usar emulsificantes es que existe la tendencia de que las nanopartículas tanto poliméricas como metálicas interactúen entre sí formando agregados (Hans y Lowman, 2008; Nash y cols., 2010) por lo que el SDS (Márquez, 2009) y el PEG (Hans y Lowman, 2008; Odaci y cols., 2010) son usados para evitar la agregación de las AuNP. El PEG es usado como emulsificante en lugar del SDS para la formación de los arreglos anticuerpo-nanopartículas, porque el SDS elimina la estructura tridimensional de las proteínas lo que provoca su desnaturalización. Para los fines experimentales es necesario conservar la conformación nativa de la proteína para mantener la inmunorreactividad de los anticuerpos lo cual se logra usando el PEG en lugar del SDS. El PEG también actúa como funcionalizador de la superficie de las AuNP al permitir la correcta orientación de la inmunoglobulina mediante el enlace a los extremos C-Terminales ubicados en las unidades pesadas y livianas del anticuerpo (Skottrup y cols., 2008). Se trabajó con tres concentraciones diferentes de PEG:  $10^{-1}M$ ,  $10^{-2}M$  y  $10^{-3}M$  para determinar la concentración óptima de trabajo. En este caso se usó un volumen de 7mL en cada vial, y se utilizaron tiempos de ablación de 3 min., 5min y de 7 min. Los viales y todo el material de vidrio utilizado para la generación y caracterización de las AuNP, fueron lavados y secados con etanol.

Un detalle en particular es que el láser usado en el laboratorio, posee una fluctuación de la energía que no se puede controlar, por lo cual debe medirse la cantidad de energía antes y después de la síntesis de las nanopartículas. Las

nanopartículas en este caso fueron obtenidas en el Laboratorio de Espectroscopia Láser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

## **2. Caracterización de nanopartículas de oro.**

La caracterización de las nanopartículas se realizó midiendo el espectro de absorbancia, observándose un pico en los 520nm el cual corresponde a la longitud de onda de absorbancia de las AuNP (Chu y cols., 2005; Chuang y cols., 2010). Se utilizó en este caso una lámpara que cubre todo el espectro electromagnético y un software llamado Oobasic 32 para registrar las mediciones de los espectros de absorbancia. Los datos obtenidos por este programa fueron posteriormente graficados con el programa OriginPro 7.5.

Posteriormente se procedió a medir la frecuencia de aparición de los diferentes diámetros de las AuNP utilizando una técnica llamada Dispersión Dinámica de Luz (Dynamic Light Scattering, DLS). Esta técnica consiste en irradiar con un haz de luz polarizada una muestra con partículas en suspensión que presentan movimiento browniano; las partículas al moverse causan la dispersión del haz de luz, siendo esto una función que depende del diámetro hidrodinámico de la partícula (diámetro real con junto a una capa de solvatación). Esto se logra mediante el uso de una ecuación conocida como ecuación de Stokes-Einstein :

$$d = \sqrt{kt / 3\pi\eta D}$$

Donde  $D$  es el coeficiente de difusión traslacional,  $\eta$  es la viscosidad del medio,  $T$  la temperatura absoluta,  $k$  la constante de Boltzman y  $d$  es el diámetro hidrodinámico.

La medición se llevó a cabo con láser de helio-neón el cual es enfocado mediante un sistema de espejos hacia una cámara en donde se coloca la muestra problema. Se usaron dos programas para realizar las mediciones, ambos desarrollados en el laboratorio de espectroscopia láser. El primero de ellos, llamado `power_dls_v2.vi`, mide el cambio de potencial eléctrico en el tiempo; el segundo programa, llamado `Gui-PSD`, se utiliza para determinar la distribución de frecuencias de nanopartículas en función de su diámetro. Los datos obtenidos fueron graficados usando el programa OriginPro 7.5.

Las AuNP fueron caracterizadas mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM), en este caso se colocó una pequeña gota de la suspensión en una rejilla de cobre, luego de lo cual se procedió a su observación al TEM. Las imágenes obtenidas fueron analizadas midiendo los diámetros de las AuNP. En base a lo anterior se seleccionó la suspensión de nanopartículas  $10^{-2}$  M debido a que esta suspensión presentó un menor diámetro promedio de partícula determinado por las micrografías electrónicas obtenidas y también por poseer un espectro de absorbancia mayor al resto de las suspensiones preparadas.

### **3. Unión del complejo nanopartícula-anticuerpo**

Los anticuerpos primarios utilizados para acoplar a las AuNP consistieron en Inmunoglobulinas G (IgG) policlonales, específicamente el anticuerpo anti-gp63 de ratón (ABD Serotec), una proteína que se encuentra expresada en la superficie de promastigotes del género *Leishmania spp.*, involucrada en la supervivencia del parásito en el interior del macrófago (Muskus y Marin, 2002). Una vez que el promastigote invade al macrófago, es atacado por enzimas lisosomales y por metabolitos reactivos del oxígeno. La glicoproteína gp63, parece jugar un papel primordial en la supervivencia del parásito en el macrófago. Esta glicoproteína, cuya actividad proteasa óptima se alcanza a pH 4 precisamente el encontrado en el fagolisosoma, está involucrada en la degradación inespecífica de enzimas lisosomales deletéreas para el parásito (Chaudhuri y Chang, 1988).

La reconstitución del anticuerpo se realizó agregando 0.5 mL (500 $\mu$ L) de agua destilada al polvo liofilizado, según instrucciones del fabricante. Luego se procedió a preparar soluciones blanco en diluciones de 1:100; 1:1000 y 1:10000. La dilución 1:100 se preparó tomando 20 $\mu$ L de la solución reconstituida de anticuerpo anti-gp63 y llevándola a un volumen final de 2000  $\mu$ L al agregar 1980  $\mu$ L de agua deionizada, según se indica en la figura 2. La dilución 1:1000 se preparó tomando 200  $\mu$ L de la solución 1:100 y llevándola a un volumen final de 2000 $\mu$ L. La solución 1:10000 se preparó de manera similar, tal y como se indica en la figura 3.

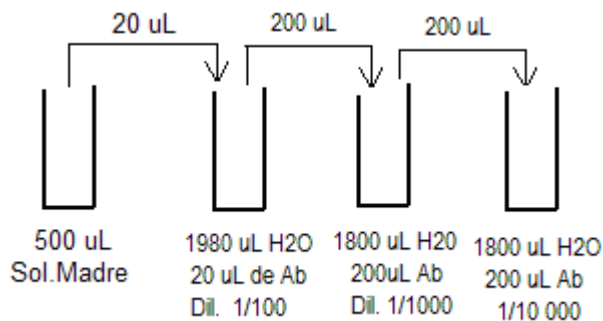


Figura 3. Preparación de las diluciones de anticuerpo anti-gp63.

Estas soluciones se utilizaron como blanco en las mediciones de absorbancia de los espectros de las suspensiones con AuNP conjugadas con el anticuerpo anti-gp63. Seguidamente se procedió a preparar soluciones con diluciones de 1:100; 1:1000 y 1:10000 de anticuerpo anti-gp63 y AuNP. Para esto se realizó la unión del anticuerpo anti-gp63- AuNP agregando un volumen de 20  $\mu$ L del anticuerpo reconstituido a 1980  $\mu$ L de la suspensión de nanopartículas de la concentración previamente seleccionada ( $10^{-2}$ M), de esta forma se obtuvo la dilución 1:100. Las diluciones restantes (1:1000 y 1:10000) se obtuvieron del modo descrito en el párrafo anterior, ver figura 3.

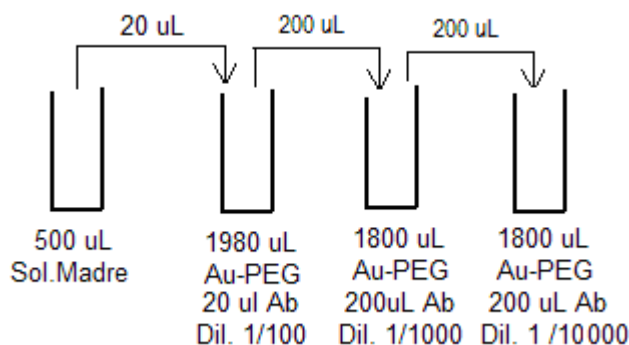


Figura 4. Preparación de los complejos anti-gp63-AuNP.

Se evidenció la unión de los anticuerpos a las AuNP registrando la disminución del pico del espectro absorbancia en los 520 nm durante una hora, un procedimiento similar es usado por Chu y cols. (2005) y por Chuang y cols. (2010) donde miden la disminución del pico de absorbancia por un tiempo de 20 minutos.

#### **4. Ensayo de unión del complejo anti-gp63-AuNP a parásitos de *L. major*.**

Los promastigotes de *Leishmania major* fueron cultivados en medio Schneider de insectos a una temperatura de 27°C y un pH de 7.4 suplementado con suero de bovino inactivado al 10 % (FBS). Las células fueron lavadas dos veces con buffer fosfato (PBS 10mM fosfato; 2.7 mM de KCl; 137 mM de NaCl, pH 7.4).

Se procedió a la inmovilización de los promastigotes de *L. major* de la manera siguiente: Se tomó un frasco de cultivo Falcon® de 50ml en donde se colocó una solución de poli-lisina (10mM) en PBS por 30 min., lo suficiente para cubrir la superficie del frasco. Al cumplirse el tiempo se remueve la solución de Poli-Lisina y se lava la superficie con PBS dos veces; 10ml de la suspensión de parásitos fueron lavados en PBS y colocados en el interior del frasco Falcon® y se dejó por 15 min o hasta que toda la población se adheriera a la superficie. Después de esto, las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min., lavadas con cloruro de amonio 50mM en PBS por 5 min y por último se lavaron dos veces con PBS.

Se midió el espectro de absorción del complejo anti-gp63-AuNP antes de ser agregado al tubo Falcon®. Posteriormente se agregó 2ml del complejo sobre la superficie en donde están fijados los parásitos y se dejó reaccionar el sistema por 48 horas en total, luego de lo cual se midió nuevamente el espectro de absorción. En este caso se espera observar una disminución del espectro de absorbancia debido a la unión de las AuNP a la membrana plasmática de los parásitos.

**5. Ensayo de unión del complejo anti-gp63-AuNP a parásitos de *L. major* en suspensión.**

Inicialmente se procedió a medir el espectro de absorbancia de la suspensión de parásitos de *L. major* y del complejo anti-gp63-AuNP antes de la interacción. Luego se añadió un volumen de 2 mL del complejo a la suspensión de parásitos y se dejó interactuar el sistema por 2 horas. Después de transcurrido este tiempo se midió nuevamente el espectro de absorción del complejo, en este caso se espera observar, como en el ensayo anterior, una disminución de espectro de absorción debido a la unión del complejo anti-gp63-AuNP a los parásitos.

**6. Ensayo de unión del complejo anti-gp63-AuNP con la proteína de gp63 aislada de la membrana plasmática de *Leishmania major*.**

En este caso se trabajó con un extracto de 500 uL de una solución purificada 1 mg/mL de proteína gp63 purificada de la superficie de *Leishmania*

*major.* Aquí, como en los ensayos anteriores, se midió inicialmente el espectro de absorción de las AuNP y el espectro de absorción del complejo anti-gp63-AuNP. Inicialmente se colocó 100 uL de proteína gp63 en un volumen de 1mL del complejo anti-gp63-AuNP y se midió el espectro a los 0 y a los 18 min. Luego se agregó 100 uL adicionales de la solución de gp63 para un volumen de 200uL AuNP funcionalizadas, en este caso se registró el espectro de absorbancia a los 0 y a los 8 min. Se agregó posteriormente 200 uL adicionales de gp63 a la suspensión de nanopartículas y se midió el espectro de absorbancia a los 0 y a los 5 min. Por último se agregó 300 uL del extracto de proteína gp63 a la suspensión y se midió el espectro de absorbancia a los 0 minutos y los 6 minutos de reacción.

## RESULTADOS

### 1. Caracterización de las nanopartículas oro

Inicialmente se realizó un ensayo de síntesis de AuNP en agua destilada y en dos soluciones de dodecil sulfato de sodio (SDS) de  $4,7 \times 10^{-2}$  M y de  $4,7 \times 10^{-3}$  M respectivamente, esto se realizó para corroborar lo reportado por Hans y Lowman (2008), donde se menciona la necesidad de trabajar con agentes emulsificantes por la tendencia de las nanopartículas a formar agregados. Los autores mencionan este comportamiento para nanopartículas poliméricas. Este mismo comportamiento se encuentra en nanopartículas metálicas como las AuNP como se reporta West (2009) en donde la agregación de las AuNP provoca un cambio de coloración en la suspensión acuosa. La síntesis de AuNP se realizó en un volumen de 7mL en agua deionizada en viales de vidrio. Para las soluciones de SDS se utilizó un tiempo de ablación de 7 min. En el caso de las soluciones de PEG se midieron distintos tiempos de ablación usando la solución de  $10^{-2}$  M de PEG para determinar el tiempo óptimo de ablación, siendo de 5 min. Se observó que luego de este tiempo, la solución se calienta y se evapora, salpicando en ocasiones la lente que dirige el haz del láser sobre la muestra. La energía del láser es medida antes y después de la síntesis de las AuNP debido a que la coherencia del haz no se mantiene constante en el tiempo, lo que hace variar la energía incidente sobre la placa. En este caso también se calcula la irradiancia, es decir la cantidad de radiación por superficie que recibe la muestra. El diámetro del haz del láser sobre la

muestra es medido usando un papel fotosensible y una regla graduada, resultando en 1,5 cm; para el cálculo de la irradiancia se utilizó la siguiente expresión:

$$I = \frac{E_{\text{prom}}}{t_{\text{pulso}} A_{\text{spot}}}$$

En donde  $E_{\text{prom}}$  es la energía promedio,  $t_{\text{pulso}}$  el tiempo del pulso del láser aplicado sobre la muestra y  $A_{\text{spot}}$  el área del spot, que representa el área de una circunferencia. En la suspensión de agua deionizada sin emulsificante se observó la precipitación de las AuNP en el fondo del vial; en este caso el espectro de absorción de la suspensión coincidió con el espectro de absorción del blanco (datos no mostrados). La irradianza medida en esta suspensión fue de 46,67 MW/cm<sup>2</sup>.

En las soluciones de SDS se observó la formación de las AuNP en suspensión sin formación de precipitados. En este caso el líquido pasó de incoloro y transparente a una coloración rosada, tal como se muestra en la literatura (Fig. 5). El espectro de absorbancia de las soluciones de  $4,7 \times 10^{-2}$  M y de  $4,7 \times 10^{-3}$  M de SDS arroja a su vez un pico en los 521,32 nm (Fig. 6) que corresponde con la banda de absorción de las AuNP (Chu y cols., 2005; Márquez, 2009).

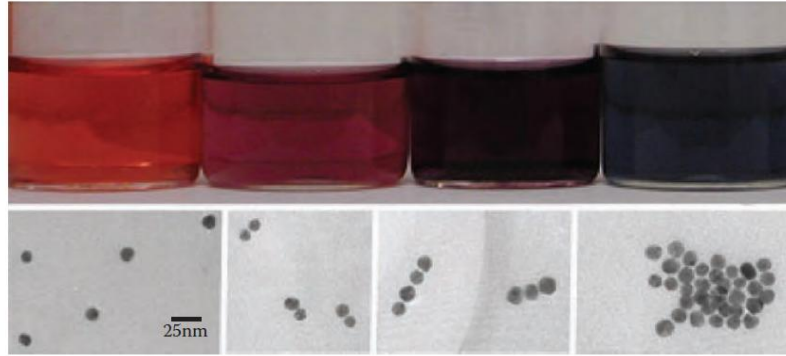


Figura 5. Cambio colorimétrico ocasionado por la agregación de AuNP (tomada de West, 2009)

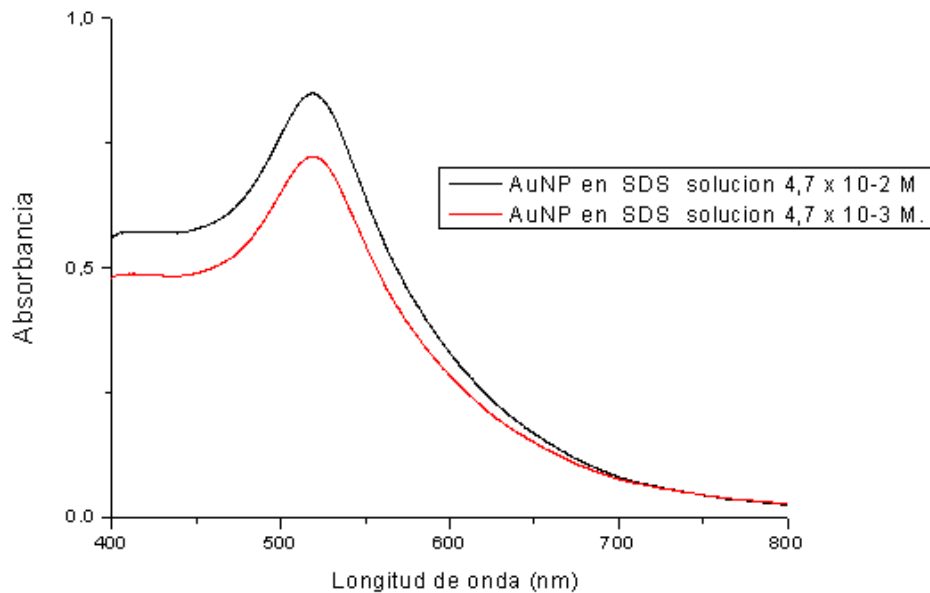


Figura 6. Espectro de absorbancia de AuNP en SDS

Los espectros de absorbancia indican una mayor cantidad de AuNP en la solución de  $4,7 \times 10^{-2}$  M de SDS, aunque en este caso no se estima por el espectro de absorbancia una cuantificación exacta del número de AuNP en la suspensión. Sobre la solución de SDS en agua incidió una irradianza promedio de  $5,275 \times 10^{-11}$  GW/cm<sup>2</sup> en un tiempo de ablación de 5 min. Se estimó en este caso por Dinamic Light Scattering (DLS) la distribución de la frecuencia de

aparición de las nanopartículas vs el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas para las soluciones de concentración de SDS correspondientes a  $4,7 \times 10^{-2} \text{ M}$  y  $4,7 \times 10^{-3} \text{ M}$  (figs. 7 y 8 respectivamente).

Figura 7. Determinación del diámetro hidrodinámico promedio de las AuNP mediante DLS en la solución de  $4,7 \times 10^{-2} \text{ M}$  SDS

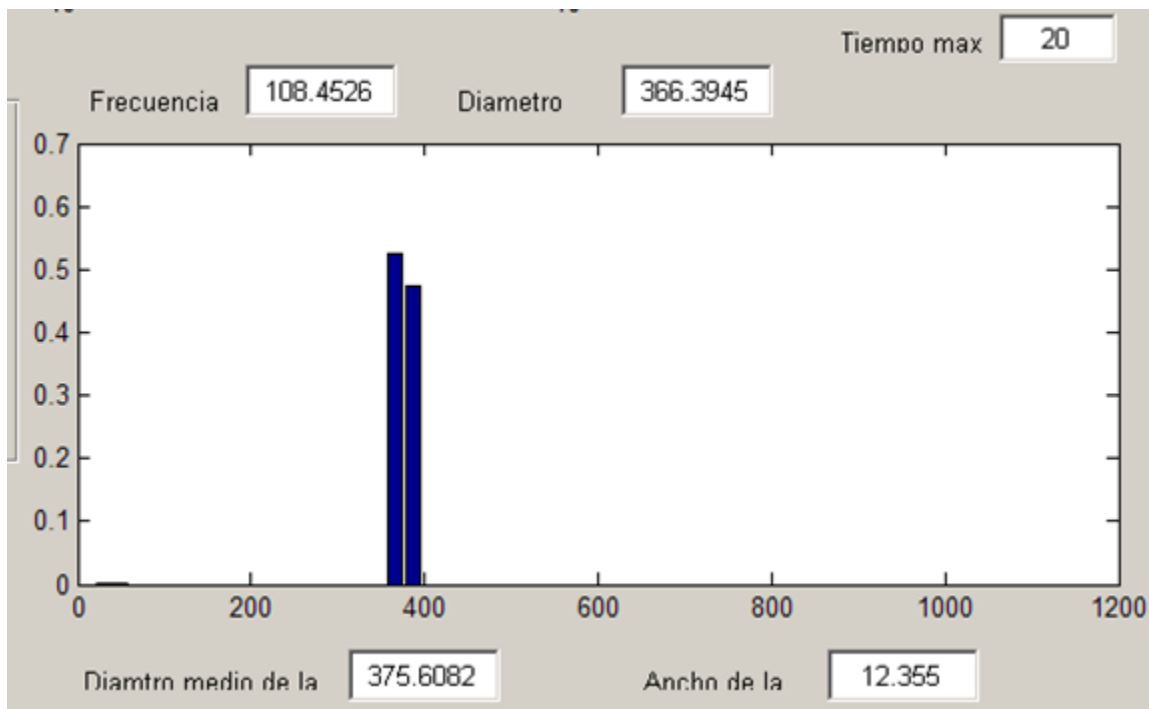
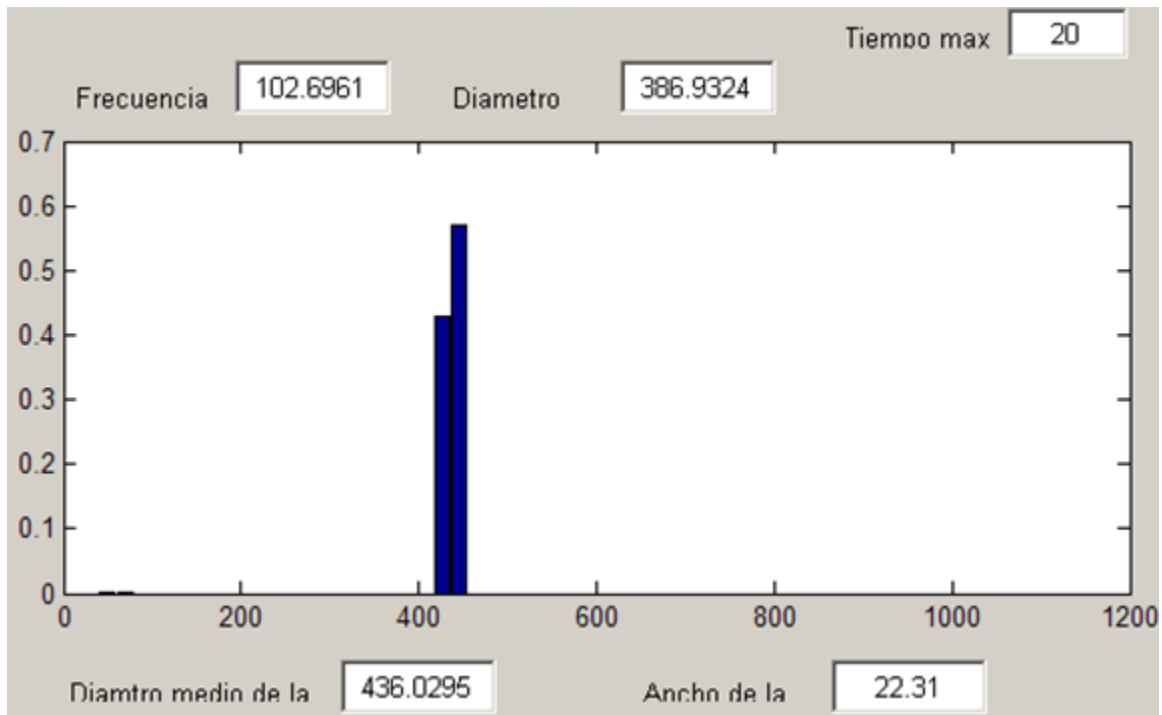


Figura 8: Determinación del diámetro hidrodinámico promedio de las AuNP mediante DLS en la solución de  $4,7 \times 10^{-3} \text{ M}$  SDS



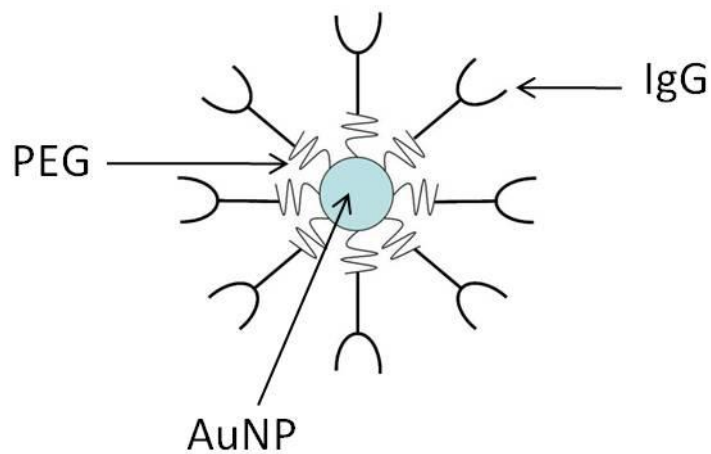
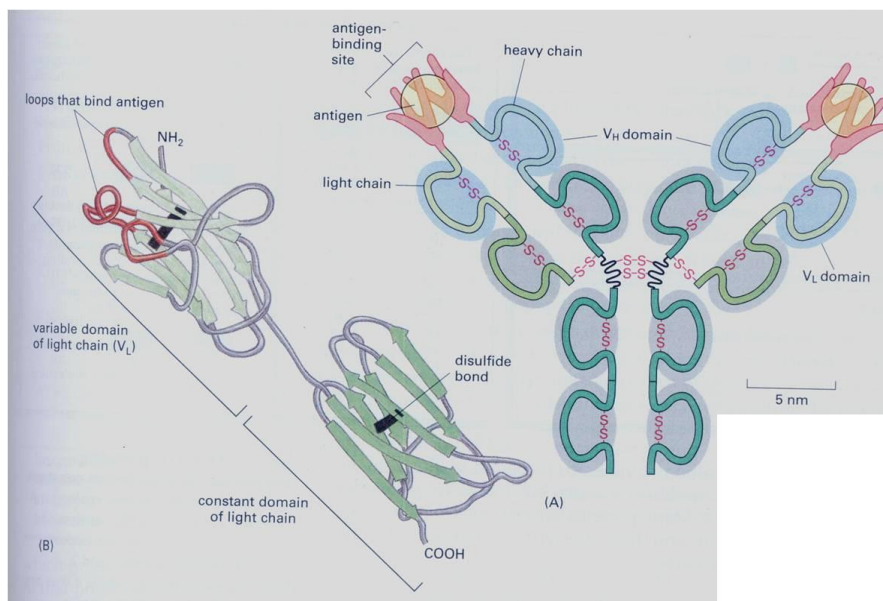
La distribución de AuNP observadas en las Figura 7 y la Figura 8 contiene errores en los cálculos de los diámetros hidrodinámicos debido al montaje experimental del equipo de DLS. En este caso el equipo registra el doble de la intensidad real del haz dispersado por las partículas en suspensión, dando como resultado el doble del diámetro de las AuNP. En la solución de  $4.7 \times 10^{-2}$  M SDS (fig.7) se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de AuNP de 375.6082nm, el cual al ser corregido resulta en un diámetro aproximado de 187.80nm. Para la solución de  $4.7 \times 10^{-3}$  M SDS (fig.8) se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de AuNP de 436.0295nm, el cual al ser corregido resulta en un diámetro aproximado de 218.01nm.

A partir de los datos obtenidos se verifica lo mencionado en la bibliografía por Hans y Lowman (2008) y Márquez (2009), quienes indican que es necesaria la presencia de agentes emulsificantes para evitar la agregación de las nanopartículas generadas. En nuestro caso no es posible usar SDS para ensayos biológicos ya que tiende a alterar la estructura terciaria de las proteínas, la cual es fundamental para que la molécula mantenga su actividad biológica. Esto puede verse en algunas técnicas experimentales comunes en biología celular molecular, como en el caso de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), donde el SDS es usado para desnaturalizar las proteínas de manera de estimar los pesos moleculares del polipéptido mediante la comparación de las bandas obtenidas con bandas de referencia (Alberts y cols., 2002).

En el caso de ensayos biológicos han sido usados otros compuestos como agentes emulsificantes entre los cuales se puede mencionar brevemente el suero de albúmina de bovino (Chu y cols., 2006), el dextrano (Montet y cols., 2006; Skottrup y cols., 2008); la fosfatidilcolina, el dimetil amonio bromida, anfifila D- $\alpha$ -tocoferil polietilenglicol (Hans y Lowman, 2006) y por último se menciona el mercaptoetanosulfonato (Ros y cols., 1998). En nuestro caso se utilizó para la fabricación del biosensor de *Leishmania spp* el polietilenglicol (PEG) como agente emulsificante, dado que este compuesto no compromete la estructura terciaria de los anticuerpos a la concentración utilizada, lo cual es fundamental para garantizar el reconocimiento del antígeno, además el PEG actúa como agente funcionalizador de la superficie de las AuNP (Skottrup y cols.

2008). Esto garantiza la correcta orientación de los anticuerpos (IgG) debido a que el PEG se une a la inmunoglobulina a través de los extremos C-terminal tanto de las subunidades de cadenas ligeras como de las cadenas pesadas, exponiendo la región multivariable hacia la solución, es decir hacia el antígeno (región Fab, Fig. 9), mientras que la región conservada permanece unida a la superficie de las AuNP.

(9a).



(9b)

Figura 9. Estructura de una inmunoglobulina G típica. Se muestra la posición de los extremos C-terminal en las cadenas livianas (fig 9a, tomada de Alberts y cols., 2002), así como el arreglo IgG-PEG-AuNP en la nanopartícula funcionalizada (fig 9b).

Luego se procedió a estimar la concentración óptima de PEG para los ensayos posteriores de unión de las AuNP con el anticuerpo anti-gp63. Para esto se sintetizaron las AuNP a diferentes concentraciones de PEG por medio de la técnica de ablación con láser, el tiempo de ablación utilizado fue de 5 min. A continuación se presenta la energía promedio y la irradianza que incide sobre las soluciones (tabla 2):

Tabla 2. Energía promedio e irradianza utilizadas en la generación de AuNP durante la determinación de la concentración óptima de PEG:

Concentración de PEG (M)	Energía promedio ( mJ)	Irradiancia (mW/cm <sup>2</sup> )
$10^{-2}$	42,75	45,36
$10^{-3}$	55,10	58,46
$10^{-4}$	53,80	57,08
$10^{-5}$	49,10	52,10
$10^{-6}$	54,10	57,40

En la tabla 2 se muestra la energía promedio del láser antes y después de las síntesis de las AuNP. Se observa que la energía del haz varía considerablemente en el tiempo, variando por lo tanto la irradiancia que incide sobre la muestra, esto da como resultado que no siempre se tengan condiciones constantes en la síntesis de las nanopartículas de oro, haciendo difícil obtener resultados reproducibles. Sería recomendable estabilizar la energía del haz o utilizar un láser en donde se mantenga un haz coherente en el tiempo.

A continuación se presentan los espectros de absorción de cada una de las suspensiones de AuNP. En este caso se observa un pico de absorción en 518,92 nm encontrándose que conforme aumenta la concentración de PEG se obtiene una mayor absorción por parte de las AuNP en suspensión, lo que evidenciaría una acumulación de nanopartículas de oro en la fase líquida.

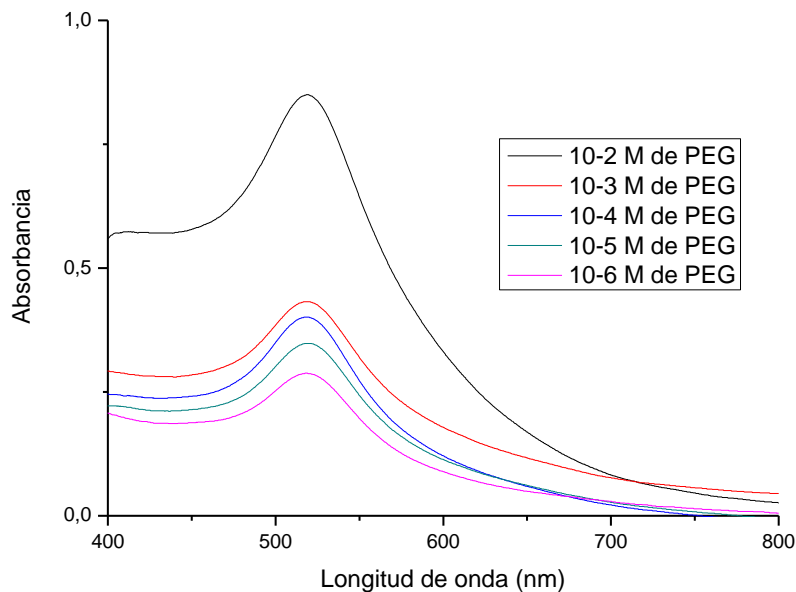


Figura 10. Espectros de absorbanza de las AuNP en las soluciones de PEG.

En general se observa una disminución del número de AuNP conforme disminuye la concentración del surfactante, este es el efecto esperado cuando se varía la concentración del surfactante obteniéndose en el proceso nanopartículas de diámetros mucho menores (Márquez, 2009).

A continuación se presentan los datos obtenidos a partir del programa Gui-PSD y de la observación al TEM de cada una de las suspensiones de AuNP preparadas en concentraciones de PEG de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ M. Las gráficas muestran la frecuencia de nanopartículas en función de su diámetro hidrodinámico en cada solución. Las condiciones de medida usadas en el programa son las siguientes: temperatura: 300°K; viscosidad del medio: 1; índice de refracción del medio: 1,497; longitud de onda del láser de He-Ne: 632,8nm; ángulo de incidencia del haz: 106.6° grados. El volumen usado en las mediciones fue de aproximadamente 2 mL. Hay que reportar que no se presenta la micrografía correspondiente a la solución de  $10^{-6}$  M PEG debido a que no se pudo lograr la correcta deposición de las AuNP sobre la rejilla de cobre.

Figura 11: 11a) Frecuencia de AuNP en función del diámetro hidrodinámico para la solución  $10^{-2}$  M de PEG.

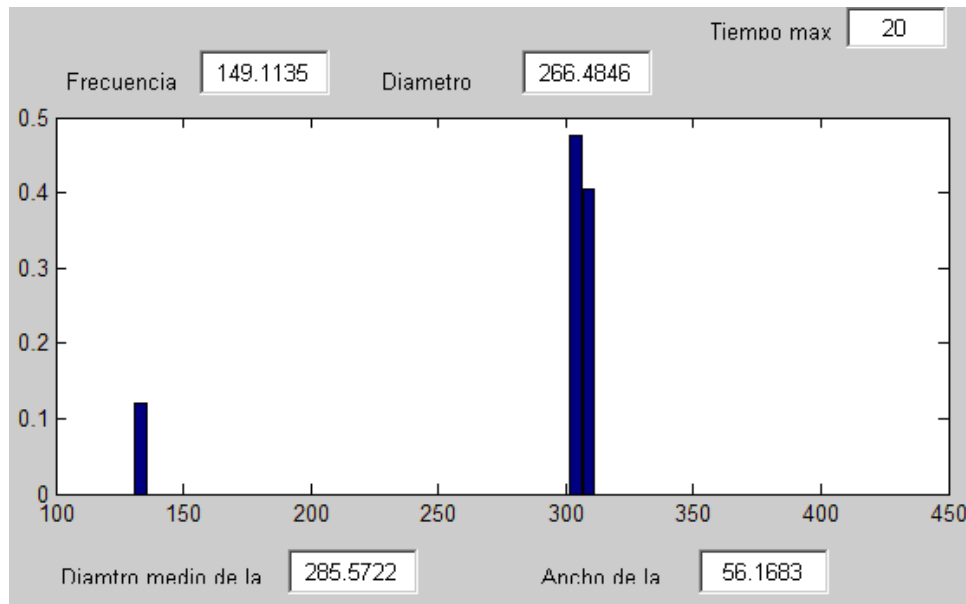


Figura 11b) Micrografía electrónica (TEM) para la solución  $10^{-2}$  M de PEG + AuNP.

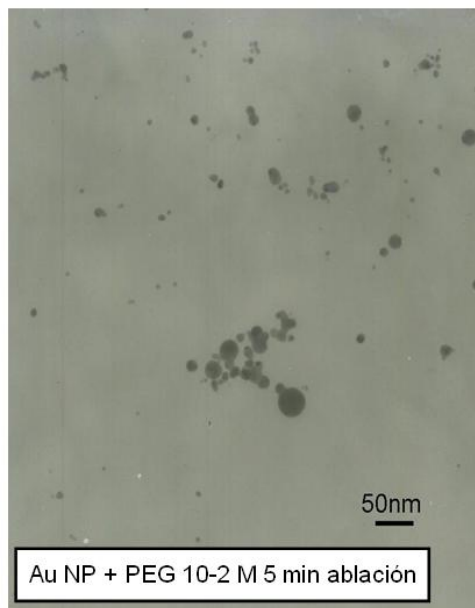


Figura 12: 12a) Frecuencia de AuNP en función del diámetro hidrodinámico para la solución  $10^{-3}$  M de PEG.

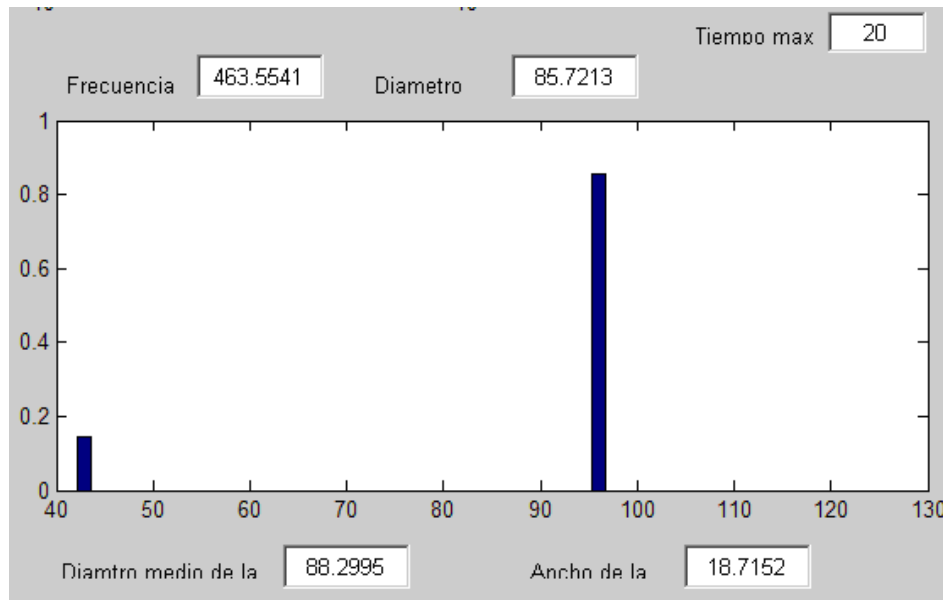


Figura 12b) Micrografía electrónica (TEM) para la solución  $10^{-3}$  M de PEG + AuNP

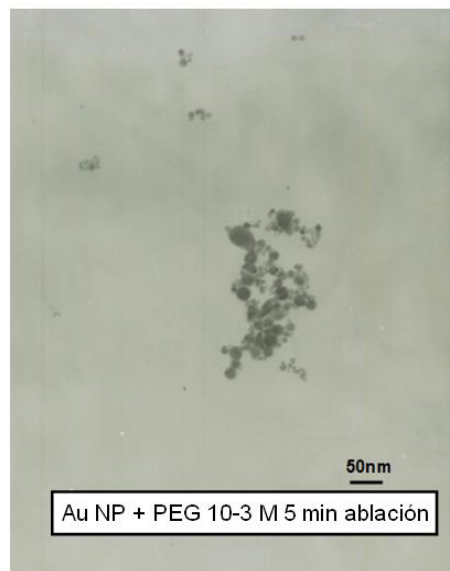


Figura 13: 13a) Frecuencia de AuNP en función del diámetro hidrodinámico para la solución  $10^{-4}$  M de PEG.

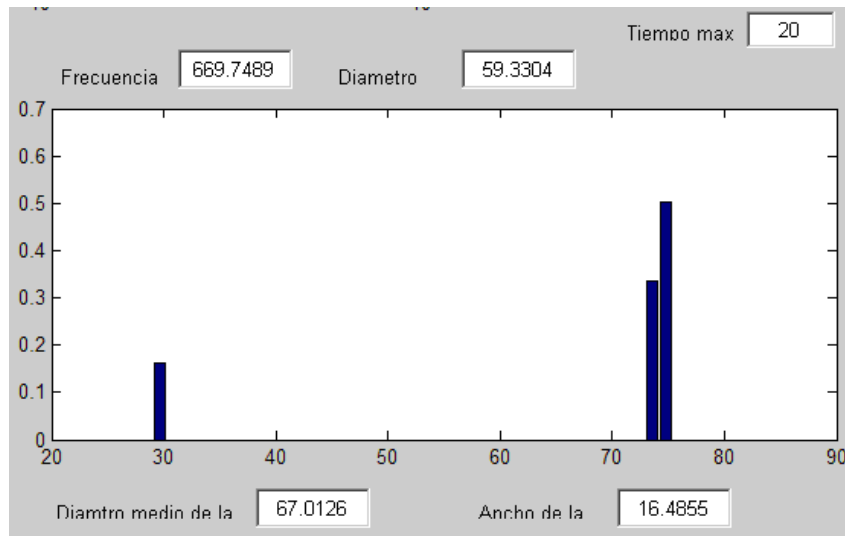


Figura 13b) Micrografía electrónica (TEM) para la solución  $10^{-4}$  M de PEG + AuNP

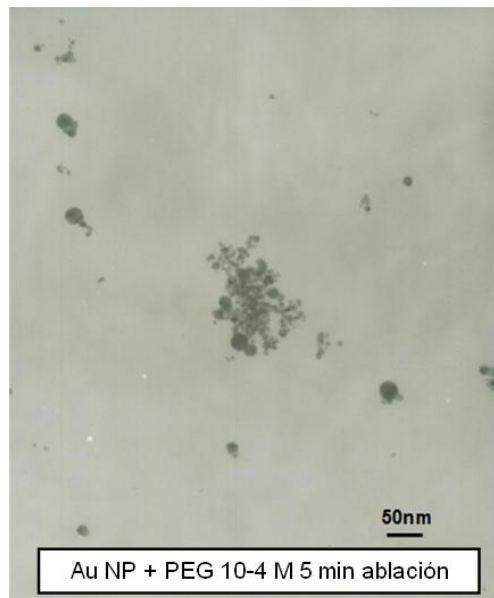


Figura 14: 14a) Frecuencia de AuNP en función del diámetro hidrodinámico para la solución  $10^{-5}$  M de PEG.

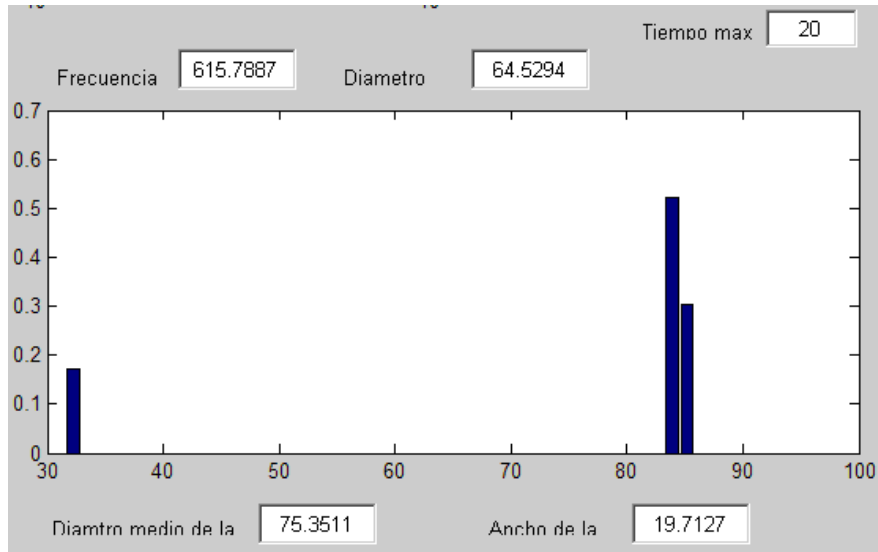


Figura 14b) Micrografía electrónica (TEM) para la solución  $10^{-5}$  M de PEG + AuNP

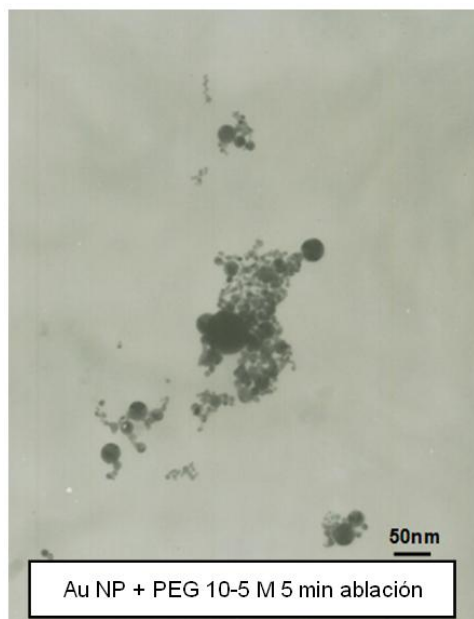
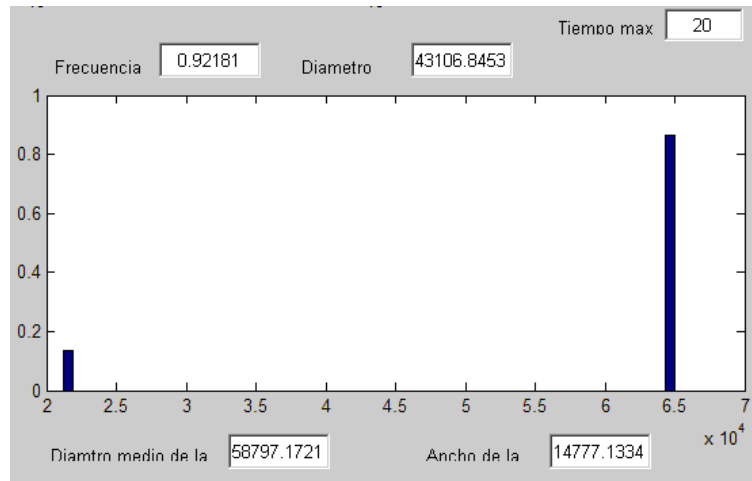


Figura 15. Frecuencia de AuNP en función del diámetro hidrodinámico para la solución  $10^{-6}$  M de PEG.



Hay que reportar que se presenta un error en el montaje experimental del equipo de Dispersión Dinámica de Luz (DLS), obteniéndose en éste no sólo el haz de luz dispersado sino también otros procedentes directamente de la fuente de emisión. En este caso se obtiene una señal el doble de la magnitud esperada por lo que los diámetros hidrodinámicos estimados deben ser corregidos.

Dichos valores son presentados en la tabla siguiente:

Tabla 3. Comparación del diámetro hidrodinámico promedio con el diámetro promedio obtenido al TEM.

<b>Solución de PEG (M)</b>	<b>Diámetro hidrodinámico promedio (nm)</b>	<b>Diámetro promedio de partícula por TEM (nm)</b>
$10^{-2}$	72,07	13,23
$10^{-3}$	22,07	26,43
$10^{-4}$	16,84	14,05
$10^{-5}$	14,69	31,25

En la tabla 3 se observan los diámetros hidrodinámicos promedio de las concentraciones de  $10^{-2}$  M a  $10^{-5}$  M de PEG. Debemos mencionar que ambos métodos no son comparables entre sí. En primer lugar el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas no corresponde con el diámetro real de las mismas pues como ya se mencionó, el diámetro hidrodinámico corresponde al tamaño de la nanopartícula con una capa de solvatación. En segundo lugar el volumen

utilizado en la medición de DLS es mucho mayor que el utilizado en la rejilla para el TEM, el cual es una pequeña gota depositada sobre la superficie, por lo que desde el punto de vista estadístico el diámetro medido por la micrografía no es muestra significativa de la población total de AuNP.

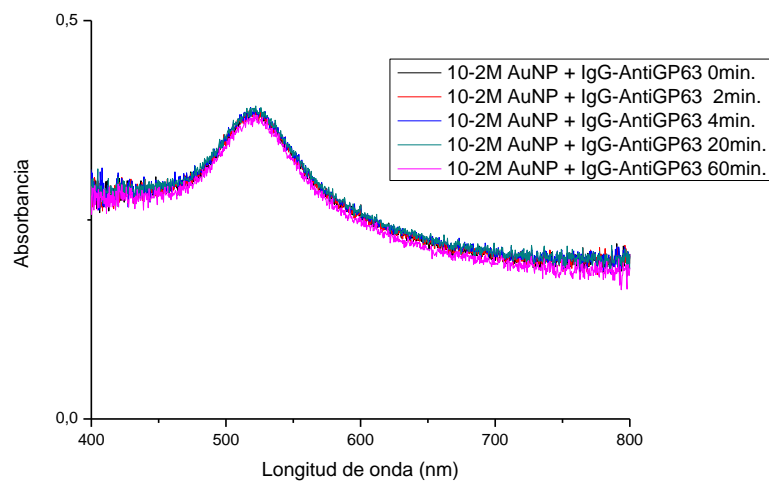
Hay que considerar que en todas las muestras se encuentra una población de nanopartículas con diámetros diferentes, esto puede deberse a que la energía del haz varía durante la síntesis por ablación con láser, otro fenómeno que puede influir en la diferencia observada entre los diámetros hidrodinámico y el obtenido al TEM es el apantallamiento producido por las nanopartículas en suspensión, impidiendo el paso del haz hacia la placa de oro, en este caso la energía incidente se ve disminuida causando que se obtengan AuNP de un diámetro menor.

En caso de la solución de  $10^{-6}$  M se obtuvo un error experimental durante la medición con el DLS, obteniéndose un valor demasiado elevado a los encontrados con respecto a los obtenidos en las otras soluciones por lo que no fue colocado en la tabla 2. Esto puede deberse a que el método de DLS detecta el diámetro hidrodinámico de cualquier partícula en suspensión, por lo que sí las muestras se encuentran contaminadas, ya sea por ejemplo, de partículas de polvo estas también serán detectadas por el equipo de DLS, generando en este caso resultados erróneos al presentarse como nanopartículas de mayor diámetro.

## 2. Unión del complejo nanopartícula-anticuerpo.

Se seleccionó la concentración de  $10^{-2}$  M de PEG para la unión AuNP por presentar una mayor cantidad de nanopartículas de oro de acuerdo a lo observado en los espectros de absorbancia de la figura 10. Para registrar la unión del anticuerpo sobre la superficie de las nanopartículas se midió la absorbancia en cada solución por 1 hora (figura 16). En este caso se debería observar una disminución significativa de la absorbancia después de que las proteínas se unen a la superficie de las nanopartículas (Chu y cols., 2006). A los datos obtenidos se le realizó la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, usando un nivel de significancia de 0.05, arrojando que no hay cambios significativos en la absorbancia durante el proceso de unión de los anticuerpos en ninguna de las soluciones.

Figura 16. Estudio de estabilidad de la interacción anticuerpo-AuNP en solución  $10^{-2}$ M PEG



### **3. Unión del complejo anti-gp63-AuNP a parásitos de *Leishmania major* en suspensión.**

Este primer ensayo consistió en unir el complejo anti-gp63-AuNP (3mL) del complejo a una suspensión de parásitos de *Leishmania major*. Por otra parte se agregó también unos 3mL del complejo al interior de un frasco de cultivo Falcon® con parásitos de *L. major* adheridos sobre su superficie cubierta con poli-lisina. En el ensayo se midió el espectro de absorbancia de la fase líquida para observar si ocurrió algún cambio espectroscópico en el complejo anti-gp63-AuNP.

Para todos los ensayos se midió el espectro de absorbancia de las AuNP antes de interactuar con el anticuerpo anti-gp63 y del complejo anti-gp63-AuNP, no encontrándose diferencias significativas entre ambos espectros. En segundo lugar se midió el espectro de absorbancia de la suspensión de *L. major*. En este caso se obtuvo un espectro de dispersión ya que las células en el líquido se comportan como partículas en suspensión (resultados no mostrados). Los datos obtenidos son mostrados en la figura 17 luego de ser normalizados utilizando el programa *Origins*.

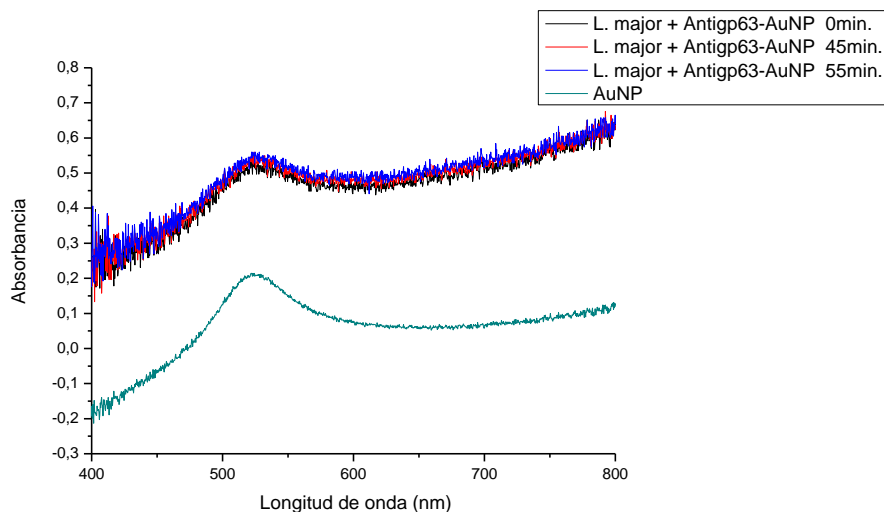


Figura 17. Interacción de promastigotes de *L. major* en suspensión y el complejo AuNP-PEG-anti-gp63.

En este caso se observa un cambio notable en los espectros de absorción de las AuNP funcionalizadas en la suspensión de parásitos, obteniéndose curvas que son una combinación del espectro de absorbancia de las AuNP con el espectro de dispersión de los parásitos. Los espectros de absorción del complejo anti-gp63-AuNP presentan una disminución notable en comparación con el espectro de absorción de las AuNP solas, la unión del biosensor a los parásitos es inmediata y no ocurren cambios en la actividad del complejo en el tiempo. Esto se evidencia al observar las curvas de 0; 45 y 55 min de reacción del complejo con los promastigotes de *L. major*. Para verificar esto último, se realizó un ANOVA de una vía y no se observaron diferencias significativas en los datos. Al realizarse la normalización de las curvas se observa que el espectro de absorción tiende a desplazarse hacia la derecha

indicando que el cambio de coloración debido a la agregación de las nanopartículas ocurre fuera del rango de la luz visible.

En la Fig. 18 se observa la unión del complejo anti-gp63-AuNP a promastigotes de *L. major* adheridos a la superficie de frascos de cultivos Falcon<sup>®</sup>, en este caso no se realizó una normalización a las curvas y se observa claramente la disminución del pico de absorción de las AuNP en los 521nm.

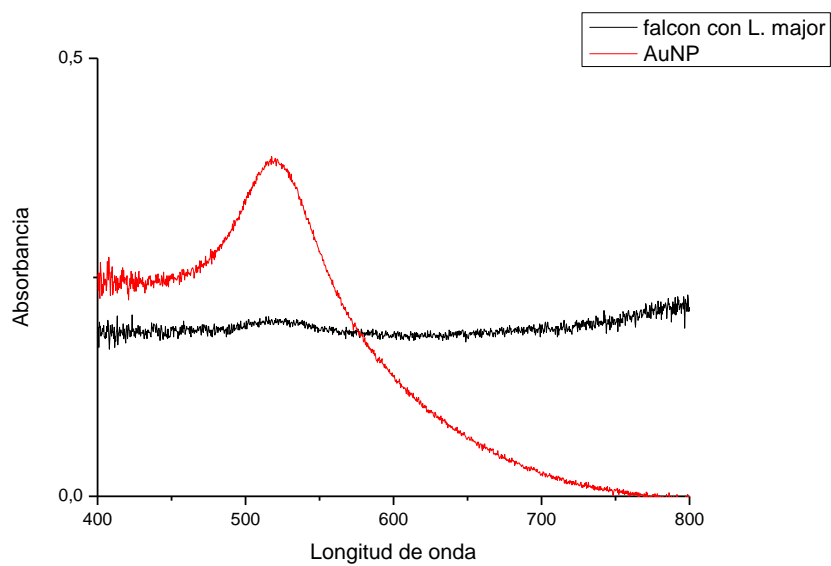


Figura 18. Interacción del complejo AuNP-PEG-anti-gp63 con promastigotes de *L. major* adheridos a la superficie interna de frascos de cultivo Falcon<sup>®</sup>.

#### 4. Unión del complejo a parásitos *Leishmania mexicana*

Se repitió el ensayo con parásitos adheridos a la superficie interna de frascos de cultivo Falcon<sup>®</sup> pero utilizando parásitos de la especie *Leishmania mexicana*. En este no se colocó el espectro de absorción de las AuNP debido a que se presentaron errores experimentales durante la medición, no obstante al medir la agregación de las nanopartículas en el tiempo se observó una disminución

significativa en el espectro de absorbancia del complejo anti-gp63-AuNP (Fig. 19). Esta disminución observada en el espectro de absorbancia se debe a la agregación de las nanopartículas sobre la superficie interna del frasco de cultivo Falcon® lo que interpretamos como una disminución del número de nanopartículas en suspensión por la unión del biosensor a la superficie de la membrana plasmática de *L. mexicana*.

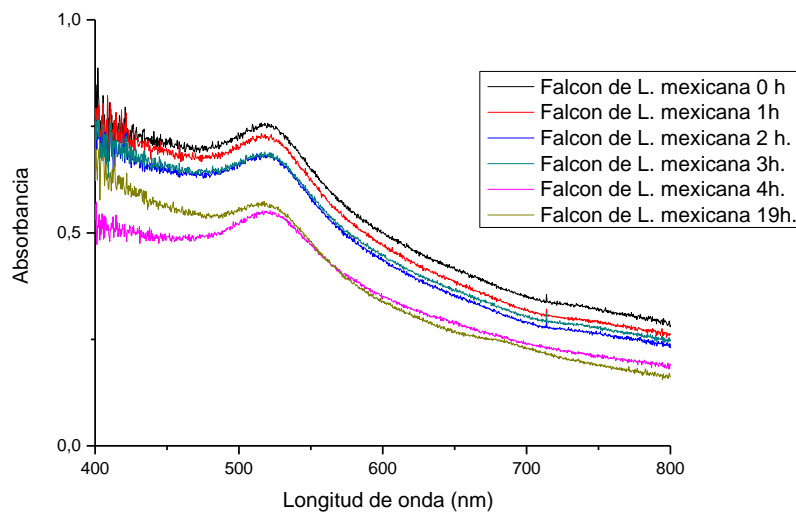


Figura 19. Interacción de promastigotes de *L. mexicana* adheridos a la superficie interna de frascos de cultivo Falcon® con el complejo anti-gp63-AuNP.

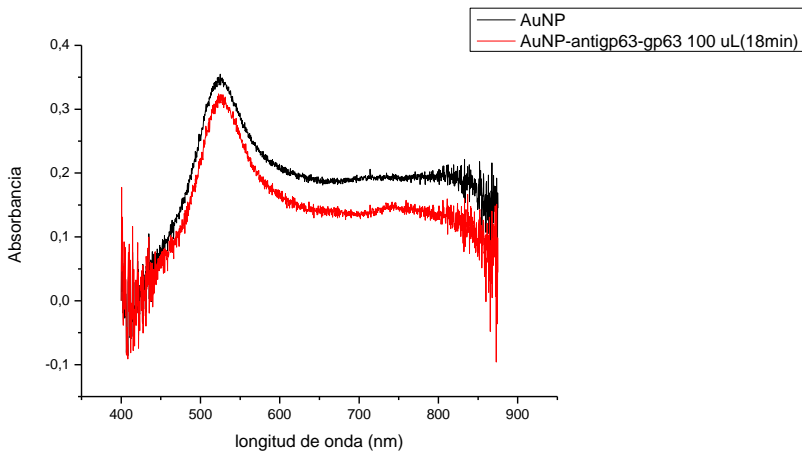
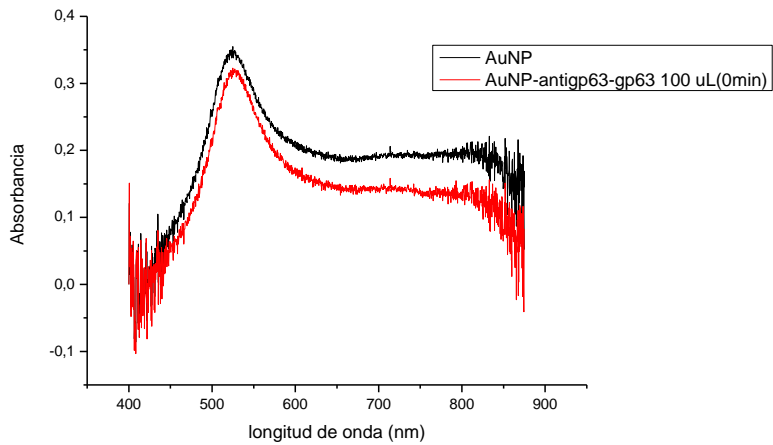
##### **5. Unión del complejo AuNP-PEG-anti-gp63 a un extracto de proteína gp63 extraída y purificada de la superficie de *Leishmania major*.**

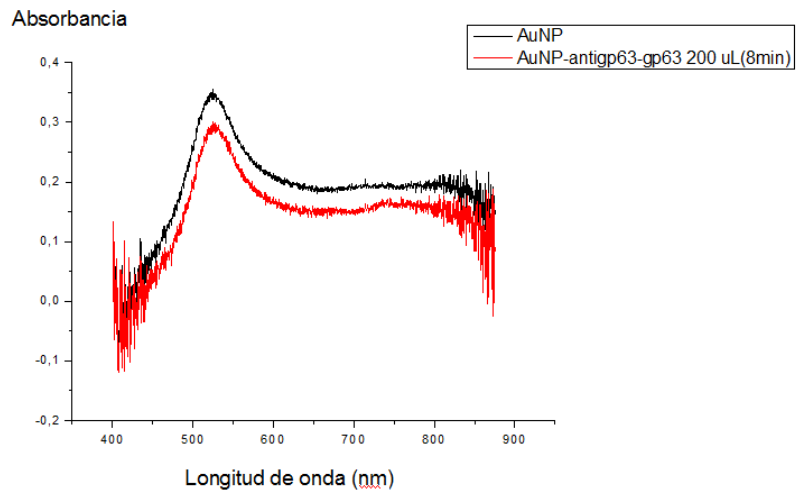
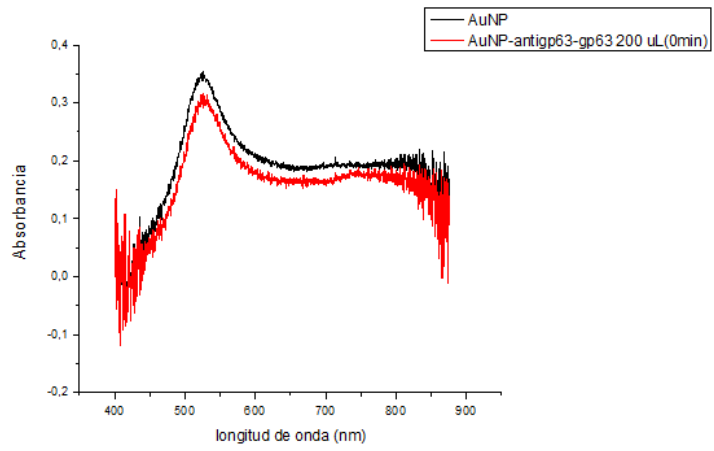
Los espectros de absorbancia fueron corregidos mediante cálculos matemáticos debido al aumento del volumen por la adición de cantidades

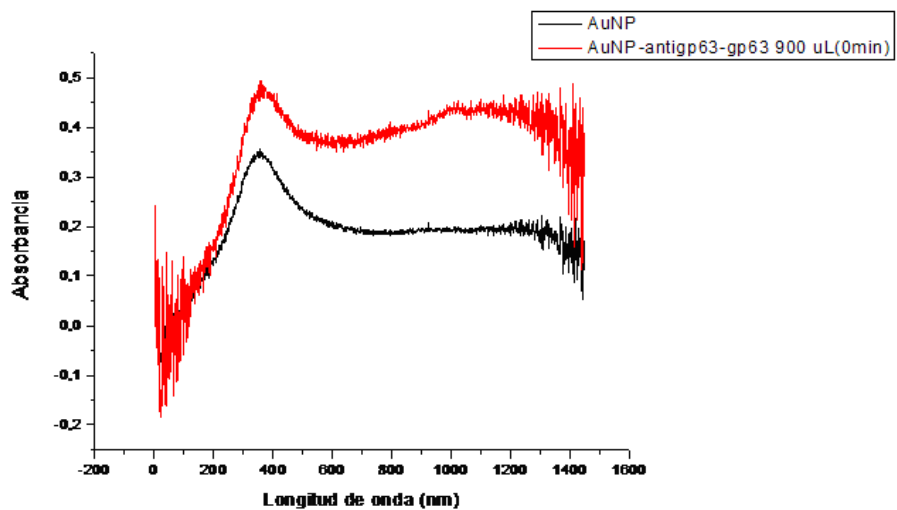
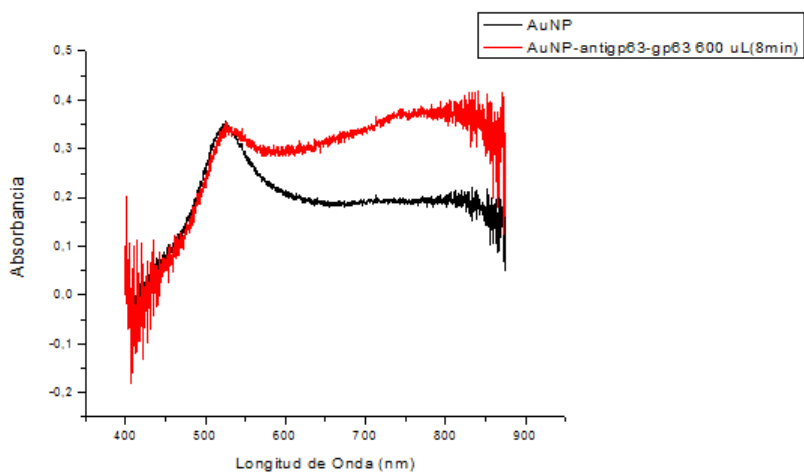
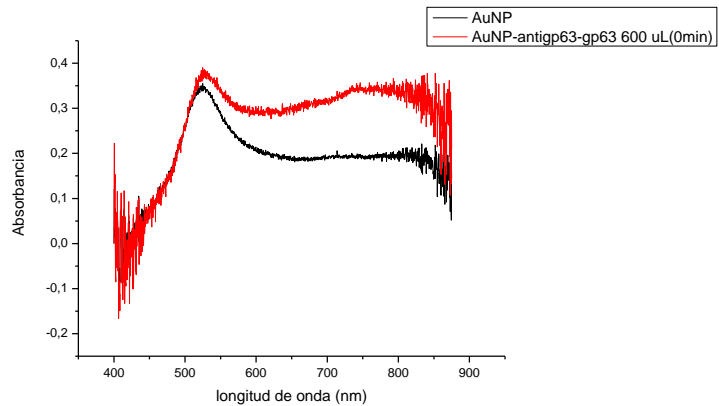
adicionales del extracto de gp63. Los datos obtenidos fueron normalizados para colocar las curvas a un mismo nivel para así comparar los resultados experimentales. En la Fig. 20 se presentan los espectros de absorbancia del extracto de gp63 y del complejo AuNP-PEG-anti-gp63 para diferentes volúmenes de extracto y tiempo de interacción con el complejo (100 $\mu$ L a 0 y 18 min; 200 $\mu$ L a 0 y 8 min; 600  $\mu$ L a 0 y 8 min y 900  $\mu$ L a 0 y 6 min), aquí se observa claramente una disminución del espectro de absorbancia de las AuNP unidas a la inmunoglobulina anti-gp63 en comparación con el espectro de absorbancia de las AuNP funcionalizadas en suspensión.

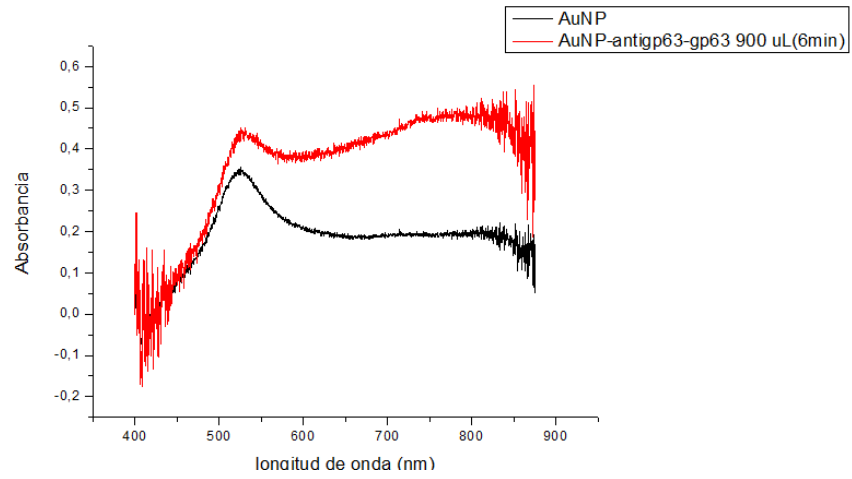
En las figuras siguientes se evidencia mucho mejor lo anteriormente observado en el ensayo con promastigotes de *L. major* en suspensión, sobre todo después de aplicar la prueba de ANOVA se observa que al transcurrir el tiempo en cada volumen añadido no hay cambios significativos en el espectro de absorbancia, pero si se evidencia un cambio en el espectro cuando se agregan nuevas cantidades de solución. Esto puede significar que la unión de las AuNP a la superficie de los parásitos es instantánea.

Figura 20. Espectros de absorbancia del extracto de gp63 y del complejo AuNP-PEG-anti-gp63 para diferentes volúmenes de extracto y tiempo de interacción con el complejo (100µL a 0 y 18 min; 200µL a 0 y 8 min; 600µL a 0 y 8 min y 900µL a 0 y 6 min)









## Discusión

En general, la síntesis por ablación por láser es una técnica sencilla y de fácil aplicación. Las consideraciones que en este caso hay que tener en cuenta para la síntesis de las nanopartículas metálicas son, en primer lugar, la naturaleza de los compuestos usados en la solución, el tiempo de ablación y la energía aplicada sobre la placa metálica. En nuestro caso para un volumen de 6 mL de PEG el tiempo máximo de irradiación que la solución puede soportar sin que ocurra evaporación del solvente es de 5 min., y para un volumen de 8 mL el tiempo de ablación máximo sin evaporación fue de 7 min. Si se desea continuar con la síntesis de nanopartículas lo más recomendable es dejar enfriar la solución al menos por unos 2 min., para luego continuar la síntesis.

Otros solventes ya han sido previamente usados en la técnica de ablación por láser, en este caso tenemos el SDS, el cual fue utilizado en ensayos de síntesis de nanopartículas de oro por Márquez (2009). El autor trabaja con tiempos de ablación que van desde 2 min., hasta 26 min., sin que se produzca pérdida del volumen de la solución por evaporación. Para realizar la síntesis de nanopartículas se recomienda en este caso una mezcla de solventes, preferiblemente una mezcla de PEG y/o Dextrano con albúmina de suero de Bovino según ha sido reportado (Montet y cols., 2006a). Estos autores reportan el uso de dextrano como agente funcionalizador y como emulsificante de las nanopartículas de óxido férrico. Del mismo modo, Hans y Lowman (2008) mencionan varios compuestos emulsificantes, entre ellos un derivado del PEG, el *amphiphile D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate vitamin E* o

TPGS. Estos agentes podrían conferir un mayor grado de estabilización de las nanopartículas en suspensión, asimismo la adición nuevos solutos tiende aumentar el punto de ebullición del líquido (Castellan, 2002) lo que permitiría aumentar el tiempo de ablación sobre la muestra evitando la pérdida de volumen, no obstante hay que determinar cuáles emulsificantes se utilizarán y las proporciones óptimas de trabajo.

El diámetro de las AuNP disminuye cuando se incrementa la concentración del surfactante o se incrementa la irradianza incidente sobre la placa de oro; no obstante, esto último ocurre sólo hasta un cierto valor límite de irradianza, ya que al aumentar el número de nanopartículas se satura la solución hasta el punto en que la cantidad de surfactante presente no es suficiente para evitar la segregación de las AuNP, formando agregados de nanopartículas con diámetros mayores (Márquez, 2009; Nash y cols., 2010).

En el caso de las soluciones de PEG, se esperaba que a mayor concentración de este compuesto, los diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas fuesen cada vez menores, tal como fue reportado para el SDS por Márquez (2009). Esto no ocurrió, por el contrario encontramos que los diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas fueron mayores para las mayores concentraciones de PEG. Este hecho lo atribuimos a las variaciones de la energía del haz utilizado para realizar la ablación.

La obtención de nanopartículas de diferentes diámetros en una solución particular, se debe, por un lado, a la segregación de algunas de estas durante las síntesis y, por otro lado, al apantallamiento generado por las AuNP en la

suspensión al momento de la irradiación del haz sobre la placa metálica. Esto provoca que el haz incida con una menor energía y que se desprendan nanopartículas con un diámetro menor.

La razón por la cual no se puede trabajar en un tiempo mayor de 5 min., para un volumen de 6 a 7 mL en las soluciones de PEG es que este compuesto contiene un gran número de grupos alcoholes los cuales son altamente volátiles, por esto se recomienda una mezcla de solutos preferiblemente el PEG y el BSA los cuales ya han mostrado su efectividad como agentes emulsificantes. Un problema similar se presenta con el etanol, el cual también es usado como emulsificante de nanopartículas y, al ser un compuesto altamente volátil, se calienta rápidamente durante la síntesis por ablación con láser, evaporándose y perdiendo volumen durante el proceso de síntesis.

En todos los experimentos se evidenció la unión del arreglo anti-gp63-AuNP tanto en los promastigotes adheridos a la superficie interna de frascos de cultivo Falcon<sup>®</sup> como a la proteína gp63 y a los promastigotes en suspensión. Estos ensayos fueron diseñados aprovechando los cambios espectroscópicos que se dan por la agregación de las nanopartículas metálicas (West, 2009; Yonzon y cols., 2005; Sanvicens y Marco, 2010) para medir la funcionalidad del complejo anti-gp63-AuNP como biosensor. En general se observó en todos los ensayos cambios en los espectros de absorbancia por la unión de las AuNP a la proteína gp63. En todos los ensayos ocurrió una disminución del espectro de absorbancia de las AuNP, sobre todo en el ensayo utilizando *L. major* en suspensión y en el ensayo de unión con el extracto puro de gp63, donde ocurre

un desplazamiento del pico de absorbancia en los espectros normalizados de los 520 nm a una longitud de onda por encima de los 800nm.

Los cambios espectroscópicos debidos a la agregación de las nanopartículas metálicas ya han sido previamente reportados en la bibliografía, Anker y cols. (2008) hacen mención al desarrollo de métodos de detección de bioseñales con la utilización de nanosensores plasmónicos. Los autores trabajan en este caso con los espectros de extinción de nanopartículas de oro y plata, definiendo la extinción como la capacidad de opacar o extinguir una determinada longitud de onda. Los autores reportan cambios en los espectros de extinción de AuNP en estudios de hibridación de ADN, la unión de los arreglos ADN-AuNP genera el corrimiento del pico de extinción desde los 575nm a los 600nm. Los autores también mencionan que existe relación entre la forma geométrica de las nanopartículas y sus propiedades espectrales, se observan picos máximos de extinción en nanodiscos entre 426nm y 497nm y en nanoprismas entre 565nm y 782nm.

Yonzon y cols. (2005) observan el corrimiento de los picos en los espectros de extinción en ensayos experimentales con AuNP funcionalizadas. Sanvincens y Marco (2010) reportan que los cambios espectrales por la agregación de las AuNP se usan en el desarrollo de métodos de detección clínico. Kaittanis y cols. (2010) reportan el desarrollo de nanotecnología aplicada para la detección de organismos microbianos, uno de los métodos que nombran los autores son los cambios espectrales por la agregación de las nanopartículas metálicas y que este método puede usarse para la detección directa de células

en suspensión, de virus o moléculas provenientes de los microorganismos. Por último nombramos los trabajos de Chuang y cols. (2010) en donde se usa el cambio colorimétrico de la segregación de las AuNP para observar la actividad de enzimas proteasas en un zimograma.

En general la agregación de las nanopartículas metálicas genera un cambio en la forma geométrica de éstas. Al obtenerse una forma tridimensional diferente se produce un cambio en el ángulo de incidencia del haz de luz sobre la banda de conducción del metal haciendo que un haz de luz distinto sea refractado causando el cambio colorimétrico debido a la agregación de las AuNP (Skottrup y cols., 2008; West, 2009; Nash y cols., 2010). Esto es de interés para este proyecto de investigación, dado que el objetivo es aprovechar estas propiedades espectrales para el desarrollo de un bioensayo para la detección temprana de enfermedades parasitarias tropicales. En este estudio se ha verificado la capacidad de las AuNP funcionalizadas de unirse a parásitos fijados y en suspensión, también se ha observado su capacidad de enlazarse a antígenos en solución, como es el caso de la proteína gp63 de *Leishmania major*. Tomando esto en cuenta para el diseño de bioensayo en campo, observaríamos una decoloración de la suspensión de nanopartículas en presencia de parásitos en el paciente. La ventaja de este bioensayo es que no se necesita obligatoriamente la presencia de parásitos en la muestra problema, dado a que el arreglo del biosensor se une a los antígenos de superficie provenientes del parásito, como el caso de la proteína gp63 aislada de *Leishmania major*, formando grandes agregados, lo que genera una respuesta

apreciable en la magnitud del cambio espectroscópico. La unión de un par de nanopartículas genera solo un ligero corrimiento del espectro (Yonzon y cols., 2005; Anker y cols., 2008, Nash y cols., 2010), en nuestro caso el desplazamiento va del espectro visible hacia el infrarrojo, esto nos indica que el tipo de arreglo se conforma por la unión de dos o más nanopartículas a un parásito y/o una proteína gp63 además de que un biosensor se une a dos o más antígenos formando un gran conglomerado (Fig. 21).

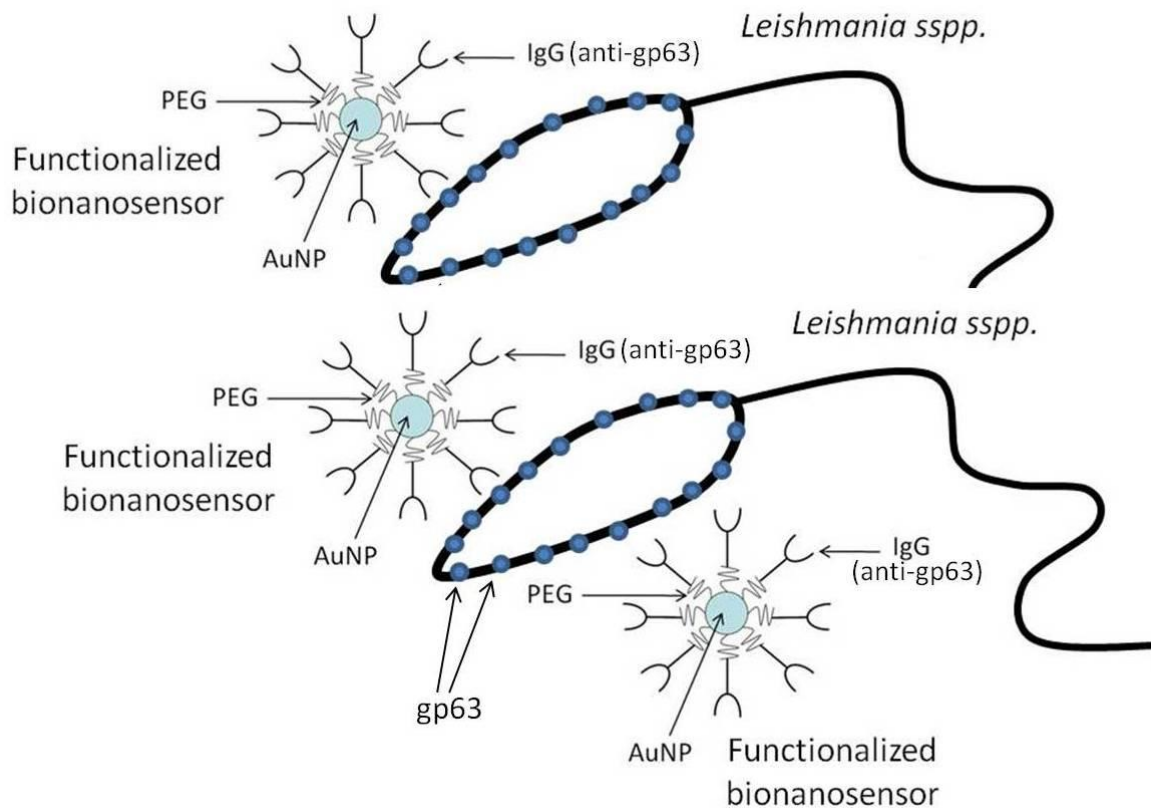


Figura 21. Representación de la unión de la nanopartícula funcionalizada al parásito o al antígeno de interés.

En nuestro caso es de interés determinar el número de AuNP que se unen a cada molécula de gp63 así como el tipo de interacción que se presenta entre el anticuerpo y la superficie de las nanopartículas. Se menciona que la unión entre las biomoléculas y la superficie de las nanopartículas puede darse por enlaces covalentes, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals (Rusmini y cols., 2007; Skottrup y cols., 2009) siendo los enlaces covalentes los de mayor fuerza de unión entre la biomolécula y la superficie funcionalizada. Torrance y cols. (2006) y Ros y cols. (1998) trabajan con el anticuerpo scFv uniéndolo a un residuo de cisteína para formar un enlace covalente entre el grupo thiol (R-SH) y la superficie de la AuNP. Por otra parte, Suprun y cols. (2010) diseñan un biosensor electroquímico para la mioglobina, aquí los autores utilizan un anticuerpo anti-mioglobina cardíaca humana (anti-HMb) unido covalentemente a AuNP usando didodecildimetilamonio bromida (DDAB) como funcionalizador y estabilizante de la superficie de las nanopartículas.

En el caso del anticuerpo anti-gp63 es una inmunoglobulina G (IgG), se desconoce el tipo de interacción que une al anticuerpo a la nanopartícula pero considerando la conformación espacial de la molécula la unión se daría por el extremo C-terminal de la proteína (Fig. 22), esto está reportado en el trabajo de Rusmini y cols. (2009) en donde los autores brindan una tabla informativa de los aminoácidos y de los grupos funcionales que forman los enlaces covalentes de las proteínas con las superficies funcionalizadas (Fig. 23).

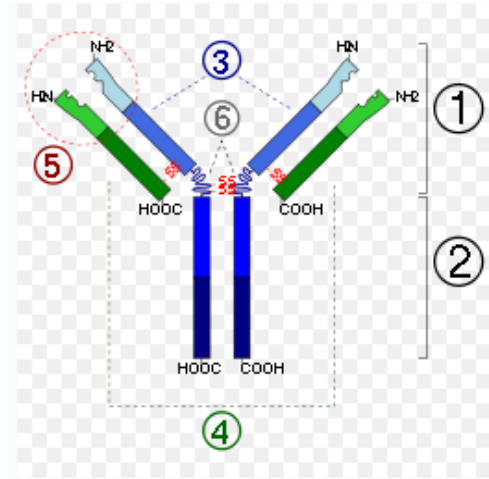


Figura 22. Representación esquemática de una inmunoglobulina G (IgG) mostrando las cadenas ligeras (claras) y pesadas (oscuras), los extremos N y C-Terminales y las regiones hipervariables en las cuales se enlaza el antígeno (encerradas en círculo discontinuo).

side groups	amino acids	surfaces
-NH <sub>2</sub>	Lys, hydroxyl-Lys	carboxylic acid active ester (NHS) epoxy aldehyde
-SH	Cys	maleimide pyridyl disulfide vinyl sulfone
-COOH	Asp, Glu	amine
-OH	Ser, Thr	epoxy

Figura 23. Grupos funcionales más comúnmente disponibles en las proteínas y los requerimientos funcionales de las superficies a utilizar como soporte.

Otra cosa que habría que determinar es el rango óptimo de detección del biosensor, en este caso se utilizaría el índice medio de inhibición (IC<sub>50</sub>), que es la medida en donde un compuesto alcanza la mitad de la inhibición (Florez y

cols., 2003). El  $IC_{50}$  es usado en farmacología como un criterio para evaluar la actividad de las drogas, este índice es usado por Montet y cols. (2006) para evaluar la actividad de un biosensor consistente en nanopartículas de óxido férrico funcionalizadas con un péptido cíclico de arginina-lisina-ácido aspártico (RGD) el cual presenta afinidad por integrinas expresadas en la superficie de células tumorales de ratón ( células BT-20).

A nivel general los resultados obtenidos muestran que efectivamente las nanopartículas funcionalizadas pueden ser consideradas como biosensores ópticos, ya que son capaces de interactuar tanto con biomoléculas en suspensión como con parásitos vivos inmovilizados o en suspensión. En la literatura encontramos que el desarrollo de biosensores es un campo en intenso desarrollo con importantes aplicaciones en la medicina y las ciencias biológicas. Esto último se evidencia en el desarrollo de sensores bioquímicos (Ansari y cols., 2008; Boozer y cols., 2006; Pingarron, 2008; Singh y cols., 2008), en su uso como sistemas de transporte de drogas (Hans y Lowman, 2008; Montet y cols., 2008; Wolfbeis, 2008; Sanvincens y cols., 2010), como nuevo método de diagnóstico clínico (Torrance y cols., 2006; Nagel y cols., 2008; Wolbeis, 2008; Suprun y cols., 2010; Sanvincens y cols., 2010), en su uso como nanosensores genéticos (Pingaron y cols., 2008; Daniel y Astruc, 2004; Wolbeis, 2008; Wang y cols., 2010), y en nuestro caso como un bioensayo para la detección de parásitos del género *Leishmania*.

## CONCLUSIONES

1. La síntesis de nanopartículas por ablación con láser es método sencillo, simple y práctico, las principales variables a tomar en cuenta son el tipo de solvente, el emulsificante usado, la energía del haz y el tiempo de ablación.
2. Al realizar la síntesis de las nanopartículas se debe trabajar con un haz que se mantenga estable en el tiempo para que la energía del láser no fluctúe y se obtengan resultados reproducibles.
3. Los solventes SDS y PEG actúan como buenos estabilizantes de las nanopartículas en suspensión. La concentración óptima de trabajo para la síntesis de AuNP en PEG es de  $10^{-2}$ M con el tiempo máximo de ablación para un volumen de 6 mL de 5 min. y para un volumen de 8mL de 7 min., después de este tiempo se observa pérdida del volumen de la solución por evaporación.
4. Si se aumenta el volumen del solvente se observa un aumento del tiempo de ablación. Se recomienda también realizar la síntesis de AuNP en una mezcla de surfactantes en agua, tales como PEG con albúmina de suero de bovino o con PEG/dextrano para aumentar el tiempo de ablación y evitar las pérdidas de volumen durante la síntesis.

5. El PEG actúa como emulsificante y como funcionalizador de la superficie de las AuNP. De esta forma las nanopartículas se mantienen en suspensión y no forman grandes conglomerados, además de registrarse una positiva interacción del biosensor a la proteína gp63 en solución y a los promastigotes de *L. major* y *L mexicana*.
6. El reconocimiento del biosensor anti-gp63-AuNP fue positivo en todos los ensayos experimentales resultando en un cambio espectroscópico desde los 520nm, longitud de onda de absorción de las AUNP, a un pico de absorción por encima de 800nm, banda del espectro infrarrojo, indicando que la agregación ocurre por la unión de más de una nanopartícula a la proteína gp63 y por el enlace de una nanopartícula a más de una proteína. Este mismo comportamiento fue observado durante la unión del biosensor a los parásitos en suspensión.
7. El enlazamiento del biosensor a la proteína gp63 aislada y a los promastigotes de *Leishmania sspp* es instantánea y no sufre grandes cambios en el tiempo.
8. Sería conveniente la realización de un estudio sobre la naturaleza del tipo de interacción que une al anticuerpo anti-gp63 a la superficie de la AuNP.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. Walter, P. 2002. The Cell. Página 485. Cuarta Edición. Garland Science. Taylor & Francis Group. New York. USA.
2. Anker J, Jeffrey N, Paige W, Lyandres O, Shah N, Zhao J, Van Duyne R. 2008. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat. Mater.* **7**:442-453. <http://www.nature.com/nmat/journal/v7/n6/abs/nmat2162.html>.  
doi:10.1038/nmat2162
3. Ansari, S., Asanri, Z., Wahab, R., Kim, Y., Khang, G., Shin, H. 2008. Glucose sensor based on nano-baskets of tin oxide template in porous alumina by plasma enhanced CVD. *Biosens. and Bioelectr.* **23**: 1838-1842.
4. Amato, V., Tuon, F., Bacha, H., Neto, V., Nicodemo A. 2008. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Act. Tropic.* **105**: 1-9.
5. Boozer, C., Kim, G., Cong, S., Guan, H., Londergan, T. 2006. Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput

- format: a review of new surface plasmon resonance technologies. *Curr. Opin. in Biotech.* **17**: 400-405.
6. Castellan, G. 1987. Fisicoquímica. Segunda Edición. Adison Wesley Longman S.A. Mexico.
  7. Chaudhuri, G., Chang, KP. 1988. Acid protease activity of amjor surface membrane glycoprotein (gp63) from Leishmania mexicana promastigotes. *Mol. Biochemis. Parasitol.* **27(1)**: 43-52.
  8. Chavane, N., Jacquemart, R., Hoemann, C., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G. 2008. At-line quatification of antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Analitic. Biochemis.* **378**: 158-165.
  9. Chikate, R., Jun, K., Rode, C. 2008. Nonaqueous synthesis and characterization of capped  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles from iron (III) hydroxyl-oleate precursor. *Polyhedron.* **27**: 933-938.
  10. Chu, X., Fu, X., Chen, K., Shen, G., Yu, R. 2005. An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Biosens. and Bioelectr.* **20**:1805–1812.
  11. Chuang, Y., Li, J., Chen, Sz., Liu, T., Kuo, Ch., Huang, W., Lin, Ch. 2010. An optical biosensing platform for proteinase activity using gold nanoparticles. *Biomat.* **31(23)**: 6087-6095.

12. Cui, R., Huang, H., Yin, Zh., Gao, D., Zhu, J. 2008. Horseradish peroxidase-functionalized gold nanoparticle label for amplified immunoanalysis based on gold nanoparticles/carbon nanotubes hybrids modified biosensor. *Biosens. and Bioelectr.* **23**: 1666-1673.
13. Dai, Zh., Bai, H., Hong, M., Zhu, Y.; Bao, J., Shen, J. 2008. A novel nitrite biosensor based on the direct electron transfer of hemeoglobin immobilized on CdS hollow nanospheres. *Biosens. and Bioelectr.* **23**: 1869-1873.
14. Daniel M., Astruc D. 2004. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **104**: 293-346.
15. Florez, J., Armijo, J. A., Media Villa, A. 2003. Farmacología Humana. Cuarta Edición. Editorial Massun S.A. Barcelona. España
16. Gupta, B., Levchenko, T., Torchilin, V. 2005. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating and peptides. *Advan. Drug Del. Rev.* **57**: 639-651.
17. Gupta, Sh., Raychaudhury, B., Datta, S. 2009. Host peroxisomal properties are not restored to normal after treatment of visceral

- leishmaniasis with sodium antimony gluconate *Exp. Parasitol.* **123**: 140-145.
18. Gupta, Sh., Raychadhuri, B., Banerjee, S., Das, B., Mukhopadhaya, S., Datta, S. 2010. Momordicatin purified from fruits of *Mormodica charantia* is effective to act as a potent antileishmania agent. *Parasitol. Internal.* **59**: 192-107.
19. Hans, M., Lowman, A.M. Nanoparticles for Drug Delivery. In: Handbook of Nanoscience, Engineering, and Technology. Edited by: William Goddard III; Donald Brenner; Sergey Lyshevski; Gerald Iafrate. 2006. CRC Press Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton – Londres – New York.
20. Herwaldt, B. 1999. Miltefosine the long-awaited therapy for visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* **341**: 1840-1842.
21. Jaffe, Ch., Rachamim, N. 1989. Amastigote stage-specific monoclonal antibodies against *Leishmania major*. *Infect. and Immun.* **12(57)**: 3770-3777.
22. Kim, J., Kim, I., Park, K., Lee, S., Yun, H., Hyun, K., Gon, H., y colaboradores. 2008. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparicles in tumor-bearing mice. *J. Con. Rel.* **127**: 41-49.

23. Katre, N., Asherman, J., Schaefer, H., Hora, M. 1998. Multivesicular liposome (DepoFoam) technology for the sustained delivery of insulin-like growth factor-I (IGF-I). *J. Pharm. Sci.* **87**(11), 1341-1346.
24. Kreiger, J. 1991. Parasitic Protozoa. Segunda Edición. Academic Press. San Diego. Vol. 4. Páginas: 1-35.
25. Kaittanis, Ch., Santra, S., Perez, J. M. 2010. Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis. *Adv. Drug Del. Rev.* **62**: 408-423.
26. Leifo, K., Cohen-Freue, G., Dogra, N., Murray, A., McMaster, W. 1989. Genomic and proteomic expression analysis of leishmania promastigotes and amastigote life stages; The Leishmania genome is constitutively expressed. *Mol. Biochem. Parasitol.* **152**: 35-46.
27. Márquez, I. 2009. Estudio de la transferencia de energía entre nanopartículas de oro generadas por ablación por láser y moléculas fluoróforas. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
28. Maruyama, K., Takahashi, N., Tagawa, T., Nagaike, K., Iwatsuru, M. 1997. Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol-coupled Fab' fragment

- show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors in vivo. *FEBS Letters*. **413(1)**: 177-180.
29. Matmurray, H., Berman, J., Davies, C., Saravia, N. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. **366**: 1561-1577.
30. McGwire B., Kulkarni, M. 2010. Interaction of antimicrobial peptides with Leishmania and Trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Exp. Parasitol.* **126(3)**: 397-405.
31. Mitropoulos, P., Konidas, P., Durkin-Konidas, M. 2010. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *J.A.A.D.* **63(2)**: 309-322.
32. Montet, X., Funovics, K., Montet-About, K., Reynolds, F., Weissleder, R., Josephson, L. 2006a. Nanoparticle Imaging on Tumor Cells. *Neoplasia*. **8(3)**: 214-222.
33. Montet, X., Funovics, K., Montet-About, K.; Weissleder, R.; and Josephson, L. 2006b. Multivalent Effects of RGD Peptides Obtained by Nanoparticles Display. *J. Med. Chem.* **49**: 6087-6093.
34. Muskus, C. E., Marin, V. M. 2002. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica* **22(2)**: 167-177.

35. Mutiso, J., Macharia, J., Gicheru, M. 2010. A review of for *Leishmania* vaccine candidate. *J. Biomed. Res.* **24 (1)**: 16-25.
36. Nagel, T., Gajovic-Eichelmann, N., Tobish, S., Schulte-Spechtel, U., Bier, F. 2008. Serodiagnosis of *Lyme borreliosis* infection using surface plasmon resonance. *Clin. Chim. Acta* **394**: 110-113.
37. Nash, S., Jana, S., Pradhan, M., Pal, T. 2010. Ligand-stabilized metal nanoparticles in organic solvent. *J. Colloid Interface Sci.*, **341**: 333-352.
38. Odaci D., Kahveci M., Sahkulubey E., Ozdemir C., Uyar T., Timur S., Yagci Y. 2010. *In situ* synthesis of biomolecule encapsulated gold-cross-linked poly(ethyleneglycol) nanocomposite as biosensing platform: A model study. *Bioelectrochemistry.* **79(2)**: 211-217.
39. Ortega, M. Obtención de Nanopartículas de oro y Caracterización empleando Métodos Ópticos. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Abril del 2007.
40. Pagnan, G., Montaldo, P., Pastorino, F., Raffaghello, L., Kirchmeier, M., Allen, M., Ponzoni, M. 1999. GD2-Mediated melanoma Cell targeting and Cytotoxicity of Liposomes-Entrapped Fenretinide. *Int. J. Cancer.* **81(2)**: 268-274.

41. Park, J. W., Hong, K., Carter, P., Asgari, H., Guo, L. Y., Keller, G. A., Wirth, C. y colaboradores. 1994. Development of anti-p185 HERR2 immunoliposomes for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 1327-1331.
42. Pastorino, F., Brignole, Ch., Marimpietri, D., Sapra, P., Moase, E., Ponzoni, M. 2003. Doxorubicin-loaded Fab' Fragments of Anti-disialoganglioside Immunoliposomes Selectives Inhibit the Growth and Dissemination of Human Neuroblastoma in Nude Mice. *Cancer Res.* **63**: 86-92.
43. Pingarron, J., Yañez-Sedeño, P., González-Cortés, A. 2008. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta* **53**: 5848-5866.
44. Ponzoni, M., Bocca, P., Chiesa, V., Decensi, A., Pistoia, V., Raffaghello, L., Rozzo, C., y colaboradores. 1995. Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis vs differentiation. *Cancer Res.* **55**: 853-861.
45. Rivero, R., Bello, M., Suárez, L., Cruz, C., Martínez, M., Palma, L. 1995. Introducción de un ultramicrométodo inmunocitoquímico para la

- cuantificación de subpoblaciones linfocitarias identificadas con anticuerpos monoclonales. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* **11**: 46-56.
46. Ros, R., Schwesinger, F., Anselmetti, D., Kubon, M., Schafer, R., Pluckthun A. Tiefenauer L. 1998. Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biophysics.* **95**: 7402–7405.
47. Rusmini F., Zhong Z., Feijen J. 2007. Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules.* **8**: 1775-1789
48. Sadick, M., Raff, H. 1985. Differences in expression and exposure of promastigote and amastigote membrane molecules in *Leishmania tropica*. *Infect. Immun.* **2 (47)**: 395-400.
49. Sanvincens, N., Marco, P. 2010. Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotech.* **8 (26)**: 425-433.
50. Singh M., Verma N., Garg A., Redhu, N. 2008. Urea biosensors. *Sensor Actuator B: Chem.* **134**: 345–351.

51. Skottrup, P., Nicolaisen, M., Fejer Justesen, A. 2008. Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. *Biosens. Bioelectron.* **24**: 339-348.
52. Sou, K., Inenaga, S., Takeoka, S., Tsuchida, E. 2008 Loading of curcumin into macrophages using lipid-based nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **352**: 287-293.
53. Suprun, E., Bulko, T., Lisitsa, A., Gnedenko, O., Ivanov, A., Shumyatseva, V., Archakov, A. 2010. Electrochemical nanobiosensor for express diagnosis of acute myocardial infarction in undiluted plasma. *Biosens. Bioelectron.* **25**: 1694-1698.
54. Torrance, L., Ziegler, A., Pittman, H., Paterson, M., Toth, R., Eggleston, I. 2006. Oriented immobilisation of engineered single-chain antibodies to develop biosensors for virus detection. *J. Virol. Meth.* **134**: 164–170.
55. Wang, J., Li, Sh., and Zhang, Y. 2010. A sensitive biosensor fabricated from gold nanoparticles, carbon nanotubes, and zinc oxide nanowires on a glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta* **55**: 4436-4440.
56. West, J., Drezek, R., Halas, N. 2009. Nanotechnology Provides New Tools for Biomedical Optics Págs 261-268 en: D.E. Reisner (eds). *Biotechnology*

Global Prospects. CRC Press Taylor & Francis Group. 1a edición. Boca Raton, FL. USA.

57. Wolfbeis, O. 2008. Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Anal. Chem.* **80**: 4269–4283.

58. Xu, L., Hunag, Ch., Tang, W., Rait, A., Yin, Y., Cruz, I., Xiang, L y colaboradores. 2002. Systemic Tumor-targeted gene delivery by Anti-transferrin Receptor scFv-Immuniliposomes. *Mol. Cancer Ther.* **1**: 337-346.

59. Yonzon, C., Stuart, D., Zhang, X., McFarland, A., Haynes, C., Van Duyne, R. 2005. Towards advanced chemical and biological nanosensors—An overview. *Talanta.* **67(3)**:438-448

60. Zorko, M., Langel, U. 2005. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **57**: 529-545.