



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

DISEÑO Y DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE
NANOVACUNA ORAL BASADA EN AuNPs Y EL
PÉPTIDO DE LptD

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

Ana Rosa Aguilera Juárez

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:41 horas del día 08 del Mes de Octubre del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" DISEÑO Y DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE NANOVACUNA ORAL BASADA EN AuNPs Y EL PÉPTIDO DE LptD "

Presentada por el alumno:

Ana Rosa Aguilera Juárez

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Agricultura Sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director



Dr. Luis Hernández Adame
Co-Director



Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Tutora



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Co-Director de Tesis

Dr. Luis Hernández Adame

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Co-Director de Tesis

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dr. Luis Hernández Adame

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

Jurado de Examen

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dr. Luis Hernández Adame

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

Suplente

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Resumen

La vacunología se apoya en ciencias emergentes, como la nanotecnología, para el desarrollo de vacunas innovadoras y eficaces dirigidas a la prevención de enfermedades. El estudio de la materia a nivel nanométrico ha permitido emplear nanopartículas con gran éxito en biomedicina, como el caso de las nanopartículas de oro (AuNPs). Sus excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño nanométrico, las convierten en potenciales candidatos para su uso como acarreadores de antígenos en la formulación de nanovacunas. Por otra parte, los pacientes reportados con enfermedades causadas por bacterias Gram negativas, como *Vibrio parahaemolyticus* son miles cada año. Este patógeno posee una proteína en su membrana externa llamada LptD, y dentro de ésta se encuentra un péptido que fue inmunogénico e inmunoprotector contra esta bacteria en modelo animal. Por lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo sintetizar AuNPs control (*cis@AuNP*) y AuNPs bioconjugadas con el péptido de LptD (*LptD@AuNP*) empleando dos métodos de síntesis: El Método I que consistió en la reducción de sales de oro empleando cisteína como agente estabilizador (*cis@AuNP*); y el Método II, realizando la reducción, estabilización del oro y la bioconjugación de las AuNPs con el péptido de LptD (*LptD@AuNP*) de manera simultánea, gracias a la afinidad reductora que algunos aminoácidos de la estructura peptídica presentan por metales como el oro. Ambos sistemas se sometieron a una caracterización fisicoquímica mediante las técnicas de Abs UV-Vis, DLS, SEM, HRTEM, XPS y FTIR. Las AuNPs de las soluciones *cis@AuNPs* presentaron forma esférica y buena distribución de tamaño cuya energía superficial positiva era inducida por los grupos amino de la cisteína e influenciada por el pH de la solución. Las AuNPs de las soluciones *LptD@AuNPs* fueron esféricas, estables y se comprobó la presencia del péptido de LptD anclado a sus superficies. Finalmente, las AuNPs obtenidas de ambos métodos no fueron citotóxicas a las concentraciones evaluadas en células de bazo de ratón. En conclusión, se desarrolló un prototipo de nanovacuna basada en nanopartículas de oro y aminoácidos reductores de un péptido inmunogénico de *V. parahaemolyticus* que demostraron ser estables y bioseguras en células de bazo de ratón. Como perspectiva se espera elucidar mecanismos involucrados en la respuesta inmune de las mucosas, valorar el potencial inmunoprotector contra la gastroenteritis y determinar el posible uso de estos sistemas como nanovacunas orales.

Palabras clave: nanovacunas, péptido, antígeno, inmunogénico, patógeno.

ORCID: 0000-0002-2776-9990



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director



Dr. Luis Hernández Adame
Co-Director

Summary

Vaccinology is supported by emerging sciences, such as nanotechnology, for the development of innovative and effective vaccines aimed at disease prevention. The study of matter at the nanometric level has allowed the use of nanoparticles with great success in biomedicine, as the case of gold nanoparticles (AuNPs). Their excellent physical, chemical, and biological properties, which are intrinsic of their nanometric size, make them potential candidates for use as antigen carriers in the formulation of nanovaccines. On the other hand, thousands of patients are reported every year with diseases caused by Gram-negative bacteria such as *Vibrio parahaemolyticus*. This pathogen has a protein in its outer membrane called LptD, and within it, there is a peptide that was immunogenic and immunoprotective against this bacterium in an animal model. Therefore, this work aimed to synthesize control AuNPs (*cis@AuNP*) and AuNPs bioconjugated with the LptD peptide (*LptD@AuNP*) using two synthesis methods: Method I which consisted in the reduction of gold salts using cysteine as a stabilizing agent (*cis@AuNP*); and Method II, performing the reduction, stabilization of gold and bioconjugation of AuNPs simultaneously with the LptD peptide (*LptD@AuNP*), thanks to the reducing affinity that some amino acids of the peptide structure have for noble metals like gold. Both systems were subjected to a physicochemical characterization using the Abs UV-Vis, DLS, SEM, HRTEM, XPS, and FTIR techniques. The AuNPs of the *cis@AuNPs* solutions presented a spherical shape and good size distribution whose positive surface energy was induced by the amino groups of cysteine and influenced by the pH of the solution. The AuNPs of the *LptD@AuNPs* solutions were spherical, stable and the integrity of the LptD peptide anchored to their surfaces was verified. Finally, the AuNPs obtained from both methods were not cytotoxic at the concentrations evaluated in mouse spleen cells. In conclusion, a nanovaccine prototype was developed based on gold nanoparticles and *V. parahaemolyticus* immunogenic peptide with reducing amino acids. As a perspective, it is expected to elucidate mechanisms involved in the mucosal immune response, assess the immunoprotective potential against gastroenteritis, and determine the possible use of these systems as oral nanovaccines.

Key words: nanoparticles, peptide, antigen, immunogenic, pathogen



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director



Dr. Luis Hernández Adame
Co-Director

Dedicatoria

*... En cualquier año de éstos
ya no van a volver
las golondrinas
ni aún las pertinaces
las del balcón
las tuyas*

*es lógico
están hartas
de tanto y tanto alarde
migratorio
de tanto y tanto cruce
sobre el mar y retórica
y pretextos
y alcores*

*su tiempo ya pasó
lo reconocen
y a mitad de su ida
o de su vuelta
oscuras
cursilíneas
tiernitas de alas largas
se dejarán caer
como buscando
cada una su ola
terminal.*

-Mario Benedetti

Luis:

*Gracias por haber llenado mi infancia de
recuerdos a los que me aferro
constantemente por la gran alegría que
me producen, haciéndome sentir que
todavía somos esos niños que pasan
corriendo frente al atrio para no llegar
tarde a la escuela.*

*Perdón por las palabras que no te dije,
los abrazos que no nos dimos y las
historias que ya no pudimos contar.*

*Con todo mi amor y admiración, para ti
hermano.*



Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número 922831.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., (CIBNOR), al Departamento de Física Aplicada y al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (LANNBIO) del Cinvestav-Mérida por las facilidades otorgadas para realizar la caracterización fisicoquímica y la síntesis de las nanopartículas presentadas en este trabajo.

A mi Comité Tutorial. Al Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez, al Dr. Luis Hernández Adame y a la Dra. Elizabeth Monreal Escalante por su paciencia, apoyo y guía durante mi formación académica estos dos años. Muchas gracias por los consejos y todo el conocimiento académico transmitido.

Al Dr. Miguel Ángel Ruíz Gómez, por asesorarme en la estancia de investigación para la realización de técnicas de caracterización. Gracias por los consejos, paciencia y apoyo para que yo pudiera comprender la información obtenida e interpretación de los resultados.

A los técnicos de Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos, Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales del CINVESTAV-Mérida por ayudarme en la síntesis, preparación y medición de las muestras. Asimismo, a la Dra. Martha Reyes Becerril por toda su guía y ayuda durante la realización de los bioensayos.

A mis compañeros de laboratorio y miembros del Grupo de Inmunología y Vacunología del CIBNOR: Vero, Norma, Dante, Miriam, Abel, Asdrúbal, Perla, Fernando, Karen, Kevyn, por la ayuda que me brindaron cada vez que los necesité; por sus consejos y sobre todo por la amistad que en este tiempo llegamos a formar.

A la Dra. Carmen Blázquez Moreno, por su amistad y apoyo constante.

A Luis Calleja, por ser parte de esta etapa de vida donde aprendimos juntos; por este cariño y amistad que nos llevamos para siempre. Te quiero mucho.

A mi familia, ya que cada uno de ellos es un motivo de inspiración y admiración que me impulsa diariamente a conquistar mis metas, hacer lo que me gusta y continuar en la búsqueda de la superación personal.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Nomenclatura/ Unidades (SI)	xii
Glosario	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Desarrollo de la vacunación	1
1.2 Empleo de la nanotecnología en formulación de vacunas	1
1.3 Nanopartículas de oro (AuNPs) y sus métodos de síntesis	2
1.4 Empleo de aminoácidos para la síntesis de AuNPs	3
1.5 Péptido de LptD	3
2. ANTECEDENTES	5
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. HIPÓTESIS	8
5. OBJETIVOS	9
5.1 Objetivo general	9
5.2 Objetivos específicos	9
6. MATERIALES Y MÉTODOS	10
6.1 Síntesis de Nanopartículas de Oro (AuNPs)	10
6.1.1 Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador (cis@AuNPs) 10	
6.1.2 Método II: Síntesis de AuNPs utilizando el péptido de la proteína LptD (LptD@AuNPs) como agente reductor y estabilizador.	12
6.2 Caracterización de AuNPs	13
6.2.1 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible	13
6.2.2 Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP_OES) 14	
6.2.3 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	14
6.2.4 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	15
6.2.5 Espectroscopía de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS)	15

6.2.6	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	15
6.2.7	Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)	16
6.2.8	Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM).....	16
6.3	Ensayos Biológicos.....	16
6.3.1	Preparación de tratamientos	16
6.3.2	Aislamiento de esplenocitos de ratón.....	17
6.3.3	Prueba de Viabilidad y Citotoxicidad celular	17
6.3.4	Análisis estadísticos	19
7.	RESULTADOS	20
7.1	Caracterización de AuNPs	20
7.1.1	Espectrofotometría Ultravioleta-Visible.....	20
7.1.1.1	<i>Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador (soluciones cis@AuNPs)</i>	20
7.1.1.2	<i>Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD (soluciones LptD@AuNPs)</i>	21
7.1.2	Espectrofotometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP_OES).....	22
7.1.3	Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	23
7.1.3.1	<i>Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador (soluciones cis@AuNPs)</i>	23
7.1.3.2	<i>Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD (soluciones LptD@AuNPs)</i>	25
7.1.4	Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	27
7.1.4.1	<i>Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador (soluciones cis@AuNPs)</i>	27
7.1.4.2	<i>Método II: Síntesis de AuNPs con el epítipo de LptD (soluciones LptD@AuNPs)</i>	28
7.1.5	Espectroscopía de Fotones Emitidos por Rayo X (XPS).....	29
7.1.5.1	<i>Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador (soluciones cis@AuNPs)</i>	29
7.1.5.2	<i>Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD (soluciones LptD@AuNPs)</i>	31
7.1.6	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	33
7.1.6.2	<i>Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD (soluciones LptD@AuNPs)</i>	35
7.1.7	Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)	35
7.1.7.2	<i>Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD</i>	36
7.1.8	Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM).....	38

7.1.8.2	Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD (soluciones LptD@AuNPs).....	39
7.2	Ensayos Biológicos.....	40
7.2.1	Prueba de Viabilidad y Citotoxicidad celular	40
8.	DISCUSIÓN	42
8.1	Síntesis de Nanopartículas de Oro (AuNPs).....	42
8.2	Caracterización de AuNPs	42
8.2.1	Espectrofotometría Ultravioleta-Visible	42
8.2.2	Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP_) OES	43
8.2.3	Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	44
8.2.4	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	46
8.2.5	Espectroscopía de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS).....	47
8.2.6	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	49
8.2.7	Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)	49
8.2.8	Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM).....	50
8.3	Ensayo Biológico	50
8.3.1	Prueba de viabilidad y citotoxicidad celular	50
9.	CONCLUSIONES	53
10.	LITERATURA CITADA	54
11.	ANEXOS	64
11.1	Anexo A. Cálculo de concentraciones y rendimientos reales de los sistemas <i>cis@AuNPs</i> y <i>LptD@AuNPs</i>	64
11.2	Anexo B. Comportamiento e interacción molecular de los sistemas <i>cis@AuNPs</i> y <i>LptD@AuNPs</i> en condiciones de acidez y basicidad.	71

Lista de figuras

- Figura 1.** Espectros de absorción UV-Vis obtenidos de las soluciones *cis@AuNPs*, empleando cisteína como agente estabilizador. Se observan longitudes de onda entre los 510 a 550 nm, que corresponden a plasmones de resonancia de nanopartículas de oro entre los 2 y 56 nm de diámetro. En la solución *cis@AuNPs-Seed* no se registró absorbancia correspondiente al plasmón, dado a que el tamaño de estas nanopartículas era muy pequeño (~2 nm). 20
- Figura 2.** Espectros de absorción obtenidos de las soluciones *LptD@AuNP(1:2)* (0.2:0.4 µg/µL; péptido: oro) y *LptD@AuNP(1:4)* (0.2:0.8 µg/µL; péptido: oro) sintetizadas con el antígeno de LptD como agente reductor y estabilizante. Las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro UV-Vis, utilizando celdas de cuarzo de 1 mm de paso óptico. El plasmón de cada solución se encuentra en longitudes de onda de entre 525 a 550 nm, característico de AuNPs de diámetro de 45 a 50 nm. 22
- Figura 3.** Variación del diámetro hidrodinámico de las AuNPs de las soluciones *cis@AuNPs-S6* y *cis@AuNPs-S5* a diferentes pHs. Las muestras se midieron en celdas de poliestireno. Los pHs fueron estabilizados con hidróxido de sodio (NaOH, 0.1 M) y ácido clorhídrico (HCl, 10 %). .. 24
- Figura 4.** Variación de la carga superficial de las AuNPs de las soluciones *cis@AuNP-S6* y *cis@AuNP-S5* a diferentes pHs. Este sistema empleó cisteína como agente estabilizante, la cual le dio a la nanopartícula la carga positiva. Las muestras se midieron en celdas de poliestireno. Los pHs fueron estabilizados con hidróxido de sodio (NaOH, 0.1 M) y ácido clorhídrico (HCl, 10 %). 25
- Figura 5.** Variación del diámetro hidrodinámico de las AuNPs de las soluciones *LptD@AuNP(1:2)* y *LptD@AuNP(1:4)* a diferentes pHs. Este sistema empleó el antígeno de LptD como agente estabilizante. Las muestras se midieron en celdas de poliestireno. Los pHs fueron estabilizados con hidróxido de sodio (NaOH, 0.1 M) y ácido clorhídrico (HCl, 10 %). 26
- Figura 6.** Variación de la carga superficial de las AuNPs de las soluciones *LptD@AuNP(1:2)* y *LptD@AuNP(1:4)* a diferentes pHs. Este sistema empleó el antígeno de LptD como agente estabilizante. Las muestras se midieron en celdas de poliestireno. Los pHs fueron estabilizados con hidróxido de sodio (NaOH, 0.1 M) y ácido clorhídrico (HCl, al 10 %). 27
- Figura 7.** Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de las soluciones *cis@AuNPs-S5* y *cis@AuNPs-S6*, sintetizadas con cisteína como agente estabilizador. El punto (a) corresponde a 2380 cm⁻¹, el punto (b) a 2950, punto (c) a 1600cm⁻¹, punto (d) a 1530 cm⁻¹ y punto (e) a 1390 cm⁻¹. 28
- Figura 8.** Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de las soluciones *LptD@AuNPs(1:2)* y *LptD@AuNPs(1:4)*, sintetizadas con el péptido de LptD como agente reductor y estabilizador. El punto (a) corresponde a 1321 cm⁻¹, el punto (b) a 1458, punto (c) a 1644cm⁻¹, punto (d) a 2895 cm⁻¹ y punto (e) a 3400 cm⁻¹. 29
- Figura 9** Espectros de alta resolución de XPS de los elementos presentes en la solución *cis@AuNPs-S5* sintetizada con cisteína como agente estabilizador. A) Espectro del elemento oro (Au). B) Espectro del elemento carbono (C). C) Espectro del elemento nitrógeno (N). D) Espectro del elemento oxígeno (O). 30
- Figura 10** Espectros de alta resolución de XPS de los elementos presentes en la solución *cis@AuNPs-S6* sintetizada con cisteína como agente estabilizador. A) Espectro del elemento oro (Au). B) Espectro del elemento carbono (C). C) Espectro del elemento nitrógeno (N). D) Espectro del elemento oxígeno (O). 31
- Figura 11** Espectros de alta resolución de XPS de los elementos presentes en la solución *LptD@AuNPs(1:2)* sintetizada con el péptido de LptD como agente reductor y estabilizador. A)

- Espectro del elemento oro (Au). B) Espectro del elemento carbono (C). C) Espectro del elemento nitrógeno (N). D) Espectro del elemento oxígeno (O)..... 32
- Figura 12** Espectros de alta resolución de XPS de los elementos presentes en la solución LptD@AuNPs(1:4) sintetizada con el péptido de LptD como agente reductor y estabilizador. A) Espectro del elemento oro (Au). B) Espectro del elemento carbono (C). C) Espectro del elemento nitrógeno (N). D) Espectro del elemento oxígeno (O)..... 33
- Figura 13.** Distribución de tamaño y micrografía SEM de las AuNPs obtenidas de la solución *cis@AuNPs-S5* mediante la síntesis con el Método I, empleando cisteína como agente estabilizador. **A)** Distribución de diámetro de las AuNPs de la solución *cis@AuNPs-S5*, donde se observa el valor máximo de la distribución en ~22 nm de diámetro. **B)** Micrografía SEM de la solución *cis@AuNPs-S5* a 100 000 x. Las muestras fueron deshidratadas para su medición sobre sustratos de aluminio..... 34
- Figura 14.** Distribución de tamaño y micrografía SEM de las AuNPs obtenidas de la solución *cis@AuNPs-S6* mediante la síntesis con el Método I, empleando cisteína como agente estabilizador. **A)** Distribución de diámetro de las AuNPs de la solución *cis@AuNPs-S6* donde se observa el valor máximo de la distribución en ~40 nm de diámetro. **B)** Micrografía SEM de la solución *cis@AuNPs-S6* a 100 000 x. Las muestras fueron deshidratadas sobre un sustrato de aluminio para ser medidas en el microscopio. 34
- Figura 15.** Micrografías SEM de las AuNPs obtenidas de las soluciones *LptD@AuNP(1:2)* y *LptD@AuNP(1:4)* mediante la síntesis con el Método II, empleando el antígeno de LptD como agente reductor y estabilizador. **A)** Micrografía SEM de la solución *LptD@AuNP(1:2)* (0.2:0.4 µg/µL; péptido:oro) a 50 000 x. **B)** Micrografía SEM de la solución *LptD@AuNP(1:4)* (0.2:0.8 µg/µL; péptido:oro) a 100 000 x. Las muestras fueron deshidratadas sobre un sustrato de aluminio para ser medidas en el microscopio. 35
- Figura 16.** Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) del sistema *cis@AuNPs*. Estas AuNPs fueron sintetizadas con el Método I, empleado cisteína como agente estabilizador 36
- Figura 17.** Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) del sistema *LptDAuNPs*. Estas AuNPs fueron sintetizadas con el Método II, empleado al antígeno de LptD como agente reductor y estabilizador. 37
- Figura 18.** Micrografías HRTEM de las AuNPs obtenidas de la solución *cis@AuNPs-S5* mediante la síntesis con el Método I, empleando cisteína como agente estabilizador. **A)** Micrografía de la solución *cis@AuNPs-S5* a 50 000 x **B)** Micrografía HRTEM de la solución *cis@AuNPs-S5* a 100 000 x. Las muestras se deshidrataron sobre una rejilla de cobre para ser medidas en el microscopio 38
- Figura 19.** Micrografías HRTEM de las AuNPs obtenidas de la solución *cis@AuNPs-S6* mediante la síntesis con el Método I, empleando cisteína como agente estabilizador. **A)** Micrografía HRTEM de la solución *cis@AuNPs-S6* a 50 000 x **B)** Micrografía HRTEM de la solución *cis@AuNPs-S6* a 100 000 x. Las muestras se deshidrataron sobre una rejilla de cobre para ser medidas en el microscopio..... 39
- Figura 20.** Micrografías HRTEM obtenidas de la solución *LptD@AuNPs* mediante la síntesis con el Método II, empleando el antígeno de LptD como agente reductor y estabilizador. **A)** Micrografía HRTEM de la solución *LptD@AuNPs(1:2)* a 50 000 x **B)** Micrografía HRTEM de la solución *LptD@AuNPs(1:4)* a 50 000 x. Las muestras se deshidrataron sobre una rejilla de cobre para ser medidas en el microscopio..... 40
- Figura 21** Gráfico de porcentaje de viabilidad celular a las 24 h. de exposición a los tratamientos HEPES (0.1 M) como control positivo y como control negativo se empleó DMSO;..... 41

Lista de tablas

Tabla I Péptidos que contienen tirosina empleados para la obtención de AuNPs	6
Tabla II. Reactivos empleados para la síntesis de AuNPs	10
Tabla III. Tratamientos sometidos a prueba de citotoxicidad.....	18
Tabla IV. Diámetros obtenidos de las soluciones cis@AuNPs, empleando cisteína como agente estabilizador.	21
Tabla V. Rendimiento real de los sistemas cis@AuNPs y LptD@AuNPs. El factor de dilución ya está considerado en los resultados y las concentraciones fueron calculadas según los pesos moleculares de los compuestos empleados en las soluciones precursoras, además de ser considerado el volumen añadido de cada solución.	23
Tabla VI Porcentajes elementales de EDS obtenidos del sistema cis@AuNPs.....	36
Tabla VII. Porcentajes elementales de EDS obtenidos del sistema LptD@AuNPs	37

Nomenclatura/ Unidades (SI)

Da= Dalton/ $1.660\ 538\ 921 \times 10^{-27}$ kg

eV= electrón Volt/ $1.602\ 177 \times 10^{-19}$ J

h= hora / 1h=3600 s

L= litro / 1L= $0.01\ \text{m}^3$

M=molar / 1M= $1\ \text{mol m}^{-3}$

mg L⁻¹= miligramos por litro / $1\ \text{mg L}^{-1} = 1 \times 10^{-3}\ \text{kg m}^{-3}$

mL= mililitro / $1\ \text{mL} = 1 \times 10^{-6}\ \text{m}^3$

mM=milimolar / $1\ \text{mM} = 1 \times 10^{-3}\ \text{mol m}^{-3}$

mV= milivoltio / $1\ \text{V} = \text{Joule.Coulomb} = 1\ \text{m}^2\text{kg s}^{-3}\ \text{A}^{-1}$

nm =nanómetro / $1\ \text{nm} = 1 \times 10^{-9}\ \text{m}$.

rpm= revoluciones por minuto / $1\ \text{rpm} = 0.104719755\ \text{rad s}^{-1}$

µg= microgramo / $1\ \mu\text{g} = 1 \times 10^{-9}\ \text{kg}$

µg g⁻¹= microgramos por gramo / $1\ \mu\text{g g}^{-1} = 1 \times 10^{-3}\ \text{g kg}^{-1}$

µL= microlitro / $1\ \mu\text{L} = 1 \times 10^{-9}\ \text{m}^3$

Glosario

Antígeno: Sustancia que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos (Abbas, 2015).

Inmunogénico: Inmunogenicidad, es la cualidad de inmunogénico, descrita como la capacidad de un medicamento a inducir una respuesta inmunitaria frente a él mismo. (Abbas, 2015; Kindt, Goldsby, Osborne, 2007).

Inmunoprotección: Inmunoproteger, capacidad de proteger el sistema inmunitario (Abbas, 2015; Kindt, Goldsby, Osborne, 2007).

Nanotecnología: Campo de la ciencia aplicada dedicado al estudio, diseño, síntesis, control y manipulación de la materia a una escala menor que un micrómetro (Nanogov, 2020).

Reacciones de oxidación-reducción (redox): Reacciones químicas en las que se transfieren electrones. La oxidación es la pérdida de electrones y la reducción es la ganancia de electrones. La oxidación y la reducción siempre ocurren juntas (<https://chem.libretexts.org> consultado 19 de junio de 2020).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Desarrollo de la vacunación

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente la vacunación es el método médico más efectivo para disminuir la mortalidad provocada por enfermedades infecciosas en el mundo. La “variolización” es la primera forma de vacunación conocida, se remonta a la antigua China en el siglo XI para posteriormente ser introducida a Europa por Lady Mary Wortley Montagu durante el año 1721 en Gran Bretaña. (Plotkin et al., 2014). Esta técnica primitiva consistía en inocular el pus obtenido de las pústulas que presentaban las personas enfermas de “variola” a personas sanas, con la finalidad de producir inmunidad contra la viruela a aquellos a quienes se les administraba. Sin embargo, no fue hasta el año 1796, cuando Edward Jenner crea concretamente la primera vacuna contra esta enfermedad inmunizando a un niño con la costra de viruela vacuna. Asimismo, en 1885, Louis Pasteur crea la vacuna contra la rabia a partir de la administración diaria durante dos semanas de fluidos y tejidos emulsificados obtenidos del cerebro de conejos que habían muerto por la enfermedad, a Joseph Meister, quien tenía 9 años. Por consiguiente, Pasteur demostró que se podían obtener defensas específicas contra una infección si se administraban formas debilitadas o atenuadas del microorganismo que produce la afección. No obstante, la vacunación ha ido evolucionando con el paso del tiempo, la administración de microorganismos muertos o atenuados, hoy se ve rebasada por el uso de formulaciones generadas con el empleo de subunidades de agentes infecciosos e incluso con su material genético, dando paso a las nuevas generaciones de vacunas (Delany et al., 2014). Estas innovadoras vacunas, conocidas como vacunas de segunda y tercera generación, han surgido de la introducción de ciencias como la nanotecnología al campo de la inmunología y vacunología, con la finalidad de obtener formulaciones que mantengan el equilibrio entre eficiencia y seguridad, además de generar tratamientos económicamente viables que se encuentren al alcance de los grupos más vulnerables de la población.

1.2 Empleo de la nanotecnología en formulación de vacunas

La nanotecnología es la ciencia dedicada al estudio de los materiales a escala nanométrica (fragmentos de materia, cuyas dimensiones comprenden desde los 0.1 nm hasta los 100 nm) (Poole & Owens, 2003). El empleo de nanopartículas (NPs) se ha popularizado durante las últimas décadas en varias ramas de la medicina (Salazar-González et al., 2015; Zhao et al., 2014)

ya que estas poseen propiedades antimicrobianas, de liberación de algún fármaco específico, así como su transporte y como inmunoestimulante (Kim et al., 2014). En el caso particular de las vacunas, las nanopartículas son utilizadas principalmente porque pueden ser sintetizadas en varias formas, tamaños y con diferentes superficies, haciendo posible el transporte y liberación de antígenos usándolas como acarreadores, además de que su administración ha demostrado potenciar la respuesta inmune (López- Téllez et al., 2013; Al-Qadi et al., 2018). Características como tamaño, forma, carga superficial y naturaleza química del elemento de la nanopartícula son aspectos para considerar cuando se requiere emplear NPs en sistemas biológicos (Daniel & Astruc, 2004). Atendiendo a su naturaleza química, las NPs se clasifican en orgánicas e inorgánicas (Zhao et al., 2014), siendo en esta última categoría donde encontramos las nanopartículas metálicas como las nanopartículas de oro (AuNPs) (Daniel & Astruc, 2004; Lu et al., 2007; Zanella, 2012).

1.3 Nanopartículas de oro (AuNPs) y sus métodos de síntesis

El oro (Au) es un metal noble, insoluble en agua, considerado extremadamente inactivo, no es afectado por los ácidos, aire u oxígeno. Las nanopartículas de este metal tienen varias aplicaciones biomédicas, dado que ofrecen una gran estabilidad, baja toxicidad (Connor et al., 2005) y pueden ser sintetizadas y funcionalizadas con antígenos. Además, el oro ha demostrado ser de los metales con mayor biocompatibilidad (Safari et al., 2012). La obtención de NPs se da mediante dos métodos generales: 1) método top-down y 2) método bottom-up. El primero, sugiere la obtención de NPs a partir de métodos físicos como la trituración y molienda. En el segundo, se comienza desde el nivel atómico hasta la formación de la nanopartícula, empleando reacciones químicas, principalmente de oxidación-reducción (*redox*) (Zanella, 2014). Las AuNPs particularmente, se obtienen de una reacción *redox* establecida entre sales de oro, donde el Au (III) es reducido a oro metálico (Rao et al., 2004). Los compuestos reductores de las sales de oro como el ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) empleados en las síntesis químicas de AuNPs, son en general altamente electronegativos, como es el caso del citrato de sodio (Turkevich, 1985), el borohidruro de sodio (NaBH), ácido ascórbico, formaldehído o hidrozina (Pal et al., 2007).

1.4 Empleo de aminoácidos para la síntesis de AuNPs

Los aminoácidos (aa) son moléculas orgánicas caracterizadas por poseer un grupo amino, un grupo carboxilo y un grupo “R” característico en su estructura. La unión de aminoácidos mediante enlaces amida formados entre sus grupos funcionales amina y carboxilo da lugar a la formación de péptidos, a su vez, la unión de péptidos genera polipéptidos que darán forma a las proteínas. La clasificación de los aminoácidos se da basándose en la polaridad de su grupo R, encontrándose así aminoácidos no polares, aminoácidos polares sin carga, aminoácidos ácidos y aminoácidos básicos. Recientemente se ha estudiado el potencial reductor que algunos aminoácidos presentan gracias a las características de su grupo R, tal es el caso de la cisteína y la lisina (Petean et al, 2008). La cisteína ha demostrado tener afinidad por el oro, por lo cuál ha sido empleada para la síntesis de AuNPs (Li et al., 2006; Ma & Han, 2008; Petean et al., 2008; Chou et al., 2014; Guo et al., 2015). La afinidad de este aminoácido por los metales radica en que, el grupo R de esta molécula se integra por un grupo funcional sulfhidrilo (-SH) que forma un enlace fuerte con la superficie de la AuNP (Monti et al., 2016). El aminoácido puede absorberse a la superficie de la AuNP durante su formación mediante reacciones de intercambio de ligandos o unirse a moléculas que han sido previamente adsorbidas a su superficie, es decir, la cisteína estabiliza la AuNP ya formada (Petean et al., 2008; Dodero et al., 200). Además, el recubrimiento de la superficie de la AuNP con aminoácidos como cisteína se considera el método predilecto para su biofuncionalización debido a grupos funcionales característicos antes mencionados, siendo posible la obtención de AuNPs con carga superficial neta positiva derivado del grupo funcional amino. Se ha estudiado que las AuNPs con carga positiva tienen mayor aplicación biológica que aquellas cargadas negativamente. (Petean et al., 2008; Monacu et al., 2009; Majzik et al., 2009). Además de la cisteína, la tirosina ha demostrado reducir sales de oro por la estructura de su grupo R, el cual se compone de un anillo bencénico altamente electronegativo (Slocik et al., 2005).

1.5 Péptido de LptD

Las Proteínas de Membrana Externa (OMPs, por sus siglas en inglés) además de encargarse del ensamblaje de lipopolisacáridos (LPS) son antígenos atractivos para ser usados en vacunas, ya que se encuentran expuestas en la superficie del patógeno y la similitud en sus estructuras se conserva entre varias especies de bacterias Gram negativas como *Vibrios*. La bacteria *Vibrio*

parahaemolyticus, compone la flora de estuarios y aguas marinas, por lo que es capaz de infectar a especies de organismos acuáticos. Además, su crecimiento se ve afectado por factores ambientales como temperatura y pH (Thompson et al., 2006). Estructuralmente, se compone por OMPs como LamB, OmpK, OmpU y LptD, que han demostrado tener alta capacidad de inducir respuesta inmune e inmunoprotección al ser administradas vía intraperitoneal en modelo de ratón. (Zha, et al., 2016). La proteína LptD es considerada estable y dota de permeabilidad a la membrana bacteriana, con un peso molecular de 89 192.92 Da, punto isoeléctrico de 4.42, constituida de 781 aminoácidos, mayormente de asparagina (web.expasy.org) dentro de la cual se han encontrado 4 péptidos inmunogénicos: 1) YLNSDKKYQDDS (286-297), 2) IPDETTNYS (585-593), 3) LENLDT (656-661), 4) WENQAIGSTGSSPEY (724-738). Este último péptido de LptD, cuya estructura se conforma de 15 aminoácidos: triptófano, ácido glutámico, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, glicina, serina, treonina, glicina, serina, serina, prolina, ácido glutámico, tirosina (W,E, N,Q,A,I,G,S,T,G,S,S,P,E,Y) tiene un punto isoeléctrico (PI) de 3.79, 26.67% de su secuencia son aminoácidos alifáticos, 13.33% de aminoácidos aromáticos, 26.67% de aminoácidos ácidos y 26.67 % de aminoácidos alifáticos con grupos hidroxilo; al contener mayor número de serinas, es considerado un péptido alifático polar, sin carga a pH neutro (www.ualberta.ca).

2. ANTECEDENTES

Las AuNPs son biocompatibles y han sido funcionalizadas con antígenos, por lo cual, se emplean en la formulación de prototipos de vacunas. La principal forma de obtener las AuNPs ha sido mediante la síntesis química con compuestos reductores como el citrato de sodio usado en el Método de Turkevich, que ha dado lugar a AuNPs de alta calidad con carga superficial negativa (Dong et al., 2019). Estas AuNPs han sido conjugadas con diferentes moléculas según la enfermedad a la que van dirigidas. No obstante, se determinó que las AuNPs con carga positiva tienen mayor aplicación en el área biológica que aquellas con carga negativa (Guo, et al., 2015; De Svoza et al., 2019). En el año 2011, Schaeublin y colaboradores demuestran que la toxicidad de las AuNPs al ser puestas en contacto con sistemas biológicos depende de la carga de la superficie de la AuNP, siendo las de carga neutra y positiva las menos tóxicas. La carga de la AuNP se determina a partir de las moléculas que forman ligandos a la superficie de la AuNP (Deng et al., 2012) por lo que se ha optado por estabilizar la superficie de la AuNP con moléculas biocompatibles como los aminoácidos cisteína, lisina y tirosina

Guo y colaboradores en el 2015 emplean AuNPs con carga positiva estabilizadas con cisteína y CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) para la liberación de ácidos nucleicos. Asimismo, Raj y colaboradores en el mismo año, le dan otra aplicación a las AuNPs estabilizadas con cisteína, siendo empleadas para la detección de bacterias Gram negativas (*E. coli*) en la orina de pacientes a partir de una prueba colorimétrica. Además de la cisteína, se han empleado péptidos que contengan tirosina para la síntesis de AuNPs por la capacidad de ésta de formar ligandos con el oro, En la tabla I se presenta un listado de trabajos dónde se han empleado péptidos que contienen tirosina para la síntesis de AuNPs.

Tabla I. Péptidos que contienen tirosina empleados para la obtención de AuNPs

<i>Referencia</i>	<i>Péptido</i>
Chen et al., 2008	AYSSGAPPMPPF
Slocik et al., 2005	AYSSGAPPMPPF
Si & Mandal 2006	NH ₂ -Leu-Aib-Tyr-OMe
Guerrero et al., 2012	CLPFFD
Bhattacharjee et al., 2005	Boc-Leu-Aib-Tyr-OMe
Yu et al., 2010	AYSSGAPPMPPF

Por otra parte, Li et al., 2014 demuestra el potencial uso de la proteína LptD como vacuna y Zha et al., 2016 el potencial inmunogénico e inmunoprotector de la proteína LptD, así como de 4 péptidos contenidos dentro de esta. Uno de estos péptidos se constituye por el aminoácido tirosina.

3. JUSTIFICACIÓN

Dado que las nanopartículas de oro son capaces de acarrear, transportar y liberar compuestos como fármacos y antígenos, además de ser buenos adyuvantes cuando se emplean en nanovacunas, resulta factible la innovación de las técnicas de obtención de AuNPs que permitan generar formulaciones efectivas y seguras. Asimismo, el uso de biomoléculas como los aminoácidos para la obtención de AuNPs empleadas en nanovacunas, permite conservar la bioseguridad de los tratamientos ya que, este tipo de moléculas son compatibles con sistemas biológicos y el método de síntesis es simple, haciendo posible obtener nanovacunas de una manera sencilla y sin involucrar compuestos de origen inorgánico que propicien la toxicidad y la formación de subproductos al ser administradas. Por otra parte, la proteína LptD contiene péptidos que han demostrado tener potencial inmunogénico contra la vibriosis y en su estructura se encuentra el aminoácido tirosina capaz de reducir el oro. Con lo anterior, resulta viable la síntesis de nanovacunas con compuestos reductores de oro y potencial inmunogénico e inmunoprotector para realizar un método de síntesis químico en un solo paso de AuNPs, y que a su vez estén bioconjugadas con un antígeno de origen peptídico unido a su superficie. El desarrollo de un prototipo de nanovacuna contra la vibriosis permitirá conocer los mecanismos químicos y cinéticos de la reacción efectuada en la reducción, estabilización y conjugación del péptido de LptD con el oro. El empleo de métodos sencillos de obtención de nanovacunas hará posible que estas lleguen a mayor número de personas sin perder su seguridad y eficiencia necesaria; permitiendo que sean económicamente viables asegurando que los grupos más vulnerables de la población tengan acceso a ellas

4. HIPÓTESIS

Si el antígeno de **LptD** que contiene en su estructura grupos funcionales afines al oro es capaz de inducir inmunoprotección contra *V. parahaemolyticus* y las AuNPs sintetizadas con aminoácidos han demostrado ser estables y biocompatibles, entonces, la interacción entre el péptido de LptD y las sales de oro darán como resultado un prototipo de nanovacuna oral (*LptD@AuNPs*) con estabilidad fisicoquímica y bioseguro para células de ratón.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Diseñar, sintetizar y caracterizar la estabilidad fisicoquímica del prototipo de nanovacuna oral (*LptD@AuNP*) y evaluar su bioseguridad en un modelo *in vitro* en células de bazo de ratón.

5.2 Objetivos específicos

1. Diseñar y sintetizar AuNPs control y el bioconjugado *LptD@AuNPs* mediante reacciones de oxidación-reducción (*redox*) empleando aminoácidos como agentes reductores y estabilizadores.
2. Caracterizar fisicoquímicamente las AuNPs control y el bioconjugado *LptD@AuNPs*.
3. Evaluar la bioseguridad del prototipo de nanovacuna oral (*LptD@AuNPs*) en un modelo *in vitro* de células de bazo de ratón.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Síntesis de Nanopartículas de Oro (AuNPs)

Para las síntesis de las AuNPs obtenidas en este trabajo, se emplearon los reactivos mostrados en la Tabla II, los cuales fueron adquiridos con los laboratorios Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA); se utilizó agua Mili-Q esterilizada como solvente de todas las soluciones precursoras:

Tabla II. Reactivos empleados para la síntesis de AuNPs

Compuesto	Fórmula	CAS (Sigma Aldrich)
Borohidruro de sodio	(H ₄ BNa)	16940-66-2
Clorhidrato de hidroxilamida	H ₃ NO • HCl	5470-11-1
Cloruro de oro	AuCl ₃	13453-07-1
Ácido tetracloroaúrico	HAuCl ₄	27988-77-8
L-Metil cisteína	HSCH ₂ CH(NH ₂)COOCH ₃ •HCl	18598-63-5
HEPES*	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	7365-45-9

* Buffer HEPES (Ácido 4- (2-hidroxietyl) -1-piperazina-metanosulfónico, 0.1 M)

Las soluciones de AuNPs se sintetizaron siguiendo dos metodologías. La parte experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Animal y Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

6.1.1 Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador (*cis@AuNPs*)

Este método de síntesis consiste en una serie de reacciones secuenciales que permiten modular el tamaño de las AuNPs estabilizadas con cisteína. En su etapa inicial, la primera reacción (*cis@AuNPs-SI*) utiliza como precursor una solución de semillas de oro (*cis@AuNPs-Seed*)

previamente sintetizada. Posteriormente, las AuNPs de la solución *cis@AuNPs-S1* son utilizadas como precursoras en la solución *cis@AuNPs-S2* para obtener así AuNPs con un diámetro mayor. Las AuNPs de la solución *cis@AuNPs-S2* son usadas como precursoras en la solución *cis@AuNPs-S3* y así consecutivamente hasta alcanzar el diámetro deseado.

a) *Síntesis de las semillas de oro (cis@AuNP-Seed)*

Para esta reacción, fueron añadidos a un matraz redondo de fondo plano 77 mL de solución de tricloruro de oro (AuCl_3 , 0.5 mM), el cual se montó sobre una placa de agitación (marca Corning) a una temperatura de 25°C. Posteriormente, se adicionaron 750 μL de solución de L-Metil cisteína ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOCH}_3\cdot\text{HCl}$, 51.6 mM), manteniendo la agitación por 10 min, transcurridos estos, se añadieron 270 μL de borohidruro de sodio (NaBH_4 , 144 mM). En esta etapa se observó un cambio inmediato de coloración, de amarillo intenso a café oscuro. La reacción se dejó en agitación sobre la placa a ~150 rpm durante 5 h.

b) *Síntesis de la solución 1 (cis@AuNP-S1)*

Para esta reacción, se emplearon 50 mL de una solución de AuCl_3 (0.5 mM) que fueron vertidos en un matraz redondo de fondo plano bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación usadas para la síntesis de la solución semilla *cis@AuNPs-Seed*. Posteriormente, se adicionaron 490 μL de solución de L-Metil cisteína ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOCH}_3\cdot\text{HCl}$, 51.6 mM) manteniendo la agitación por 15 min, transcurridos estos, se añadieron 40 mL de la solución semilla *cis@AuNPs-Seed*. El matraz permaneció en agitación por 15 min más, para después adicionar 330 μL de clorhidrato de hidroxilamina ($\text{H}_3\text{NO} \cdot \text{HCl}$, 115.8 mM). La reacción se mantuvo en agitación por 5 h. Al final de esta reacción, la solución obtenida viró a color rojizo, indicando así la formación de AuNPs de tamaño mayor a las obtenidas en la solución *cis@AuNPs-Seed*.

c) *Síntesis de las soluciones 2, 3, 4, 5 y 6 (cis@AuNPs-S2, cis@AuNPs-S3, cis@AuNPs-S4, cis@AuNPs-S5 y cis@AuNPs-S6)*

Siguiendo con las síntesis secuenciales para obtener AuNPs de mayor diámetro, las sucesivas reacciones que corresponden a las soluciones *cis@AuNPs-S2*, *cis@AuNPs-S3*, *cis@AuNPs-S4*, *cis@AuNPs-S5* y *cis@AuNPs-S6* siguieron la

metodología del inciso anterior (inciso b), pero empleando como semillas precursoras las soluciones precedentes, es decir, la *cis@AuNPs-S1* fue usada como semilla precursora para obtener la *cis@AuNPs-S2*. La *cis@AuNP-S2* usada como semilla precursora en la *cis@AuNPs-S3*, la *cis@AuNPs-S3* como semilla precursora para obtener la *cis@AuNPs-S4* y así consecutivamente hasta la *cis@AuNPs-S6*.

El tiempo de estabilidad aproximado de estas soluciones fue de un mes. Posterior a este tiempo, fue posible observar la formación de precipitados en el fondo del contenedor, los cuales pueden ser re-suspendidos mediante agitación *vortex*.

En este trabajo, las soluciones *cis@AuNPs-S5* y *cis@AuNPs-S6*, fueron utilizadas para la caracterización fisicoquímica y como control de AuNPs desnudas dado que poseen características de tamaño y forma específicos esperados.

6.1.2 Método II: Síntesis de AuNPs utilizando el péptido de la proteína LptD (*LptD@AuNPs*) como agente reductor y estabilizador.

Mediante esta metodología, se reducen y estabilizan la nanopartícula de oro con el péptido de la proteína LptD en un solo paso, debido a que esta estructura peptídica se conforma de aminoácidos como tirosina, que presenta una gran capacidad reductora de metales nobles como el oro. Con esta síntesis se obtuvieron las soluciones *LptD@AuNPs(1:2)* y *LptD@AuNPs(1:4)*. La solución *LptD@AuNPs(1:2)* tiene una relación de concentración 1:2 (péptido:oro); para el caso de la solución *LptD@AuNPs(1:4)*, la relación de concentración es 1:4 (péptido:oro).

La etapa experimental se llevó a cabo en un cuarto frío a una temperatura de 5°C para evitar la degradación del péptido. Para la reacción *LptD@AuNPs(1:2)* se mezcló en tubo Eppendorf de 1.5 mL, 400 µL del Buffer HEPES (Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina-metanosulfónico, 0.1 M), con 100 µL del péptido de LptD (1µg/µl), el cuál fue sintetizado por la empresa *Syn peptide* (número de lote JT-83782). La mezcla se homogenizó cuidadosamente con la ayuda de la micropipeta. Posteriormente, a la mezcla se añadieron 10 µL de una solución de ácido tetracloroaúrico (HAuCl₄, 0.1 M), se homogenizó nuevamente con ayuda de la micropipeta y finalmente la reacción se dejó reposar a una temperatura de 5 °C por 2 h. La solución viró a color violeta una vez transcurridas 2 h después de añadir la solución de HAuCl₄.

Para obtener la solución *LptD@AuNPs(1:4)* se siguió la metodología de la solución *LptD@AuNPs(1:2)*, sin embargo, para esta síntesis los volúmenes fueron de 400 μL del Buffer HEPES (Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina-metanosulfónico, 0.1 M), 100 μL del péptido de LptD (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), el cuál fue sintetizado por la empresa *Syn peptide* (número de lote JT-83782) y 20 μL de una solución de ácido tetracloroaúrico (HAuCl_4 , 0.1 M).

Finalmente, el conjugado *LptD@AuNPs* obtenido a diferentes concentraciones se almacenó a 4°C, protegiéndolo de la luz. El tiempo de estabilidad aproximado de esta solución fue de un mes. Posterior a este tiempo, fue posible observar la formación de precipitados en el fondo y paredes del vial, los cuales pueden ser re-suspendidos mediante agitación.

6.2 Caracterización de AuNPs

Las técnicas de caracterización a continuación descritas, fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Nanomateriales del departamento de Física Aplicada del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Mérida; exceptuando la técnica de Espectrofotometría Ultravioleta-Visible, la cual se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en el laboratorio de Biotecnología Animal y Vegetal; la técnica de FTIR realizada en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) y la técnica HRTEM realizada en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) San Luis Potosí.

Las muestras sometidas a caracterización son las soluciones resultantes de los dos métodos de síntesis anteriormente mencionados: *cis@AuNP-S5* y *cis@AuNP-S6* (Método I, con cisteína como agente estabilizador) y las soluciones *LptD@AuNP(1:2)* y *LptD@AuNP(1:4)* (Método II, obtenidas de la síntesis de reducción de oro con el péptido de la proteína LptD).

6.2.1 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible

Los espectros de absorción se determinaron con las muestras líquidas, empleando un espectrofotómetro SQ2800 UV/VIS, de la marca UNICO y celdas de cuarzo de 1 mm de paso óptico, a las cuales se les añadió 1 mL de cada solución, con un *Slit Width* de 4 nm.

Se efectuó el protocolo de mediciones calibrando con agua Mili-Q estéril y se realizó un barrido espectral de 200 a 900 nm de longitud de onda con paso de 5 nm. El tiempo total de muestreo fue de 5 minutos.

6.2.2 Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP_OES)

Para verificar la cantidad de dopaje de Au^{+3} en el sistema *cis@AuNPs* donde la solución precursora de oro era $AuCl_3$ y para el sistema *LptD@AuNPs* en el cual se empleó $HAuCl_4$ como compuesto precursor del mismo metal, estas se analizaron por ICP_OES con un sistema *Ultimate 2 Horiba*. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su análisis y fueron diluidas a 0.5/5 mL (sistemas *cis@AuNPs*) y 0.2/5 mL (sistemas *LptD@AuNPs*) para su análisis por ICP-OES, esto debido a que el volumen de las muestras era muy pequeño y se requiere mínimo de 5 mL para realizar la medición.

Los cálculos realizados para obtener la concentración teórica de cada una de las soluciones y así poder calcular el rendimiento real, el cual es obtenido mediante la concentración en partes por millón (ppm) detectada por el equipo, se muestran en el Anexo A de este documento.

6.2.3 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

6.2.3.1 Diámetro Hidrodinámico

El diámetro hidrodinámico de las muestras de AuNPs se determinó por medio de la técnica de DLS empleando un equipo *Zetasizer Nano 360*. Durante la medición, se depositó 1 mL de las muestras en cubetillas de poliestireno a una temperatura de 24 °C. El medio dispersante de las soluciones fue agua, por lo tanto, la viscosidad de la medición fue de 0.8872 cP, el índice de refracción del material (oro) fue de 0.20 y el tiempo de adquisición de la muestra fue de 100 s en cada muestra. El equipo obtuvo 5 promedios de cada muestra, cada uno a partir de 100 mediciones, de los 5 datos, se obtuvo la media.

6.2.3.2 Potencial Z

Aspectos intrínsecos del elemento y el método de síntesis empleado para la obtención de nanopartículas, determinarán su carga, pero factores como el pH de la solución en donde se encuentran dispersas influyen en el cambio de su carga superficial.

En este estudio se determinó el potencial Z de las muestras de AuNPs a 5 diferentes pHs (2, 3, 5, 7, 9 y 11). Para su medición, fue necesario diluir 10 μL de las soluciones de AuNPs en 1 mL de agua Mili-Q ajustada con hidróxido de sodio (NaOH, 0.1 M) y ácido clorhídrico (HCl, al 1%) para alcanzar los pHs deseados. El análisis se llevó a cabo por triplicado utilizando el equipo *DLS-Malvern instruments (Zetasizer nano)*.

6.2.4 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Mediante esta técnica fue posible analizar la química superficial de las AuNPs obtenidas a partir de los dos métodos de síntesis.

La preparación de la muestra consistió en su primera fase en la congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, posterior a esto, se realizó una liofilización de las soluciones empleando el equipo de la marca *Labconco* (catálogo: 7740020, Número de serie: 120963968-S), de 60 ciclos con un voltaje de operación de 115 V. Los parámetros a los que fueron sometidas las muestras en esta liofilizadora fueron de 0.050 Mb, a una temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 h. Los polvos obtenidos se depositaron en un cristal de diamante (accesorio ATR) del Espectrómetro *Cary 600* (Agilent Technologies) para su medición. Los espectros se registraron en el rango de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ utilizando aire como línea base, bajo condiciones de humedad controlada y temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2.5 Espectroscopía de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS)

Las muestras se prepararon para su medición depositando 100 μl de cada solución en sustratos de vidrio, los cuáles fueron sometidos a una humedad controlada menor del 20% para deshidratarlas y que estas pudieran ser medidas en estado sólido por el equipo de XPS modelo *K-ALPHA de Thermo Scientific*, utilizando un haz de rayos X monocromado Al-K α (1486.6 eV) operado a 12 kV y 40 W. El área analizada fue de $400\text{ }\mu\text{m}^2$ usando un ángulo incidente de 30° . Antes de las mediciones la superficie de las muestras fue limpiada mediante erosión con argón (30 s a 3 kV y 30 W). Los espectros de alta resolución se obtuvieron a 0.1 eV/paso y 50 eV de energía. Las energías de enlace obtenidas fueron referenciadas respecto al carbono 1s (284.8 eV).

6.2.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La preparación de las muestras para esta técnica consistió en depositar 100 μL de cada solución sobre los sustratos de aluminio pulido, a una humedad del 20% durante 24 h, con la finalidad de deshidratar las muestras.

El equipo empleado fue un Microscopio Electrónico de Barrido de emisión de campo, marca JEOL modelo JSM-7600F, con un voltaje de operación de 10 kV, acoplado con un detector para el microanálisis de dispersión de energía de rayos X, modelo *X-Max de Oxford Instruments*. Las micrografías y microanálisis químicos de las soluciones se realizaron en la parte superficial y transversal a diferentes magnificaciones y en zonas específicas de interés.

6.2.7 Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)

Este análisis semicualitativo elemental se efectuó con el equipo descrito para la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Para preparar las muestras se depositaron 100 μ l sobre los sustratos de aluminio, a una humedad del 20% para poder alcanzar la deshidratación de la solución y ser caracterizadas en estado sólido.

6.2.8 Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)

La morfología y el tamaño de partícula se analizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)

La preparación de las muestras consistió en depositar 100 μ L de cada solución sobre las rejillas de cobre, a una humedad del 20% durante 24 h, con la finalidad de deshidratar las muestras, las cuáles fueron sometidas a medición empleando el equipo *Jeol Jem 1230* operado a 200 kV.

6.3 Ensayos Biológicos

6.3.1 Preparación de tratamientos

Las soluciones *cis@AuNPs-S6*, *cis@AuNPs-S5*, *LptD@AuNPs(1:2)* y *LptD@AuNPs(1:4)* se suspendieron en medio HEPES 0.1 M (Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina-metanosulfónico). Las concentraciones de oro correspondían a 0.15 μ g/ μ L aproximadamente en ambos diámetros para los sistemas con cisteína, 0.4 μ g/ μ L y 0.8 μ g/ μ L para el sistema empleando el péptido del antígeno LptD, *LptD@AuNPs(1:2)* y *LptD@AuNPs(1:4)* respectivamente. Todos los tratamientos fueron homogenizados antes de ser empleados en las diferentes pruebas biológicas realizadas en este trabajo.

6.3.2 Aislamiento de esplenocitos de ratón

Para el aislamiento de esplenocitos, se utilizaron ratones Balb/c hembras de 8 a 10 semanas de edad ($n=4$, peso aproximado de 18-20 g); los animales se sacrificaron por dislocación y se obtuvo el bazo por disección. Posteriormente, el bazo se homogenizó con 10 mL de medio de cultivo RPMI/ Heparina [RPMI-1640 (GIBCO, *Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*), 100 UI mL⁻¹ estreptomina (fluido), 100 UI mL⁻¹ penicilina (fluido) y 100 UI mL⁻¹ heparina (GIBCO)] empleando un filtro de 100 μ m (BD Falcon, *Franklin Lakes, NJ, USA*). La muestra se centrifugó a 1,500 rpm por 10 min a 25°C (Eppendorf, Modelo 5810R, Canadá) y se decantó el sobrenadante. Después se realizaron dos lavados con 5 mL de medio de cultivo RPMI/SFB [Medio de cultivo RPMI-1640, 10% de suero fetal bovino (GIBCO), (*Waltham, MA, USA*) 100 UI mL⁻¹ estreptomina (fluido), 100 UI mL⁻¹ penicilina (fluido)]. Las células se incubaron 10 min a temperatura ambiente y se agregaron 3 mL de buffer de fosfatos (PBS). Nuevamente se centrifugó a 1,500 rpm por 10 min a 25 °C, se decantó el medio de cultivo y se resuspendió en 10 mL de medio RPMI/SFB. Por último, se añadieron 50 μ L de leucocitos con 50 μ L de azul tripan (Sigma Aldrich, Cat. T-8154, St. Louis, MO, USA) en una cámara de conteo, y se cuantificó el número de células en el equipo TC20 *Coulter Particle Counter* (BioRad, Hércules, CA, USA). La concentración de células se ajustó con RPMI/SFB a 1.2×10^6 .

6.3.3 Prueba de Viabilidad y Citotoxicidad celular

La citotoxicidad de las AuNPs se evaluó en los esplenocitos de ratón a las 24 h post-incubación mediante la técnica de resazurina. La concentración de AuNPs fue de 1:2 y 1:4 con respecto al péptido del antígeno LptD. Las AuNPs control fueron obtenidas mediante la síntesis con cisteína que fue utilizada como agente estabilizador (*cis@AuNPs-S6*, *cis@AuNPs-S5*).

La técnica de viabilidad celular se basa en la reducción intracelular de resazurina (azul, no fluorescente) a resofurina (rosa, fluorescente) por oxidoreductasas que se encuentran principalmente en las células vivas metabólicamente activas. La resofurina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de compuestos sobre células humanas, animales y/o bacterias (Gilbert & Friedrich, 2017). Se colocaron 90 μ L de esplenocitos de bazo de ratón en placas de 96 pozos (Nunc-immuno, MaxiSorp, USA) a una concentración de 1.2×10^6 células/pozo en RPMI/SFB. Las células se sometieron a diferentes tratamientos, los cuales se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Tratamientos sometidos a prueba de citotoxicidad

Tratamiento	Descripción
Leucocitos + HEPES (0.1 M)	Control positivo
Leucocitos + <i>cis@AuNPs-S6</i>	Leucocitos expuestos a una solución de AuNPs desnudas estabilizadas con cisteína. Diámetro de ~30 nm
Leucocitos + <i>cis@AuNPs-S5</i>	Leucocitos expuestos a una solución de AuNPs desnudas estabilizadas con cisteína. Diámetro de ~40 nm
Leucocitos + <i>LptD@AuNPs(1:2)</i>	Leucocitos expuestos a AuNPs sintetizadas y estabilizadas con el antígeno de LptD. Diámetro ~ 40nm y una concentración de 1:2; péptido:oro
Leucocitos + <i>LptD@AuNPs(1:4)</i>	Leucocitos expuestos a AuNPs sintetizadas y estabilizadas con el antígeno de LptD. Diámetro ~ 30nm y una concentración de 1:4; péptido:oro
Leucocitos + LptD (0.2 µg/µL)	Leucocitos expuestos a una concentración de 0.2 µg/µL de antígeno de LptD
Leucocitos + DMSO	Control negativo

Las células tratadas con HEPES 0.1 M se emplearon como control positivo, mientras que las tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) se usaron como control negativo. Todos los grupos se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 6 y 24 h. Posteriormente, se añadieron 11 µL del reactivo resazurina (Sigma, R7017, St. Louis, MO, USA) disuelto en PBS a 0.15 mg/mL. Después de la

exposición, las células se tiñeron con resazurina durante 4 h a 37°C y 5% de CO₂. La viabilidad se midió cuando se observó un cambio de color azul a rosa. La fluorescencia de resofurina se midió en un lector de placa con fluorómetro (*Thermo Fisher Scientific, Varioskan, USA*) a 530 nm de excitación y 590 nm de emisión.

6.3.4 Análisis estadísticos

Todos los datos se analizaron para obtener los estadísticos descriptivos. Posteriormente, las pruebas de Shapiro–Wilk y Kolmogorov-Smirnov se utilizaron para analizar la normalidad de los datos. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las medias \pm desviaciones estándar se calcularon y se llevó a cabo un análisis de variancia (ANOVA) de una vía. Cuando existieron diferencias estadísticas entre grupos se compararon las medias por la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$) empleando el *software IBM SPSS Statistics v23* (SPSS, *Richmond, VA, EE. UU.*)

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de AuNPs

7.1.1 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible

7.1.1.1 Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador (soluciones *cis@AuNPs*)

En la Figura 1 se muestran las absorbancias obtenidas de cada una de las soluciones sintetizadas con cisteína como agente estabilizador. Las longitudes de onda (λ) de absorción se encuentran en el rango de 510 a 550 nm, correspondientes a los plasmones de resonancia que caracteriza a las AuNPs con diámetros entre 2 a 56 nm. En la gráfica, también es posible observar un desplazamiento de los picos máximos de absorción a longitudes de onda mayores (Infrarrojos cercanos) de cada muestra, indicando así el aumento del diámetro de las diferentes soluciones.

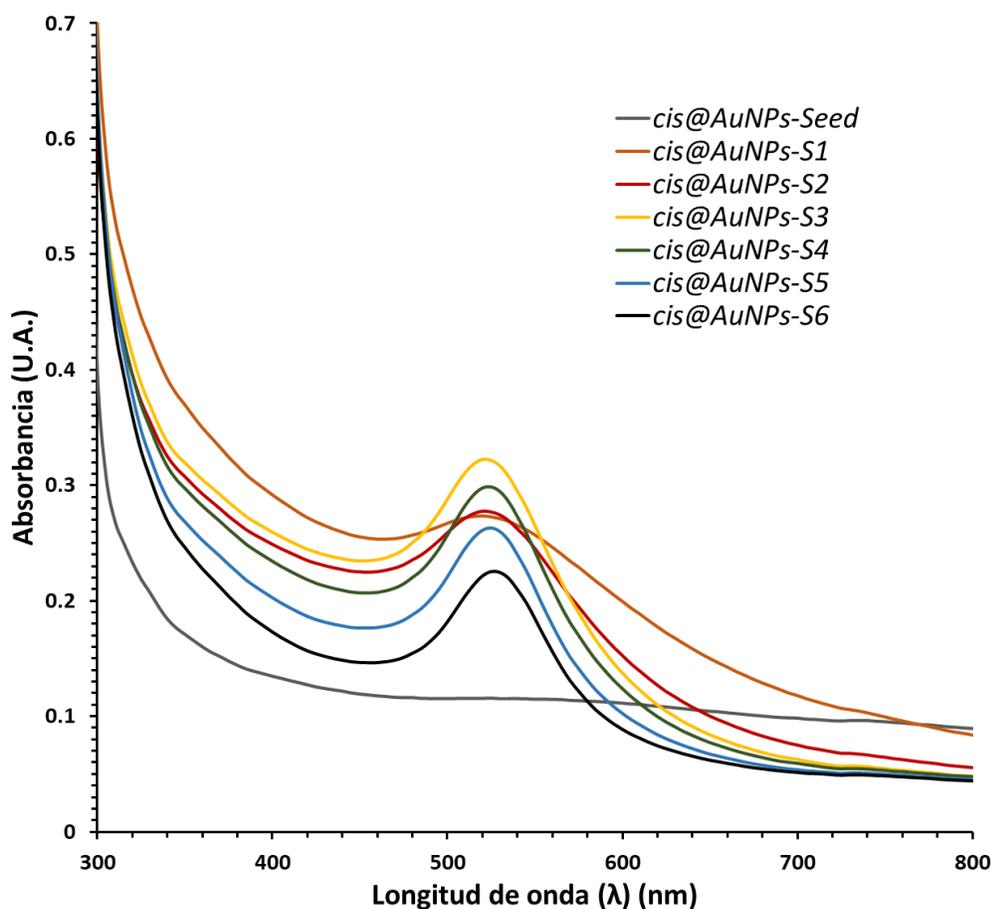


Figura 1. Espectros de absorción UV-Vis obtenidos de las soluciones *cis@AuNPs*, empleando cisteína como agente estabilizador. Se observan longitudes de onda entre los 510 a 550 nm, que

corresponden a plasmones de resonancia de nanopartículas de oro entre los 2 y 56 nm de diámetro. En la solución *cis@AuNPs-Seed* no se registró absorbancia correspondiente al plasmón, dado a que el tamaño de estas nanopartículas era muy pequeño (~2 nm).

En la Tabla IV se muestran los diámetros de cada solución de AuNPs obtenidas mediante el Método I de síntesis (soluciones *cis@AuNPs*). La muestra *cis@AuNPs-Seed* es la solución semilla, la cual presentó menor tamaño (~2 nm); las demás muestras de AuNPs aumentaron su diámetro de forma secuencial, siendo *cis@AuNPs-S6* la de mayor diámetro (56 nm).

Tabla IV. Diámetros obtenidos de las soluciones *cis@AuNPs*, empleando cisteína como agente estabilizador.

Solución	Longitud de onda (nm)	Diámetro (nm)
<i>cis@AuNPs-Seed</i>	510	~2
<i>cis@AuNPs-S1</i>	515	4
<i>cis@AuNPs-S2</i>	519	5
<i>cis@AuNPs-S3</i>	520	6
<i>cis@AuNPs-S4</i>	523	14
<i>cis@AuNPs-S5</i>	526	30
<i>cis@AuNPs-S6</i>	534	56

Los diámetros obtenidos a partir de la síntesis secuencial de AuNPs con cisteína como agente estabilizador e hidroxilamina como reductor, a partir de una solución semilla sintetizada previamente. Las mediciones en el espectrofotómetro se realizaron depositando 1 mL de cada solución en una celda de cuarzo de 1 mm de paso óptico.

7.1.1.2 Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD

(soluciones *LptD@AuNPs*)

En la Figura 2 se muestra el espectro de absorción de las soluciones *LptD@AuNPs(1:2)* (0.2:0.4 µg/µL; péptido: oro) y *LptD@AuNPs(1:4)* (0.2:0.8 µg/µL; péptido: oro) las cuales fueron sintetizadas con el Método II. El plasmón de cada una de las soluciones se encuentra en el rango

de 525 a 550 nm, lo cual indica que las AuNPs a concentraciones 1:2 y 1:4 (péptido: oro) conjugadas con el péptido, poseen un diámetro de entre 45 a 50 nm.

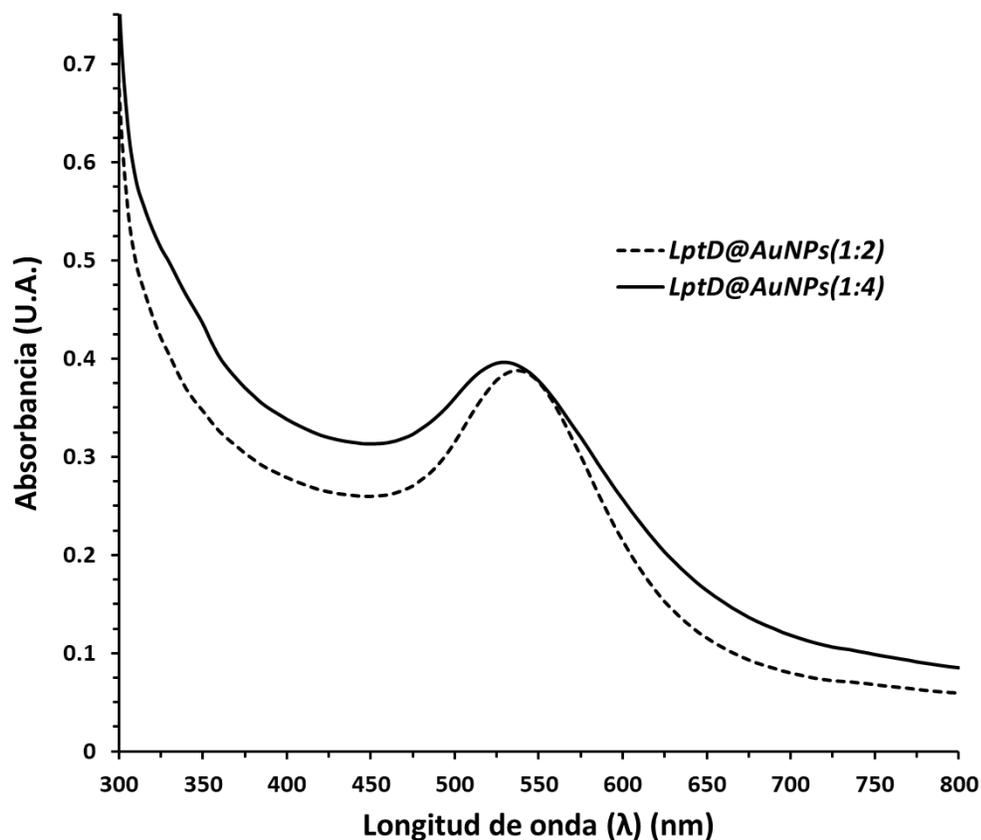


Figura 2. Espectros de absorción obtenidos de las soluciones *LptD@AuNP(1:2)* (0.2:0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; péptido: oro) y *LptD@AuNP(1:4)* (0.2:0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; péptido: oro) sintetizadas con el antígeno de LptD como agente reductor y estabilizante. Las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro UV-Vis, utilizando celdas de cuarzo de 1 mm de paso óptico. El plasmón de cada solución se encuentra en longitudes de onda de entre 525 a 550 nm, característico de AuNPs de diámetro de 45 a 50 nm.

7.1.2 Espectrofotometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP_OES)

En la Tabla V se muestran los resultados obtenidos al someter las muestras a medición con esta técnica. Se observa un alto rendimiento en los sistemas *LptD@AuNPs* que contrasta con el rendimiento del sistema *cis@AuNPs*. Los cálculos realizados para la obtención del porcentaje real de rendimiento, en los cuáles se consideró el factor de dilución (0.5/5 mL del sistema

cis@AuNPs y 0.2/5 mL del sistema *LptD@AuNPs*) se muestran en el Anexo A de este documento.

Tabla V. Rendimiento real de los sistemas *cis@AuNPs* y *LptD@AuNPs*. El factor de dilución ya está considerado en los resultados y las concentraciones fueron calculadas según los pesos moleculares de los compuestos empleados en las soluciones precursoras, además de ser considerado el volumen añadido de cada solución.

Solución	Concentración de Au teórico (Rendimiento del 100%)	Resultado de la medición (ppm)	Rendimiento calculado
<i>cis@AuNPs</i>	0.15 µg/µL = 150 ppm	4.25	4.33 %
<i>LptD@AuNPs</i>	0.75 µg/µL = 750 ppm	625.03	83.33 %

7.1.3 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

7.1.3.1 Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador (soluciones *cis@AuNPs*)

En la Figura 3 se presentan los diámetros hidrodinámicos para las AuNPs sintetizadas a partir del Método I en función del pH. Se observó que, a pH ácido de 3, el sistema *cis@AuNPs-S5* presentó un diámetro de 125 nm; mientras que el sistema *cis@AuNPs-S6* presentó un diámetro de 50 nm. Las líneas de tendencia obtenidas de ambos sistemas tuvieron un comportamiento similar. A pH ácidos (de 2 a 4) las AuNPs presentaron diámetros menores a 150 nm.

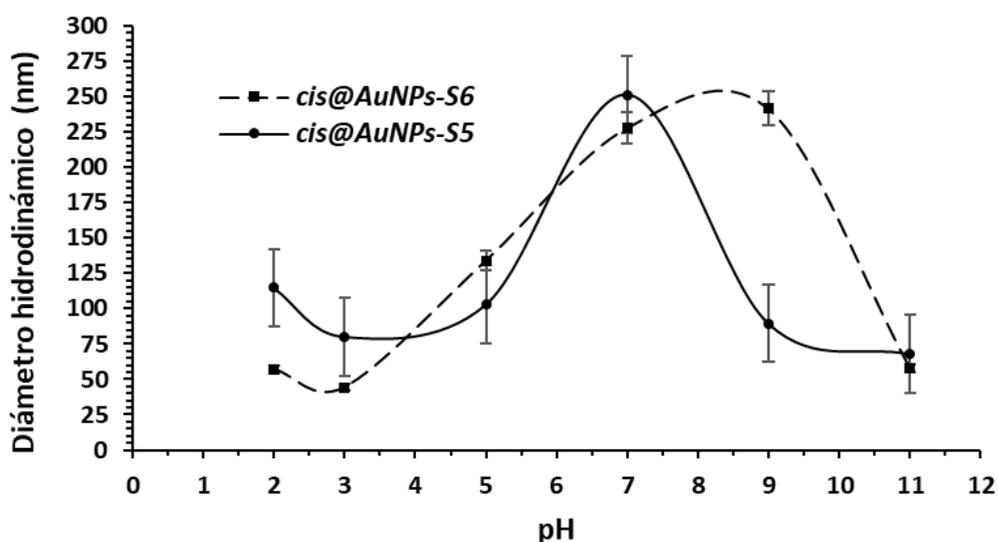


Figura 3. Variación del diámetro hidrodinámico de las AuNPs de las soluciones *cis@AuNPs-S6* y *cis@AuNPs-S5* a diferentes pHs. Las muestras se midieron en celdas de poliestireno. Los pHs fueron estabilizados con hidróxido de sodio (NaOH, 0.1 M) y ácido clorhídrico (HCl, 10 %).

La Figura 3 muestra que a pH básicos (6-8) el diámetro aumentó drásticamente, pero al llevar la solución a pH de 10 a 12, el diámetro regresa a dimensiones similares a las iniciales a pH ácidos.

En la Figura 4, se presenta el Potencial Z de las AuNPs de los sistemas *cis@AuNPs*. El comportamiento en ambas rectas es similar. La carga de las nanopartículas es positiva a condiciones de pH ácidas, mientras que tiende a ser negativa en pH básico.

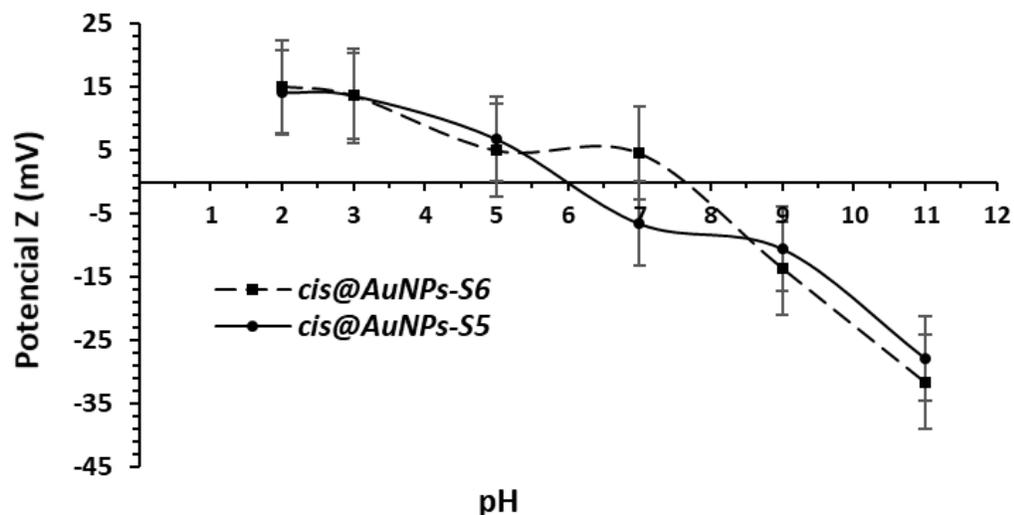


Figura 4. Variación de la carga superficial de las AuNPs de las soluciones *cis@AuNP-S6* y *cis@AuNP-S5* a diferentes pHs. Este sistema empleó cisteína como agente estabilizante, la cual le dio a la nanopartícula la carga positiva. Las muestras se midieron en celdas de poliestireno. Los pHs fueron estabilizados con hidróxido de sodio (NaOH, 0.1 M) y ácido clorhídrico (HCl, 10 %).

7.1.3.2 Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD (soluciones *LptD@AuNPs*)

En la Figura 5 se presenta la carga superficial de las AuNPs de los sistemas *LptD@AuNPs(1:2)* y *LptD@AuNPs(1:4)*. El comportamiento en ambas rectas es similar. El diámetro de las AuNPs en ambos sistemas tiende a ser mayor en condiciones de pH ácido (de 2 a 3). Sin embargo, el sistema con más alta concentración de antígeno de LptD (*LptD@AuNPs(1:4)*) presenta diámetros menores. En pHs de 4 a 12, el diámetro de las AuNPs permaneció constante, con ligeras variaciones en el sistema *LptD@AuNPs(1:2)*.

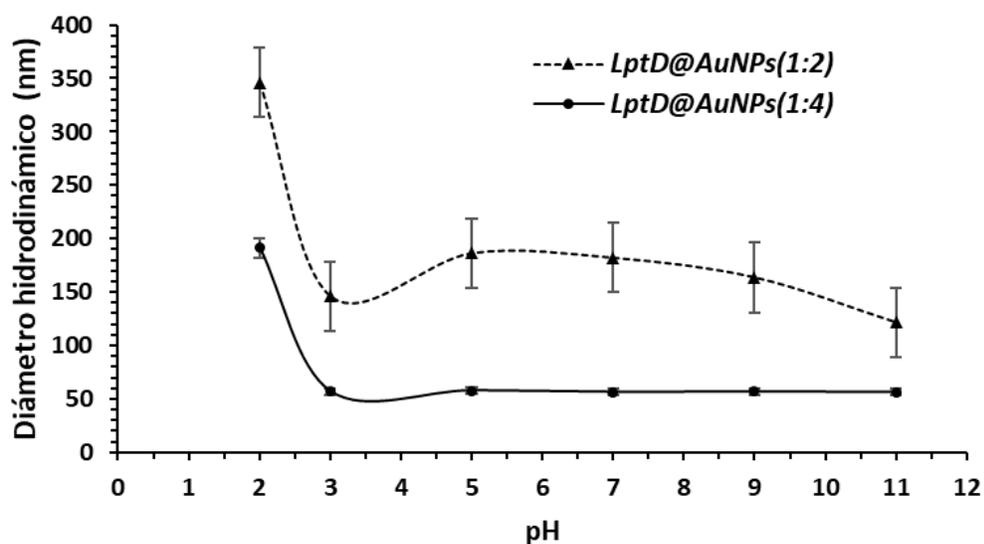


Figura 5. Variación del diámetro hidrodinámico de las AuNPs de las soluciones *LptD@AuNP (1:2)* y *LptD@AuNP (1:4)* a diferentes pHs. Este sistema empleó el antígeno de LptD como agente estabilizante. Las muestras se midieron en celdas de poliestireno. Los pHs fueron estabilizados con hidróxido de sodio (NaOH, 0.1 M) y ácido clorhídrico (HCl, 10 %).

En el caso de la carga superficial de este sistema, en la Figura 6 podemos observar la misma tendencia de la recta en los sistemas *LptD@AuNPs(1:2)* y *LptD@AuNPs(1:4)*. La carga es positiva en pH 2 para ambas soluciones. Sin embargo, el incremento de una unidad de pH cambió la carga de la AuNP, en ambas concentraciones de la solución *LptD@AuNPs*. No obstante, la carga neta en ambas soluciones permanece negativa en los pH 3 hasta 11 con ligeras variaciones.

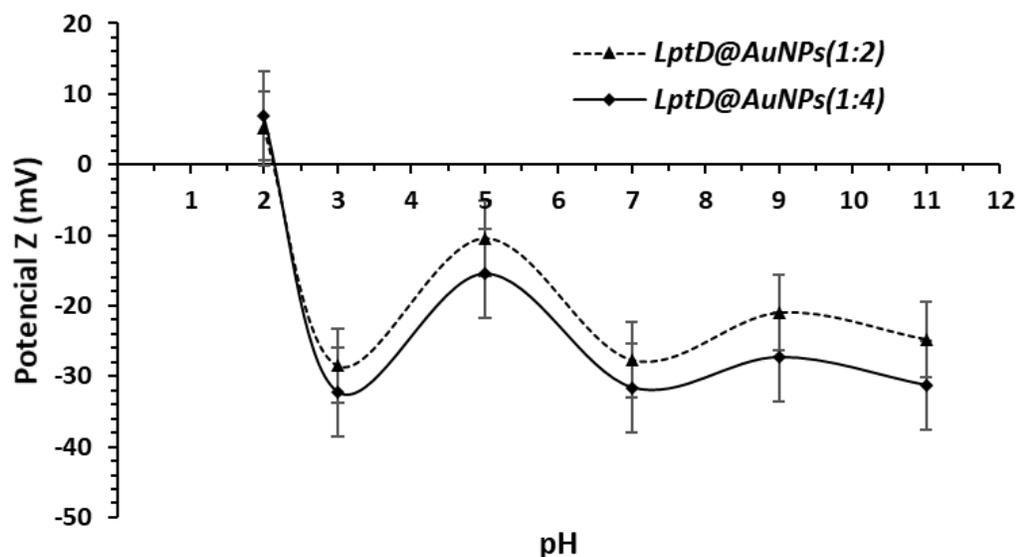


Figura 6. Variación de la carga superficial de las AuNPs de las soluciones *LptD@AuNP (1:2)* y *LptD@AuNP (1:4)* a diferentes pHs. Este sistema empleó el antígeno de LptD como agente estabilizante. Las muestras se midieron en celdas de poliestireno. Los pHs fueron estabilizados con hidróxido de sodio (NaOH, 0.1 M) y ácido clorhídrico (HCl, al 10 %).

7.1.4 Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

7.1.4.1 Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador (soluciones *cis@AuNPs*)

En la Figura 7, se muestran los espectros obtenidos por la técnica de FTIR. Estos espectros fueron utilizados para confirmar la conjugación de las AuNPs con la cisteína. La imagen muestra las transmitancias obtenidas de las soluciones *cis@AuNPs-S6* y *cis@AuNPs-S5*. Para ambos espectros, son evidentes las bandas correspondientes a los carboxilos y aminas primarias que confirman la presencia de cisteína anclada al ion metálico. Las bandas centradas entre 1600 y 1390 cm^{-1} , corresponden a las vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos COO^- , mientras que las bandas centradas a 1530 cm^{-1} y las formadas entre 2950 y 3500 cm^{-1} , son usualmente asignadas al estiramiento de los grupos NH_3^+ . Por otra parte, también es importante mencionar la ausencia de la banda S-H (centrada en 2550 cm^{-1}) en ambos espectros, confirma la interacción S-Au (Ma & Han, 2008; Aryal et al., 2006).

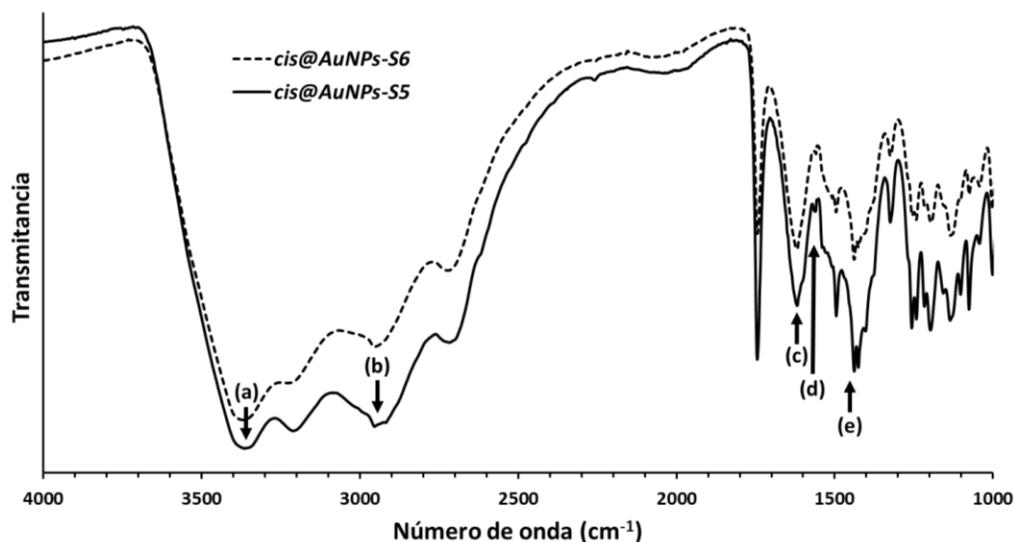


Figura 7. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de las soluciones *cis@AuNPs-S5* y *cis@AuNPs-S6*, sintetizadas con cisteína como agente estabilizador. El punto (a) corresponde a 2380 cm^{-1} , el punto (b) a 2950 , punto (c) a 1600 cm^{-1} , punto (d) a 1530 cm^{-1} y punto (e) a 1390 cm^{-1} .

7.1.4.2 Método II: Síntesis de AuNPs con el epítipo de LptD (soluciones *LptD@AuNPs*)

En la Figura 8, se observan los espectros de la técnica FTIR para las muestras *LptD@AuNPs(1:2)* y *LptD@AuNPs(1:4)*. Estos espectros fueron utilizados para confirmar la presencia del antígeno de LptD sobre las AuNPs. Ambos espectros presentan bandas muy similares en todo el rango de energía. Las bandas centradas en 1321 y 1458 cm^{-1} , pueden ser asignadas a vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico de los iones carboxilato. Las localizadas alrededor de 1644 y 1651 cm^{-1} , pertenecientes a los grupos aminos I de los péptidos, así como también las centradas en 3400 y 2895 cm^{-1} que indican la presencia de grupos $-\text{NH}_2$ y del grupo $-\text{OH}$ de la tirosina. (Si & Mandal, 2006; Slocik et al., 2005).

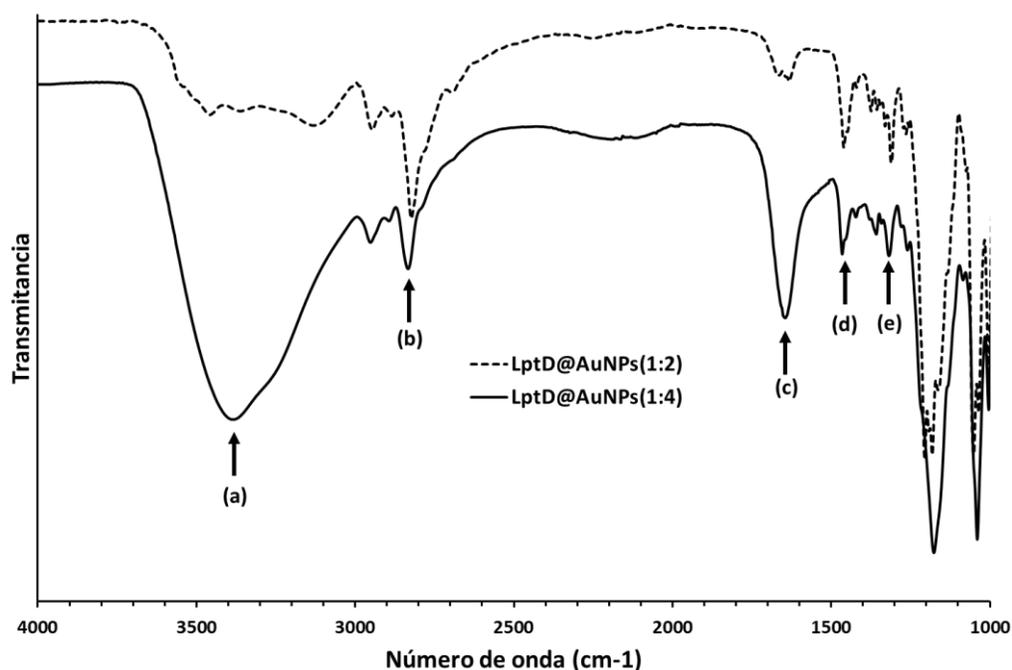


Figura 8. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de las soluciones *LptD@AuNPs(1:2)* y *LptD@AuNPs(1:4)*, sintetizadas con el péptido de LptD como agente reductor y estabilizador. El punto (a) corresponde a 1321 cm^{-1} , el punto (b) a 1458 , punto (c) a 1644 cm^{-1} , punto (d) a 2895 cm^{-1} y punto (e) a 3400 cm^{-1} .

7.1.5 Espectroscopía de Fotones Emitidos por Rayo X (XPS)

7.1.5.1 Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador

(soluciones *cis@AuNPs*)

En la figura 9 se presentan los espectros de alta resolución de los elementos oro, carbono, nitrógeno y oxígeno obtenidos de la muestra *cis@AuNPs-S5*. Los dos picos que se detectan en la figura 9(A) a energías de enlace de 83.8 y 87.5 eV están asociadas a las señales $4f_{7/2}$ y $4f_{5/2}$ que corresponden al oro metálico (Au^0) (Dodero et al., 2000). En la figura 9(B) se puede apreciar un pico poco intenso en la región 1s del carbono entre 283 y 288 eV, asociado a la presencia de grupos que contiene enlace sencillo carbono-carbono/carbono-hidrógeno (~ 285.4 eV) así como carbono-nitrógeno/carbono-oxígeno (~ 286.4 eV) (Dodero et al., 2000 y Vlad et al., 2014). Asimismo, el pico de baja intensidad detectado a 398.2 eV relacionado con la señal 1s del nitrógeno, ver figura 9(C), se atribuye al enlace oro-cianuro ($\sim 397.9 - 398.6$ eV) (Cano et al., 2019 y Cook et al., 1989), confirmando la existencia de enlace carbono-nitrógeno mencionado previamente para el espectro del carbono. Por otro lado, el pico intenso y bien definido en la región de 530 a 534 eV (centrado a 532.4 eV) está relacionado con la señal 1s del oxígeno, ver

figura 9(D). Sin embargo, de acuerdo con las señales detectadas en los espectros de carbono y nitrógeno, para la muestra *cis@AuNPs-S5* se descarta (o es mínima) la presencia de especies oxígeno-carbono y/u oxígeno-nitrógeno. Por lo tanto, la señal intensa detectada en la región de 530 a 534 eV podría asociarse principalmente a las interacciones oro-oxígeno. Con base en los espectros presentados, el porcentaje atómico estimado es 66.7, 24.1 y 9.2 para el oro, carbono y nitrógeno, respectivamente.

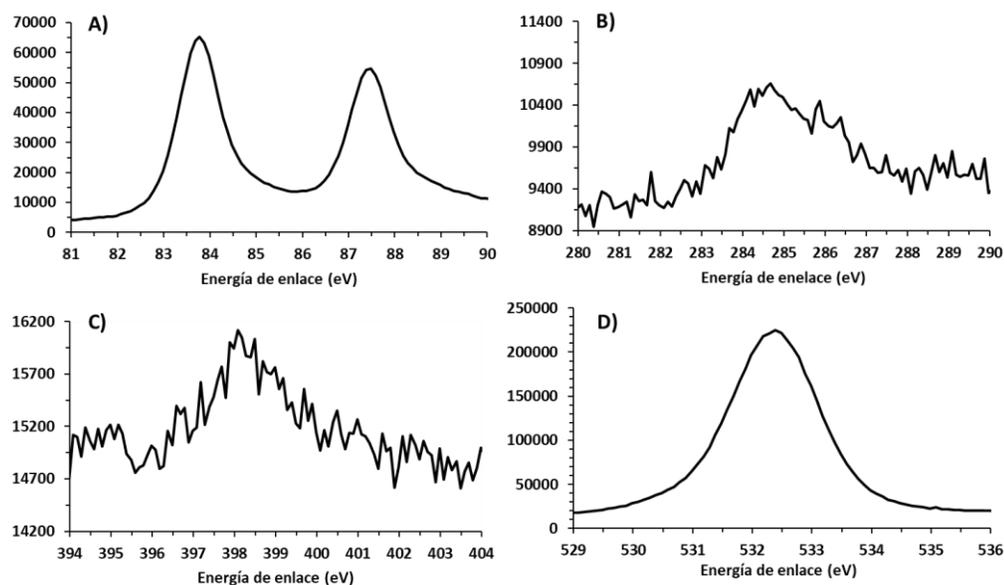


Figura 9 Espectros de alta resolución de XPS de los elementos presentes en la solución *cis@AuNPs-S5* sintetizada con cisteína como agente estabilizador. A) Espectro del elemento oro (Au). B) Espectro del elemento carbono (C). C) Espectro del elemento nitrógeno (N). D) Espectro del elemento oxígeno (O).

En la figura 10 se presentan los espectros de alta resolución de los elementos oro, carbono, nitrógeno y oxígeno obtenidos para la muestra *cis@AuNPs-S6*. Como se puede observar, todos los espectros son similares en comparación con la muestra *cis@AuNPs-S5*, presentando prácticamente las mismas energías de enlace. Por lo tanto, ambas muestras poseen una superficie similar en términos de composición química elemental, la única diferencia que puede observarse es que todos los espectros de la muestra *cis@AuNPs-S6* son ligeramente menos intensos que los correspondientes para *cis@AuNPs-S5*. Con base en los espectros presentados, el porcentaje atómico estimado es 51.3, 33.8 y 14.9 para el oro, carbono y nitrógeno, respectivamente.

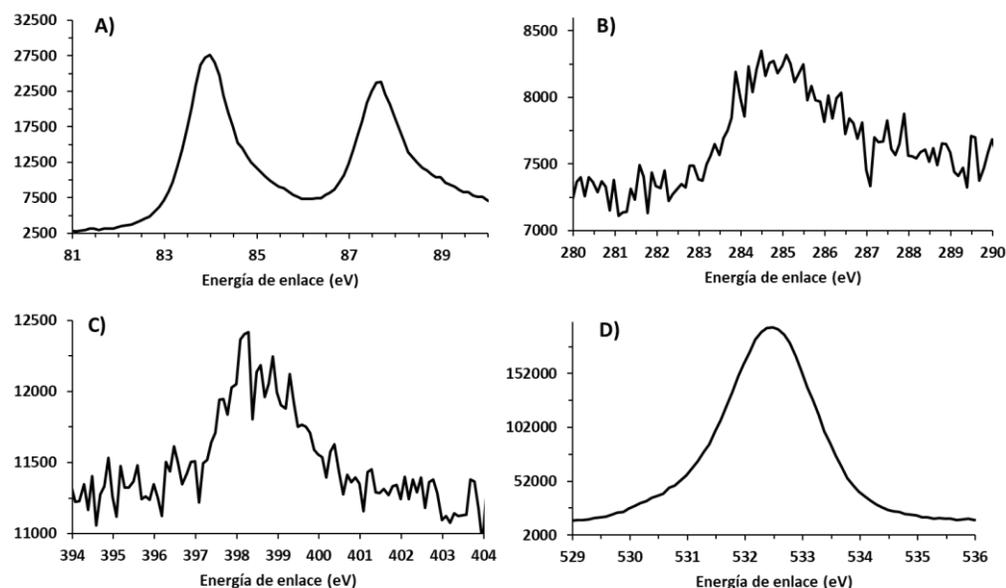


Figura 10 Espectros de alta resolución de XPS de los elementos presentes en la solución *cis@AuNPs-S6* sintetizada con cisteína como agente estabilizador. A) Espectro del elemento oro (Au). B) Espectro del elemento carbono (C). C) Espectro del elemento nitrógeno (N). D) Espectro del elemento oxígeno (O).

7.1.5.2 Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD (soluciones LptD@AuNPs)

En la figura 11 se presentan los espectros de alta resolución de los elementos oro, carbono, nitrógeno y oxígeno obtenidos para la muestra *LptD@AuNPs(1:2)*. En el espectro mostrado en la figura 11(A) se observan los dos picos definidos correspondientes al oro metálico (83.5 y 87.2 eV) y junto a ellos otros dos picos bien definidos y de mayor intensidad a 84.9 y 88.6 eV correspondientes a las señales $4f_{7/2}$ y $4f_{5/2}$ del oro en estado de oxidación 1^+ . La figura 11(B) muestra la señal 1s del carbono, en la cual se observa el pico a 284.8 eV relacionado con la presencia de carbono con enlace sencillo carbono-carbono/carbono-hidrógeno (~ 285.4 eV), mientras que, considerando la forma del pico es muy probable la presencia de grupos carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno y carbono-azufre ($\sim 286 - 288$ eV) (Dodero et al., 2000 y Vlad et al., 2014). El espectro correspondiente a la señal 1s del nitrógeno, ver figura 11(C), muestra un pico definido y simétrico en la región entre aproximadamente 396.5 y 400.5 eV (centrado a 398.8 eV) lo cual coincide con la presencia de la especie oro-cianuro ($\sim 397.9 - 398.6$ eV). La figura 11(D) presenta el espectro del oxígeno, en la cual el pico entre 529 y 533.5 eV corresponde a la señal 1s

y el pico entre 533.5 y 538.5 eV se deriva de la señal *Auger KLL* del sodio. Con base en los espectros presentados, el porcentaje atómico estimado para el oro, carbono y nitrógeno es 2.5, 78.7 y 18.8, respectivamente. Este resultado sugiere que las nanopartículas de oro probablemente se encuentran recubiertas por capa(s) nanométricas del péptido de LptD, por consiguiente, la detección del compuesto orgánico es mayor en comparación con el oro.

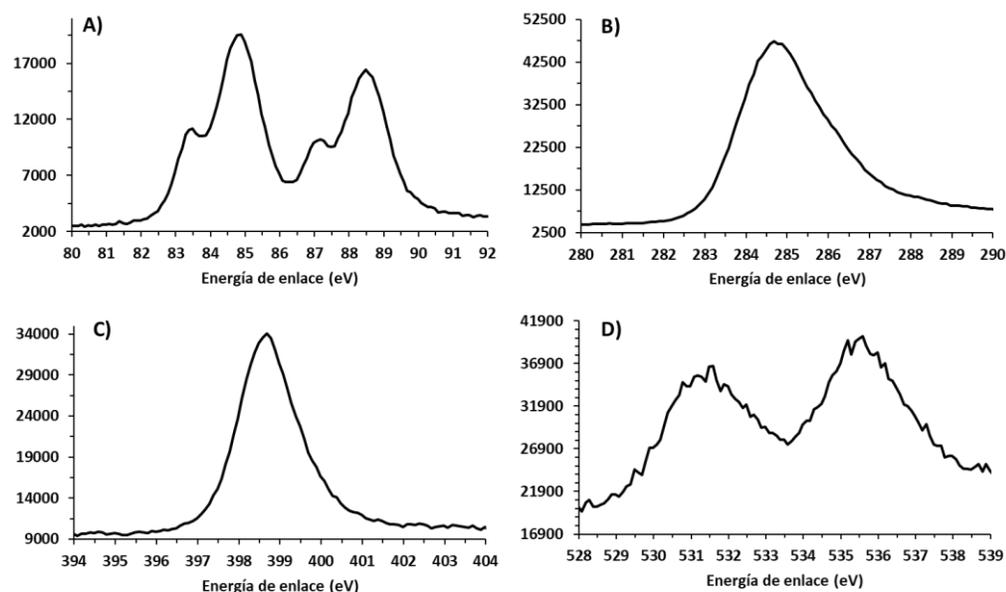


Figura 11 Espectros de alta resolución de XPS de los elementos presentes en la solución *LptD@AuNPs(1:2)* sintetizada con el péptido de LptD como agente reductor y estabilizador. A) Espectro del elemento oro (Au). B) Espectro del elemento carbono (C). C) Espectro del elemento nitrógeno (N). D) Espectro del elemento oxígeno (O).

La figura 12 presenta los espectros de alta resolución de los elementos oro, carbono, nitrógeno y oxígeno obtenidos para la muestra *LptD@AuNPs(1:4)*. De acuerdo con la figura 12(A) se tienen cuatro picos bien definidos que son asignados al oro metálico (83.5 y 87.2 eV) y al oro con estado de oxidación 1^+ (84.9 y 88.6 eV), en este caso la intensidad de los picos del oro metálico es ligeramente mayor a los del oro 1^+ , lo cual es contrario a lo observado en la muestra *LptD@AuNPs(1:2)*, (ver figura 11(A)). Es decir, la muestra *LptD@AuNPs(1:4)* contiene una mayor proporción de oro metálico, mientras que en la muestra *LptD@AuNPs(1:2)* la especie oro 1^+ predomina. El porcentaje atómico estimado es 2.0, 79.3 y 18.7 para el oro, carbono y nitrógeno, respectivamente, siendo muy similar a lo encontrado para la muestra *LptD@AuNPs(1:2)*, y por consiguiente se puede asumir el mismo efecto asociado con la

presencia de capas nanométricas del péptido de LptD adsorbidas en la superficie de las nanopartículas de oro.

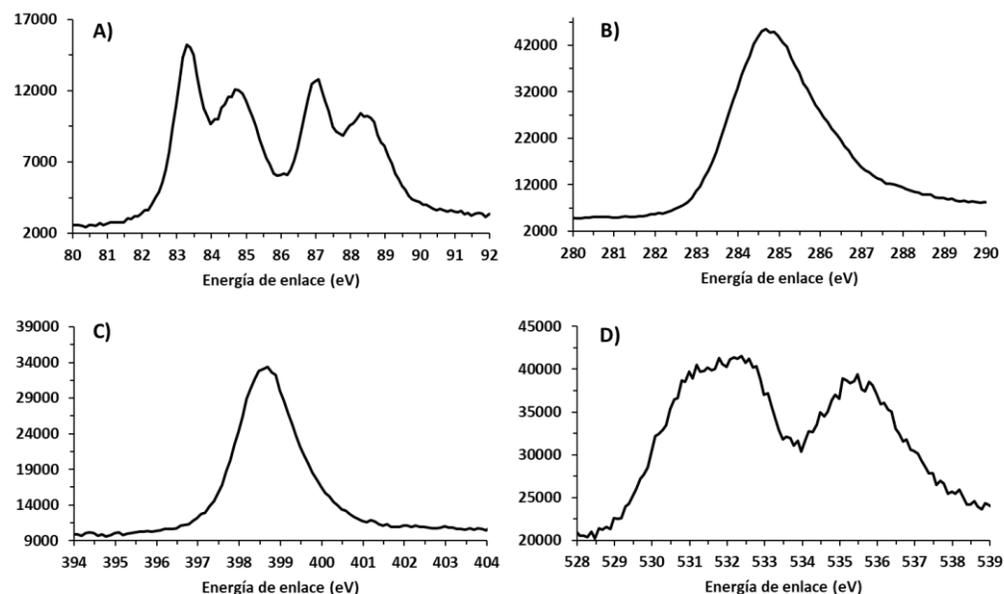


Figura 12 Espectros de alta resolución de XPS de los elementos presentes en la solución *LptD@AuNPs(1:4)* sintetizada con el péptido de LptD como agente reductor y estabilizador. A) Espectro del elemento oro (Au). B) Espectro del elemento carbono (C). C) Espectro del elemento nitrógeno (N). D) Espectro del elemento oxígeno (O).

7.1.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

7.1.6.1 Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador (soluciones *cis@AuNPs*)

En la Figura 13 se muestra la distribución de tamaño de las AuNPs de la solución *cis@AuNP-S5* y una micrografía obtenida de la misma. Se observa que la dispersión del tamaño se encuentra entre los 20 a 24 nm de diámetro, encontrando nanopartículas esféricas y algunos aglomerados resultantes de la deshidratación de la muestra.

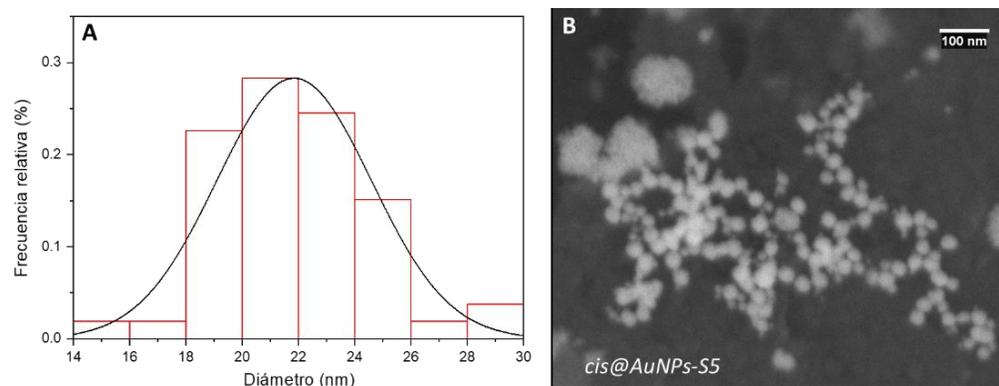


Figura 13. Distribución de tamaño y micrografía SEM de las AuNPs obtenidas de la solución *cis@AuNPs-S5* mediante la síntesis con el Método I, empleando cisteína como agente estabilizador. **A)** Distribución de diámetro de las AuNPs de la solución *cis@AuNPs-S5*, donde se observa el valor máximo de la distribución en ~ 22 nm de diámetro. **B)** Micrografía SEM de la solución *cis@AuNPs-S5* a $100\ 000\times$. Las muestras fueron deshidratadas para su medición sobre sustratos de aluminio.

En la figura 14 se presenta la distribución de tamaño de las AuNPs de la solución *cis@AuNP-S6* que se encuentra en el rango de 35 a los 50 nm, con un porcentaje de frecuencia relativa más alto para 40 nm. Asimismo, se muestra una micrografía donde se observan AuNPs esféricas y uniformes en tamaño.

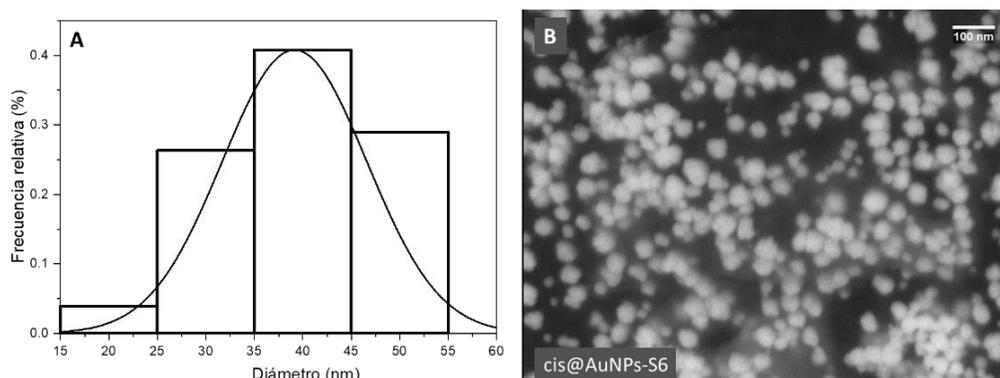


Figura 14. Distribución de tamaño y micrografía SEM de las AuNPs obtenidas de la solución *cis@AuNP-S6* mediante la síntesis con el Método I, empleando cisteína como agente estabilizador. **A)** Distribución de diámetro de las AuNPs de la solución *cis@AuNP-S6* donde se observa el valor máximo de la distribución en ~ 40 nm de diámetro. **B)** Micrografía SEM de la solución *cis@AuNP-S6* a $100\ 000\times$. Las muestras fueron deshidratadas sobre un sustrato de aluminio para ser medidas en el microscopio.

7.1.6.2 Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD (soluciones LptD@AuNPs)

En la Figura 15 se muestran las micrografías SEM obtenidas de las soluciones sintetizadas con el Método II, empleando el antígeno de LptD como agente estabilizante y reductor. Las imágenes obtenidas muestran AuNPs monodispersas cubiertas por material orgánico. No fue posible presentar una distribución de tamaño debido a que el haz de electrones empleado por el equipo dañó la solución.

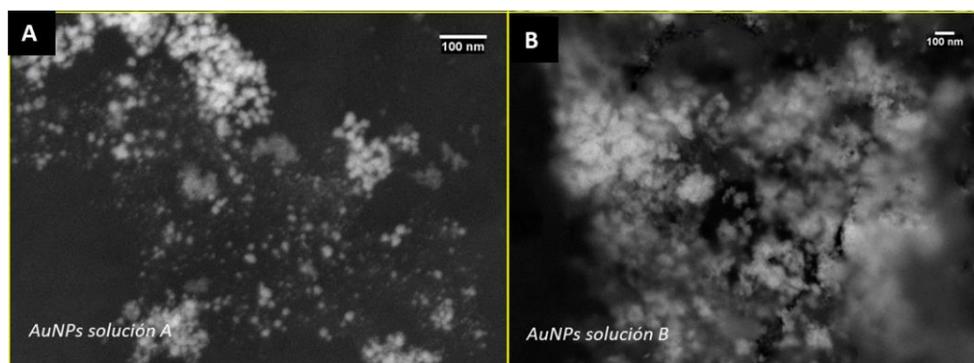


Figura 15. Micrografías SEM de las AuNPs obtenidas de las soluciones *LptD@AuNP(1:2)* y *LptD@AuNP(1:4)* mediante la síntesis con el Método II, empleando el antígeno de LptD como agente reductor y estabilizador. **A)** Micrografía SEM de la solución *LptD@AuNP(1:2)* (0.2:0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; péptido:oro) a 50 000 x. **B)** Micrografía SEM de la solución *LptD@AuNP(1:4)* (0.2:0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; péptido:oro) a 100 000 x. Las muestras fueron deshidratadas sobre un sustrato de aluminio para ser medidas en el microscopio.

7.1.7 Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)

7.1.7.1 Método I: Síntesis de AuNPs con Cisteína como agente estabilizador.

En la figura 16 se muestra la gráfica obtenida con la técnica de EDS, en la cual podemos observar un análisis elemental de la muestra *cis@AuNPs-S6*, esta solución es representativa del sistema *cis@AuNPs* donde la cisteína es empleada como agente estabilizador.

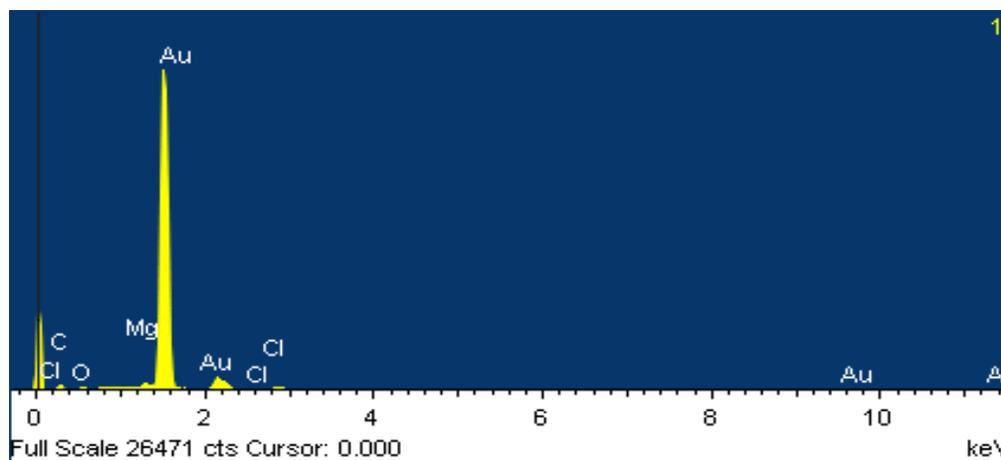


Figura 16. Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) del sistema *cis@AuNPs*. Estas AuNPs fueron sintetizadas con el Método I, empleado cisteína como agente estabilizador

En la tabla VI se presentan los porcentajes de los elementos presentes en la muestra *cis@AuNPs-S6*, representativa del sistema de síntesis donde se empleó la cisteína como agente estabilizador.

Tabla VI Porcentajes elementales de EDS obtenidos del sistema *cis@AuNPs*.

Elemento	% atómico	% peso
Carbono (C)	27.09	64.45
Oxígeno (O)	10.86	19.39
Magnesio (Mg)	5.74	6.75
Cloro (Cl)	1.87	1.51
Oro (Au)	54.43	7.90
Total	100	100

7.1.7.2 Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD

En la figura 17 se muestra la gráfica obtenida con la técnica de EDS, en la cual podemos observar un análisis elemental de la muestra *LptDAuNPs(1:2)*, esta solución es representativa del sistema *LptDAuNPs*, donde el péptido de LptD es empleado como agente reductor y estabilizador.

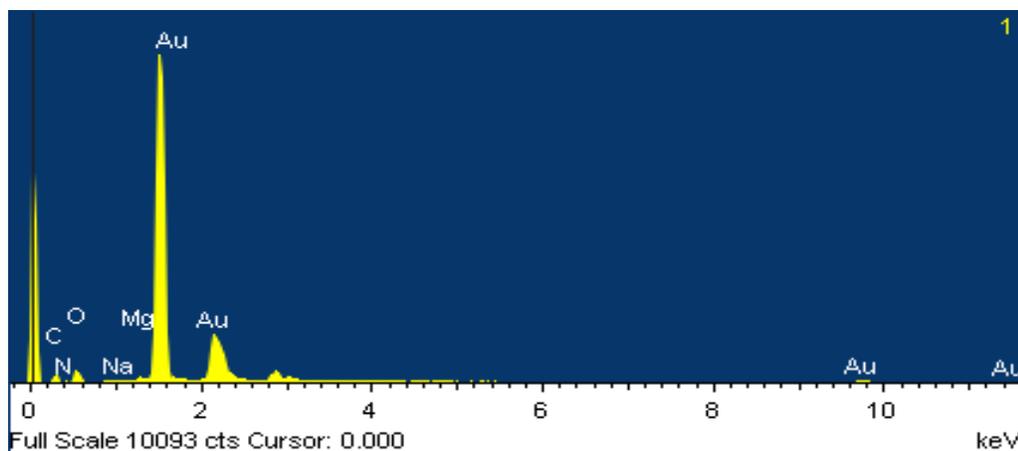


Figura 17. Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) del sistema *LptDAuNPs*. Estas AuNPs fueron sintetizadas con el Método II, empleado al antígeno de LptD como agente reductor y estabilizador.

En la tabla VII se presentan los porcentajes de los elementos presentes en la muestra *LptD@AuNPs*, representativa del sistema de síntesis donde se empleó el péptido de LptD como agente reductor y estabilizador.

Tabla VII. Porcentajes elementales de EDS obtenidos del sistema *LptD@AuNPs*

Elemento	% atómico	% peso
Carbono (C)	14.76	37.96
Magnesio (Mg)	1.41	1.79
Nitrógeno (N)	7.18	15.84
Sodio (Na)	0.56	0.75
Oro (Au)	58.20	9.13
Total	100	100

7.1.8 Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)

7.1.8.1 Método I: Síntesis de AuNPs con cisteína como agente estabilizador

(soluciones *cis@AuNPs*)

En la Figura 18 se observan las AuNPs obtenidas de la solución *cis@AuNPs-S5*. Las AuNPs presentaron una forma esférica con un diámetro aproximado de 25 nm. Las AuNPs presentaron estabilidad en su superficie ya que no se observó aglomeración.

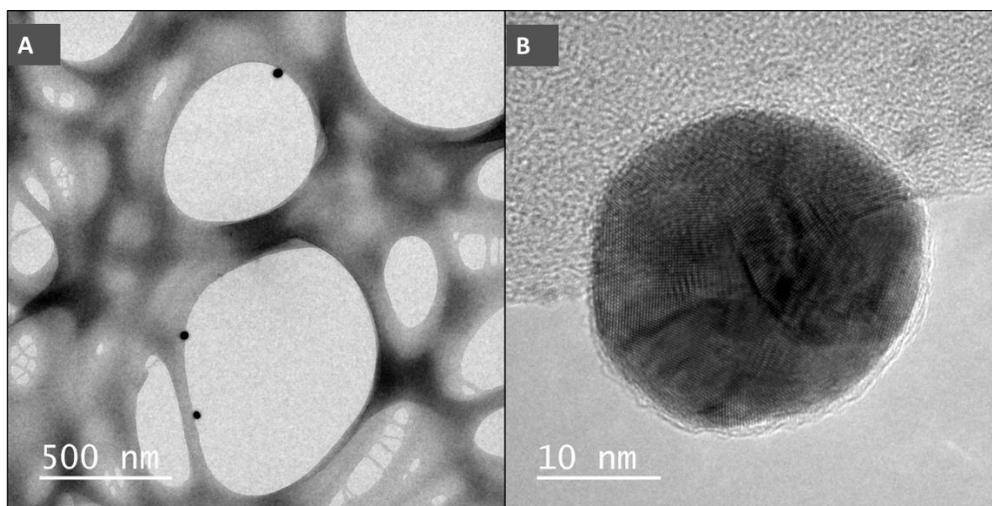


Figura 18. Micrografías HRTEM de las AuNPs obtenidas de la solución *cis@AuNPs-S5* mediante la síntesis con el Método I, empleando cisteína como agente estabilizador. **A)** Micrografía de la solución *cis@AuNPs-S5* a 50 000 x **B)** Micrografía HRTEM de la solución *cis@AuNPs-S5* a 100 000 x. Las muestras se deshidrataron sobre una rejilla de cobre para ser medidas en el microscopio

En la figura 19 se observan las AuNPs obtenidas de la solución *cis@AuNPs-S6*. Las AuNPs presentaron una forma esférica con un diámetro aproximado de 30 nm. Las AuNPs presentaron estabilidad en su superficie ya que no se observó aglomeración.

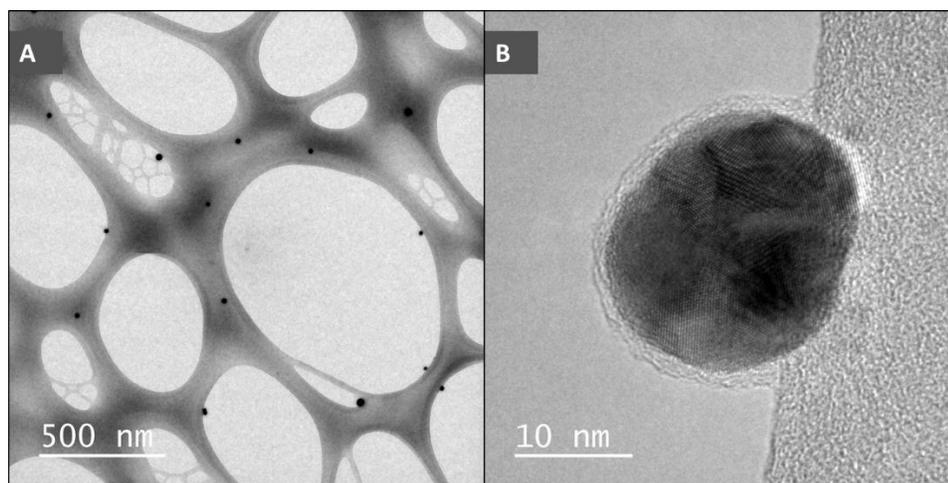


Figura 19. Micrografías HRTEM de las AuNPs obtenidas de la solución *cis@AuNPs-S6* mediante la síntesis con el Método I, empleando cisteína como agente estabilizador. **A)** Micrografía HRTEM de la solución *cis@AuNPs-S6* a 50 000 x **B)** Micrografía HRTEM de la solución *cis@AuNPs-S6* a 100 000 x. Las muestras se deshidrataron sobre una rejilla de cobre para ser medidas en el microscopio.

7.1.8.2 Método II: Síntesis de AuNPs con el péptido de la proteína LptD (soluciones *LptD@AuNPs*)

En la Figura 20 se muestran las AuNPs obtenidas a partir del Método II de síntesis, dónde se utilizó al antígeno de LptD como agente reductor y estabilizador. Las AuNPs obtenidas del sistema *LptD@AuNPs(1:2)* presentaron un diámetro promedio de 25 nm (Figura 7 A) y las AuNPs del sistema *LptD@AuNPs(1:4)* presentaron un diámetro de 10 nm. (Figura 7 B).

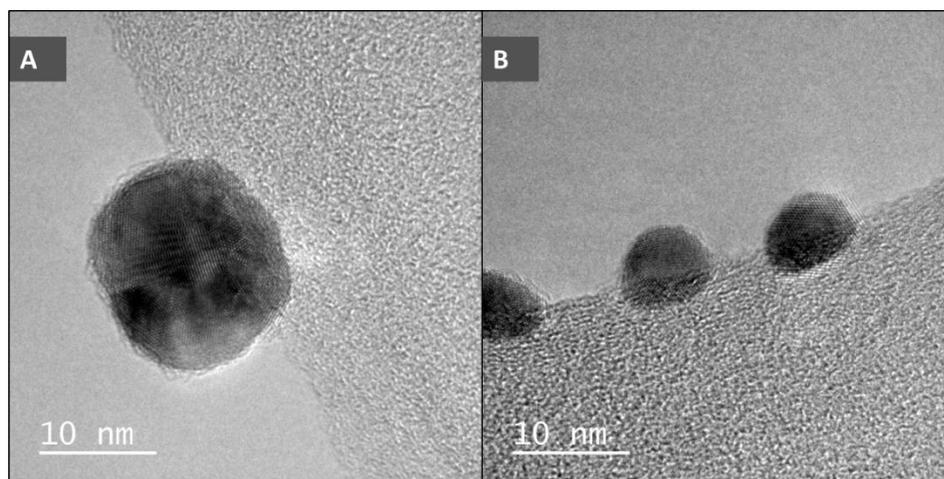


Figura 20. Micrografías HRTEM obtenidas de la solución *LptD@AuNPs* mediante la síntesis con el Método II, empleando el antígeno de LptD como agente reductor y estabilizador. **A)** Micrografía HRTEM de la solución *LptD@AuNPs*(1:2) a 50 000 x **B)** Micrografía HRTEM de la solución *LptD@AuNPs*(1:4) a 50 000 x. Las muestras se deshidrataron sobre una rejilla de cobre para ser medidas en el microscopio.

7.2 Ensayos Biológicos

7.2.1 Prueba de Viabilidad y Citotoxicidad celular

En la Figura 21 se muestra el porcentaje de viabilidad celular obtenido para cada uno de los tratamientos, los cuáles fueron: HEPES (0.1 M) como control positivo, *cis@AuNPs-S5*, *cis@AuNPs-S6*, *LptD@AuNPs*(1:2), *LptD@AuNPs*(1:4), péptido de LptD a una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y DMSO como control negativo.

Los grupos *LptD@AuNPs*(1:4) y LptD a una concentración del péptido de LptD 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ mostraron diferencia significativa con respecto al control. En el caso del tratamiento *LptD@AuNPs*(1:4) se observa una viabilidad celular menor al 80% y en el tratamiento del péptido de LptD 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se determinó un porcentaje mayor al 100%, es decir una proliferación celular.

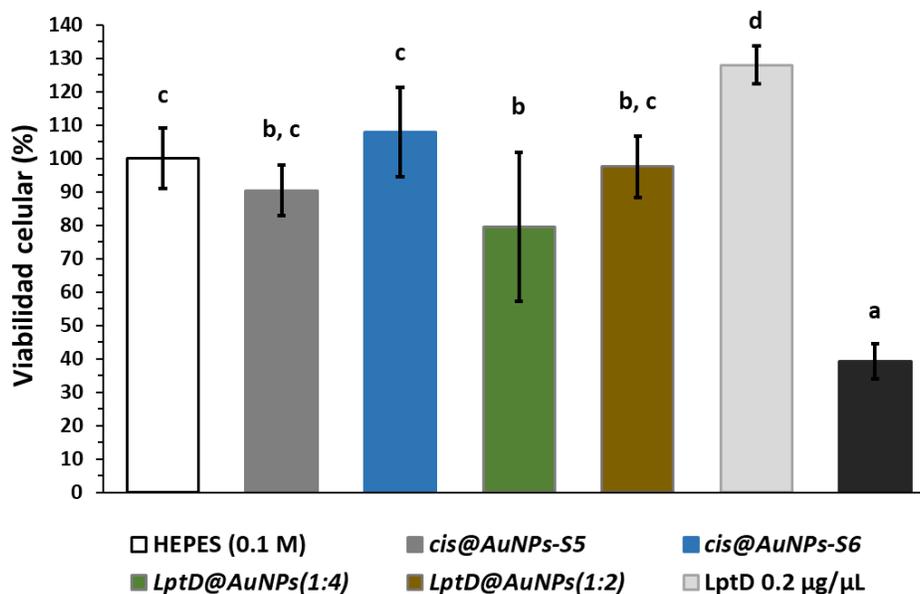


Figura 21 Gráfico de porcentaje de viabilidad celular a las 24 h. de exposición a los tratamientos HEPES (0.1 M) como control positivo y como control negativo se empleó DMSO;

8. DISCUSIÓN

8.1 Síntesis de Nanopartículas de Oro (AuNPs)

Las AuNPs son sintetizadas químicamente mediante reacciones de óxido reducción. Estas reacciones consisten en reducir el oro catiónico (Au^{3+}) de sales de oro a oro metálico (Au^0) empleando agentes reductores y surfactantes como el citrato de sodio (Turkevich et al, 1985). El método de Turkevich ha sido el más utilizado debido a su sencillez, del cual se obtienen AuNPs con Potencial Z negativo que es un parámetro que repercute en la toxicidad y estabilidad de las NPs en sistemas biológicos (Saptarshi 2013). Sin embargo, las AuNPs con Potencial Z positivo tienen mayor aplicación biológica porque son más afines a proteínas y ácidos nucleicos (Gratton et al 2008). En este sentido, la síntesis y funcionalización de AuNPs con ciertos aminoácidos ha resultado viable debido a su afinidad biológica porque el grupo amino le confiere carga positiva (Ramírez-Camacho et al., 2014; Jiangeng Guo et al., 2015). Por lo anterior en este trabajo se plantearon dos métodos de síntesis química de AuNPs. En el Método I, la sal de oro fue reducida por Hidroxilamina y estabilizada con cisteína para obtener AuNPs con potencial Z positivo. La afinidad que tiene el grupo sulfhidrilo (SH) de la cisteína por el oro le confiere estabilidad a la NP ante cambios de pH (Petean et al, 2008). En el Método II, el Au^{3+} del HAuCl_4 es reducido a oro metálico empleando el péptido de la proteína LptD. Este péptido, de 15 aminoácidos, contiene una Tirosina cuyo grupo R es un benceno con resonancias responsables de interactuar con el oro hasta reducirlo (Slocik et al, 2005). En comparación con otras síntesis donde se han empleado péptidos para la reducción de oro (Toroz y Corni, 2011), en este trabajo se resalta que el péptido empleado ha demostrado tener potencial inmunogénico e inmunoprotector contra *Vibrio parahaemolyticus* (Zha et al., 2016). Por lo tanto, este sistema presenta las características de una vacuna potencial a base de oro y no solo para la formación de la AuNP.

8.2 Caracterización de AuNPs

8.2.1 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible

Esta técnica se realizó con la finalidad de medir el plasmón superficial de las soluciones *cis@AuNPs* y *LptD@AuNPs* que se manifiesta por una banda de absorción en el espectro óptico visible (Reeves et al., 2010). Los picos de absorbancia se encontraron entre 525 y 550 nm, similar al de nanopartículas de oro esféricas (~520 nm) (Haiss et al., 2007; Njoki et al., 2007). Particularmente, en todas las soluciones del sistema *cis@AuNPs*, (soluciones *cis@AuNPs-Seed - cis@AuNPs-S6*) las AuNPs esféricas tuvieron tamaños entre los 2 a 56 nm. Guo y colaboradores

(2015) reportaron AuNPs sintetizadas con cisteína como agente estabilizador empleando soluciones precursoras como semillas de soluciones precedentes (un total de 12 soluciones) con las cuales fue posible modular el tamaño de partícula en un rango de entre de 2 a 46 nm en las primeras 6 soluciones de AuNPs. Por otra parte, las soluciones del sistema *LptD@AuNPs* a diferentes concentraciones de oro (1:2 y 1:4) presentaron nanopartículas de 40 y 50 nm, respectivamente. En el año 2005, Slocik y colaboradores sintetizaron AuNPs empleando péptidos cuyas estructuras poseían aminoácidos cíclicos en sus secuencias, obteniendo diámetros entre los 12 y 14 nm. Esos tamaños fueron significativamente menores a los presentados en este trabajo, dadas las diferencias de concentraciones de sales de oro utilizadas, (Yu et al, 2010) así como el origen del péptido, sus parámetros fisicoquímicos y la concentración de solvente en la solución (Bhattacharjee et al, 2005).

8.2.2 Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES)

El propósito de esta técnica es saber realmente la cantidad de oro que forman las nanopartículas. Con este dato se determinan otros dos parámetros: el rendimiento de la reacción y las dosis de oro empleadas para los ensayos biológicos. El porcentaje real de rendimiento se determinó en la reacción de oxidación-reducción establecida entre las sales de oro con la hidroxilamina y su posterior estabilización con la cisteína, en el caso del sistema *cis@AuNPs*. Las soluciones *cis@AuNPs-S5* y *cis@AuNPs-S6* presentaron rendimientos de reacción del oro bastantes bajos (4.33%), esto debido a la pérdida y error matemático generados en el cálculo de las concentraciones finales de cada una de las siete soluciones sintetizadas mediante el Método II (Ver Anexo A). El rendimiento, en consecuencia, debe ser calculado por reacción y no generalizado. Es decir, cada solución (*cis@AuNPs-Seed*, *cis@AuNPs-S1*, *cis@AuNPs-S2*, *cis@AuNPs-S3*, *cis@AuNPs-S4*, *cis@AuNPs-S5*, *cis@AuNPs-S6*) posee un rendimiento individual total que es influenciado por la concentración inicial de agente reductor y sales de oro empleadas en cada etapa de la síntesis (Majzik et al., 2009).

En el sistema *LptD@AuNPs*, el rendimiento de reacción real calculado se estableció en la interacción óxido-reductora de las sales de oro con el anillo fenólico de la Tirosina perteneciente a la estructura del péptido de *LptD*. El rendimiento real obtenido en la solución

LptD@AuNPs(1:2) es de 83.33%, considerado aceptable comparado con el método de Turkevich que ha reportado eficiencias de hasta 95% (Dong et al., 2019).

8.2.3 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

8.2.3.1 Diámetro Hidrodinámico

Con esta técnica se observó el diámetro hidrodinámico a diferentes pHs de solución que presentaban las AuNPs que fueron sintetizadas mediante los métodos I y II. El tamaño de las NPs de las soluciones *cis@AuNPs-S5* y *cis@AuNPs-S6* que corresponden al Método I, es afectado por el pH de la solución. En condiciones de medio ácidas (pH de 2, 3 y 5) el tamaño de las AuNPs no sufrió grandes modificaciones, dado que el pH final de las soluciones después de la síntesis y estabilización de las AuNPs fue de ~3. Además, en presencia de gran concentración de protones, las AuNPs no se vieron afectadas estructuralmente porque los dos grupos funcionales libres de la cisteína que estabilizó las AuNPs son el grupo amino (NH_3) y grupo carbonilo (COO^-). El grupo amino no sufre una protonación dado que el nitrógeno se encuentra en estado de oxidación -3, hibridado con 3 átomos de hidrógeno. Así, este grupo conserva su carga catiónica (+) y repele las posibles interacciones con grupos carboxilos de la superficie de otras nanopartículas dispersas en la solución (Guerrero et al., 2012). Para el grupo carbonilo, el exceso de protones da lugar a la formación de un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) que no tiende a interactuar o asociarse a grupos aminos debido a su naturaleza catiónica, evitándose una posible aglomeración que pueda detectarse como nanopartículas de mayor tamaño por el equipo (Bhattacharjee et al., 2005). Por otra parte, en pH de 7 (neutro) la concentración de protones en el medio fue más baja que la concentración inicial una vez concluida la síntesis y estabilización de las AuNPs con cisteína, por lo cual el grupo NH_3 tiende a interactuar con el COO^- generando aglomeración que es detectada como AuNPs de mayor tamaño por el equipo. En pH básico (9 y 11) la concentración de protones es aún menor que en pH neutro, los grupos COO^- tienden a robar fácilmente hidrógenos de los grupos NH_3 debido a la electronegatividad de los oxígenos. Por su parte, el nitrógeno de los NH_3 cambia su estado de oxidación a positivo, haciendo difícil la interacción carboxilo-amina, por lo que el tamaño de las NPs se percibe sin súbitos cambios según el equipo (Haiss et al., 2007). Los mecanismos descritos son explicados en el Anexo B de este documento.

Las soluciones *LptDAuNPs(1:2)* y *LptDAuNPs(1:4)* correspondientes al Método II de síntesis, tienen un comportamiento diferente en el diámetro hidrodinámico que las soluciones con cisteína,

principalmente por la gran cantidad de grupos amino y carbonilo presentes en la estructura del péptido de LptD anclado a la superficie de la AuNP. En pH 2, las AuNPs presentaron un tamaño mayor que el que poseen en condiciones normales al ser sintetizadas y estabilizadas (pH 5); al existir alta concentración de protones en el medio algunos grupos carbonilo del péptido dan paso a grupos carboxilo, y no todos los grupos carbonilos se protonan ya que la posición en el espacio y nubes electrónicas de los elementos presentes en la estructura son susceptibles a impedir que un hidrógeno llegue a hibridarse libremente con oxígenos disponibles (Ma & Han, 2008). Por lo tanto, los carbonilos disponibles si son capaces de establecer enlaces con grupos amino de la estructura del péptido anclado a las muchas AuNPs dispersas en solución; ya que electronegativamente los grupos NH_3 son capaces de formar enlaces peptídicos con los COO^- considerados enlaces fuertes que dan lugar a la aglomeración de péptidos unidos a AuNPs provocando que el equipo detecte NPs de mayor longitud (Mocanu et al., 2009). Asimismo, al disminuir la concentración de protones en el medio (pH 5, 7, 9 y 11), el mecanismo antes mencionado en concentraciones ácidas no se llevó a cabo, ya que las AuNPs permanecieron estables presentando variaciones de tamaño imperceptibles por el equipo.

8.2.3.2 Potencial Z

Las soluciones *cis@AuNPs-S5* y *cis@AuNPs-S6* presentan carga positiva gracias al grupo NH_3 de la cisteína. Después de la síntesis, el aminoácido estabilizador cuenta con 2 grupos funcionales libres: grupo carbonilo y grupo amino. Lo anterior es debido a que el tercer grupo "R" ($-\text{CH}_2-\text{SH}$), característico de la cisteína en su forma pura, establece un enlace covalente sulfhidrilo con la superficie de la NP dada la afinidad del azufre por el oro (Li et al., 2006; Chou et al., 2014; Xia et al., 2015), por lo que se encuentra sin posibilidades de interactuar en el medio. En pH ácidos (2, 3, 5) y neutro (7), la carga de las AuNPs tuvo Potencial Zeta positivo debido a que la alta concentración de protones no afecta al grupo amino responsable de proveer a la NP de carga superficial positiva; a mayor concentración protónica en el medio, el Potencial Zeta será más electropositivo (Raj et al., 2015). En pH básicos (9,11), las AuNPs adoptan carga negativa porque los hidróxidos (OH) dispersos en el medio afectan al grupo NH_3^+ (Woods & Huestis, 2000). Al interactuar el hidroxilo con el amino, da lugar al compuesto hidróxido de amonio (NH_4OH); mientras que la formación de agua (H_2O) por la interacción de dos grupos OH dará lugar a una baja liberación de H^+ (Piryazev et al., 2013). Éstos tienden a formar el ion amonio en la superficie de la AuNP, que correspondía al grupo amino. Posteriormente, la formación de NH_4OH produce la pérdida de Potencial Zeta positivo ya que el grupo NH_3 ha ganado protones e

interaccionado con un anión (OH^-) (Cao et al., 2005); el Potencial Zeta de la AuNP será más electronegativo a mayores concentraciones de aniones en el medio, es decir, a pHs más básicos, la NP presentará una carga negativa más alta.

Para las soluciones *LptD@AuNPs(1:2)* y *LptD@AuNPs(1:4)*, el Potencial Zeta de las AuNPs estuvo influenciado por el punto isoeléctrico del péptido de LptD (3.79). Por ese valor, en condiciones de gran acidez (pH 2), el Potencial zeta fue positivo, pero en pH 3, cercano al punto isoeléctrico del péptido, el Potencial Zeta fue altamente negativo. En pHs 5,7,9 y 11, la AuNP adoptó Potencial Zeta negativo influenciado por la concentración de grupos hidroxilo que interacciona con los grupos aminos libres en la estructura del péptido que se encuentran en la tirosina y triptófano posicionados en los extremos de la secuencia.

8.2.4 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Con los espectros obtenidos se pudo confirmar la estabilización de las AuNPs con la cisteína en el caso de las soluciones *cis@AuNPs-S6* y *cis@AuNPs-S5*. Para ambos espectros, son evidentes las bandas correspondientes a los carboxilatos y aminas primarias que confirman la presencia de cisteína (Adochitei & Drochooiu, 2010). Las bandas centradas entre 1300 y 1600 cm^{-1} , corresponden a las vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos COO^- , mientras que las bandas centradas a 1530 cm^{-1} y las formadas entre 3000 y 3500 cm^{-1} , son usualmente asignadas al estiramiento de los grupos NH_3^+ (Ma & Han, 2008). Por otra parte, también es importante mencionar la ausencia de la banda S-H (centrada en 2550 cm^{-1}) en ambos espectros, confirmando la interacción S-Au y por lo tanto la estabilidad que la nanopartícula adopta gracias a la cisteína (Aryal et al., 2006; Chou et al., 2014)

Con los espectros FTIR para las muestras *LptD@AuNPs(1:2)* y *LptD@AuNPs(1:4)* se confirmó la presencia del antígeno de LptD sobre las AuNPs. Ambos espectros presentaron bandas muy similares en todo el rango de energía. Las bandas situadas en 1321 , 1458 y 1644 cm^{-1} corresponden a vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico de los iones COO^- (Si & Mandal, 2007). Las localizadas en 2895 cm^{-1} pertenecen a los grupos de aminas I (aminas primarias) y aquellas bandas localizadas en 3400 cm^{-1} a aminas II (aminas secundarias) y grupos (NH_3^+) de la estructura del péptido de LptD (Slocik et al., 2005). Al existir estos dos tipos de aminas se comprobó que el péptido sigue preservando su estructura ya que aminas secundarias

dan lugar a la interacción del grupo amino con otros grupos funcionales y esto se dedujo por las bandas encontradas del grupo carboxilo.

8.2.5 Espectroscopía de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS)

En los espectros de alta resolución de los elementos oro, carbono, nitrógeno y oxígeno obtenidos para la muestra *cis@AuNPs-S5*, se observaron energías de enlace de 83.8 y 87.5 eV que están asociadas a las señales $4f_{7/2}$ y $4f_{5/2}$ y que corresponden al oro metálico (Au^0) (Dodero et al., 2000). El espectro del carbono es poco intenso en la región 1s entre 283 y 288 eV, lo que podría estar asociado a la presencia de grupos que contienen enlace sencillo carbono-carbono/carbono-hidrógeno (~285.4 eV) así como carbono-nitrógeno/carbono-oxígeno (~286.4 eV) (Dodero et al., 2000; Vlad et al., 2014). Asimismo, el pico de baja intensidad detectado a 398.2 eV relacionado con la señal 1s del nitrógeno, se atribuye al enlace oro-cianuro (~397.9 - 398.6 eV) (Cano et al., 2019; Cook et al., 1989), confirmando la existencia de enlace carbono-nitrógeno mencionado previamente para el espectro del carbono. Por otro lado, el pico intenso y bien definido en la región de 530 a 534 eV (centrado a 532.4 eV) está relacionado con la señal 1s del oxígeno. La asignación de dicha señal a determinados grupos suele requerir una interpretación más detallada debido a que las especies que contienen oxígeno y pudieran estar presentes tienen energías de enlace muy cercanas; tal es el caso de las de oro-oxígeno (~530 eV), oro-hidróxido (~532 eV) e incluso la presencia de agua adsorbida (~532 eV) (Sylvestre et al., 2019; Higo et al., 2020); así como especies con doble enlace oxígeno-carbono (O=C) tales como COO^- (que se detecta entre ~530.8 y ~531.2) y $COOH$ (que se detecta entre ~531.6 y ~533.6) (Jürgensen et al., 2018). Sin embargo, de acuerdo con las señales detectadas en los espectros de carbono y nitrógeno, para la muestra *cis@AuNPs-S5* se descarta (o es mínima) la presencia de especies oxígeno-carbono y/u oxígeno-nitrógeno. Por lo tanto, la señal intensa detectada en la región de 530 a 534 eV podría asociarse principalmente a las interacciones oro-oxígeno.

Los espectros de alta resolución de los elementos oro, carbono, nitrógeno y oxígeno obtenidos para la muestra *cis@AuNPs-S6* son similares en comparación con la muestra *cis@AuNPs-S5*, presentando prácticamente las mismas energías de enlace. Por lo tanto, ambas muestras contienen en su superficie las mismas especies químicas tal como se discutió anteriormente. La única diferencia que puede observarse es que todos los espectros de la muestra *cis@AuNPs-S6* son ligeramente menos intensos que los correspondientes para *cis@AuNPs-S5*.

Los espectros de alta resolución de los elementos oro, carbono, nitrógeno y oxígeno obtenidos para la muestra *LptD@AuNPs(1:2)* presentaron dos picos bien definidos correspondientes al oro metálico (83.5 y 87.2 eV); y junto a ellos otros dos picos bien definidos y de mayor intensidad a 84.9 y 88.6 eV correspondientes a las señales $4f_{7/2}$ y $4f_{5/2}$ del oro en estado de oxidación 1^+ (Vlad et al., 2014). La señal del carbono de esta muestra corresponde a 1s, en la cual se observó un pico bien definido a 284.8 eV relacionado con la presencia de carbono con enlace sencillo carbono-carbono/carbono-hidrógeno (~285.4 eV). Mientras que, considerando la forma del pico, es muy probable la presencia de grupos carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno y carbono-azufre (~286 - 288 eV) (Dodero et al., 2000; Vlad et al., 2014). En el caso del nitrógeno, el espectro correspondiente a la señal 1s presentó un pico bien definido y simétrico en la región entre aproximadamente 396.5 y 400.5 eV (centrado a 398.8 eV), lo cual coincide con la presencia de la especie oro-cianuro (~397.9 - 398.6 eV) (Cano et al., 2019; Cook et al., 1989). Lo anterior concuerda con la señal detectada de oro 1^+ mencionado previamente y a su vez corrobora la presencia de enlace carbono-nitrógeno en el espectro del carbono. Además, debido a la anchura del pico es posible la coexistencia de especies C=N-C (~399.0 eV), C-NH₂ (~399.6 eV) y N-(C=O)-N (~399.9 eV), principalmente (Dodero et al., 2000; Jürgensen et al., 2018; Mohtasebi et al., 2016). En el espectro del oxígeno, el pico entre 529 y 533.5 eV corresponde a la señal 1s (Higo et al., 2020). Tal como se mencionó anteriormente, la correcta interpretación de la señal 1s del oxígeno requiere de un análisis detallado. Sin embargo, considerando las señales observadas para el oro, carbono y nitrógeno es posible asociar dicha señal principalmente con la presencia de enlaces oro-hidróxido (~532 eV) debido a la presencia de Au 1^+ (Jürgensen et al., 2018); sin descartar la posible presencia en menor proporción de los distintos grupos que contienen enlace oxígeno-carbono que presentan señal en el rango de 530.8 a 533.6 eV (Dodero et al., 2000). Con base en los espectros presentados, el porcentaje atómico estimado para el oro es menor al de carbono. Este resultado sugiere que las nanopartículas de oro se encuentran recubiertas por capa(s) nanométricas del péptido de LptD. Por consiguiente, la detección del compuesto orgánico es mayor en comparación con el oro.

Para la muestra *LptD@AuNPs(1:4)*, los espectros de alta resolución de los elementos oro, carbono, nitrógeno y oxígeno obtenidos presentan picos bien definidos que son asignados al oro metálico (83.5 y 87.2 eV) y al oro con estado de oxidación 1^+ (84.9 y 88.6 eV) (Dodero et al., 2000). En este caso la intensidad de los picos del oro metálico es ligeramente mayor a los del Au 1^+ , lo cual es contrario a lo observado en la muestra *LptD@AuNPs(1:2)*. Es decir, la muestra

LptD@AuNPs(1:4) contiene una mayor proporción de oro metálico, mientras que en la muestra *LptD@AuNPs(1:2)* es la especie $Au 1^+$. Por otro lado, los espectros de los otros elementos son muy similares tanto en posición como en intensidad a lo observado en la muestra *LptD@AuNPs(1:2)*. Por consiguiente, se puede concluir que ambas muestras presentan en su superficie las mismas especies relacionadas con el carbono, nitrógeno y oxígeno. Donde si pudiese haber un cambio importante es con relación a la interacción oxígeno-oro, debido a la diferencia en proporción de oro metálico. El porcentaje atómico estimado es muy similar a lo encontrado para la muestra *LptD@AuNPs(1:2)*, y por consiguiente se puede asumir el mismo efecto asociado con la presencia de capas nanométricas del péptido de LptD adsorbidas en la superficie de las nanopartículas de oro, como se observa en la simulación realizada por Chen y colaboradores en el año 2008.

8.2.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La Microscopía Electrónica de Barrido nos permite observar la topografía, morfología y tamaño de partícula. Las imágenes obtenidas con esta técnica son de alta resolución (menores a 1 nm) e imágenes con profundidad de campo en tres dimensiones (3D). Las AuNPs de la solución *cis@AuNPs-S5* presentaron forma esférica, dispersas, con tamaño promedio de ~22 nm de diámetro. Para la solución *cis@AuNP-S6* el promedio de tamaño fue de 40 nm de diámetro. En cambio, las AuNPs de las soluciones donde se empleó el péptido de LptD como agente reductor y estabilizador *LptD@AuNP (1:2)* y *LptD@AuNP(1:4)* no pudieron ser observadas con claridad para obtener sus longitudes, dado que el haz de electrones que son acelerados y focalizados por el microscopio para proyectar la imagen es muy energético y carboniza las muestras orgánicas (Geetha et al., 2013). Lo anterior implica que hace desaparecer la imagen de la AuNP ya que la superficie se encuentra cubierta por material orgánico. El conocimiento de estos parámetros es importante debido a que la influencia del tamaño en la nanopartícula se encuentra relacionada con su biodistribución y permanencia de éstas en el organismo (Talamini et al., 2017). Por lo anterior el tamaño de las *LptD@AuNP* se determinó por TEM.

8.2.7 Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)

La EDS es una técnica de análisis que mide la energía de los Rayos X emitidos por la muestra. Los Rayos X son una radiación electromagnética de modo que se pueden considerar como ondas

con una determinada longitud de onda o como fotones con determinada energía que viajan en el vacío a la velocidad de la luz. Esta técnica se realiza en el Microscopio electrónico de barrido utilizando un sistema de espectroscopia de rayos X. Dependiendo de la cantidad de energía de rayos X que penetren la muestra, se generan pares de electrones y huecos. Al medir esta corriente eléctrica se puede determinar el valor de la energía de Rayos X. En este trabajo, las soluciones *cis@AuNPs-S5*, *cis@AuNP-S6*, *LptD@AuNP (1:2)* y *LptD@AuNP(1:4)*, presentaron porcentajes altos de oro (Au) además de otros elementos presentes en las muestras dados sus métodos de síntesis como sodio (Na) y cloro (Cl).

8.2.8 Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)

La técnica de TEM permite determinar la forma y distribución de tamaño real de las nanopartículas en dos dimensiones y es posible observar si se encuentran aglomeradas o dispersas (Egerton, 2005). Las AuNPs de este estudio pertenecientes al Método I de síntesis con cisteína presentaron forma esférica, encontrándose ligeramente dispersas y con un tamaño entre 25 y 30 nm. Las AuNPs sintetizadas con el péptido de LptD mostraron tener un tamaño promedio de 25 nm. En ambos sistemas (*cis@AuNPs* y *LptD@AuNps*) los diámetros obtenidos no coinciden con los observados en la técnica SEM debido a la diferente resolución que estas dos técnicas emplean y a la diferencia energética que los haz de electrones en cada caso emiten (Geetha et al., 2013). Es importante conocer el tamaño exacto y la forma de las AuNPs ya que estos parámetros están asociado a la capacidad de su internalización por parte de las células involucradas y el movimiento de AuNPs de tamaño más pequeño de los órganos a través de células endoteliales (Talamini et al., 2017).

8.3 Ensayo Biológico

8.3.1 Prueba de viabilidad y citotoxicidad celular

Se realizó la técnica de resazurina para determinar la viabilidad celular de los tratamientos puestos en contacto con células de bazo de ratón. Se observó diferencia significativa respecto al control en los tratamientos *LptD@AuNPs(1:4)* y en el del péptido de LptD a una concentración de 0.2 µg/ µL. En el caso del primer tratamiento, se determinó una viabilidad menor del 80%. Esto pudo deberse al tamaño que presentaron estas AuNps (10-20 nm) ya que el diámetro de las

AuNPs está ligado a su toxicidad (Diego et al., 2013; Jeevanandam et al., 2018; Khlebtsov & Dykman, 2010). Las AuNPs del sistema *LptD@AuNPs(1:4)* pueden ser comparables con las reportadas por Zhang et. al., 2011, ya que en este se evaluaron tamaños de 5,10,30 y 60 nm. Se observó que las AuNPs de diámetros de 10 y 60 nm mostraron mayor citotoxicidad en el hígado y bazo de ratones que las AuNPs de 5 y 30 nm. Por lo cual, es complejo deducir que las AuNPs de menor o mayor tamaño son más tóxicas. Además, la carga y forma de las AuNPs es un parámetro que influye a en el efecto citotóxico, tal como lo reporta Shaeublin et. al., 2011; Khlebtsov & Dykman 2010, dónde además se pone en evidencia que los resultados de citotoxicidad muestran grandes discrepancias al ser evaluados *in vitro* o *in vivo*.

Por otro lado, en el tratamiento de péptido de LptD a una concentración de 0.2 µg/ µL se observó una viabilidad mayor al 100% respecto al control, lo que puede asociarse a proliferación celular. Estos resultados son similares a los reportados en Lien et. al., 2007, donde se demuestra la proliferación de células T al administrar tres péptidos antigénicos obtenidos de la proteína S del síndrome respiratorio agudo grave (SARS CoV) que se administraron a tres modelos animales: ratones, conejillos de indias y conejos, concluyendo que uno de los péptidos era capaz de la generar la proliferación de células Th. Del mismo modo, Tan y colaboradores en 2016, demostraron una proliferación de linfocitos T citotóxicos a partir de la administración de 4 epítopes obtenidos de las glicoproteínas superficiales del virón IBV en un modelo de pollo. La finalidad de inducir la proliferación de las células T CD8 + y la secreción de IFN-γ era regular la replicación del virus de la bronquitis infecciosa (IBV). De igual manera Faist y colaboradores en 2019, demostraron la proliferación y funcionabilidad de células T de memoria central generadas a partir de un epítipo específico de citomegalovirus (CMV). Estas células son empleadas como terapia de células adoptivas (TCA) en el tratamiento de reactivaciones virales en pacientes sometidos a trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alloHSCT). Con lo antes mencionado, es posible determinar que la administración de péptidos con potencial inmunogénico genera la proliferación de células involucradas en la respuesta inmune. Además, se ha encontrado que no solo moléculas de origen peptídico pueden estimular el aumento de células, también existe evidencia de la proliferación celular a partir de la estimulación con glucanos como lo demostraron en 2015 Baert y colaboradores, donde se obtuvo una proliferación de linfocitos y monocitos.

Por todo lo anterior, la proliferación celular observada en el tratamiento del péptido de LptD a concentración 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ podría asociarse a la interacción celular del antígeno. Por lo que, posiblemente son las células específicas del sistema inmune las que se están multiplicando. Sin embargo, es necesario el empleo de técnicas complementarias para comprobar dicha proliferación. Podrían emplearse las técnicas de incorporación de 3H-timidina, incorporación de bromodesoxiuridina y tinción con yoduro de propidio (Van der Stede et al., 2003; Sonck et. al. 2010). Lo anterior con fundamento en que la proliferación celular de linfocitos, monocitos y neutrófilos en un modelo *in vitro* usando células de porcino estimuladas a diferentes concentraciones de antígeno. Asimismo, podría ser conveniente el empleo de las técnicas de proliferación específica (PSPA) como la descrita por Faist et al., 2009.

9. CONCLUSIONES

La interacción del péptido de LptD con sales de oro generó un prototipo de nanovacuna (*LptD@AuNPs*). Las técnicas de caracterización ópticas, espectroscópicas y de microscopía, confirmaron el anclaje e integridad del péptido de LptD sobre las AuNPs. El prototipo de nanovacuna *LptD@AuNPs* presentó estabilidad química debido a la carga superficial (potencial Z) influenciada por los grupos funcionales expuestos, incluso en variaciones de pH. Además, el modelo *LptD@AuNPs* resultó seguro a las concentraciones probadas ya que no afectó la viabilidad de células de bazo de ratón. Por lo tanto, el modelo *LptD@AuNPs* y la síntesis para su obtención representan una alternativa innovadora para la producción de nanovacunas.

La perspectiva de este trabajo es elucidar los mecanismos involucrados en la respuesta inmune de las mucosas y las células hematopoyéticas asociadas con la administración de *LptD@AuNPs*. Asimismo, valorar el potencial inmunoprotector de *LptD@AuNPs* contra la gastroenteritis a nivel preclínico.

10. LITERATURA CITADA

Abbas, A. K., A. H. Lichtman, S. Pillai. 2015. *Inmunología celular y molecular*. ELSEVIER Sexta Edición España, S.L.U. 537p.

Adochitei, A., & Drochioiu, G. (2011). Rapid characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy. *Revue Roumaine de Chimie*, 56(8), 783–791.

Al-Qadi, S., Remuñán-López, C. (2009). Nanopartículas metálicas: oro. Monografía XXVIII: *Nanotecnología Farmacéutica*, 8–17.

Aryal, S., Remant, B. K. C., Dharmaraj, N., Bhattarai, N., Kim, C. H., & Kim, H. Y. (2006). Spectroscopic identification of SAu interaction in cysteine capped gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 63(1), 160–163. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.04.048>

Baert, K., Sonck, E., Goddeeris, B. M., Devriendt, B., & Cox, E. (2015). Cell type-specific differences in β -glucan recognition and signalling in porcine innate immune cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 48(1), 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.10.005>

Bhattacharjee, R. R., Das, A. K., Haldar, D., Si, S., Banerjee, A., & Mandal, T. K. (2005). Peptide-assisted synthesis of gold nanoparticles and their self-assembly. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5(7), 1141–1147. <https://doi.org/10.1166/jnn.2005.166>

Cano, A., Avila, Y., Avila, M., & Reguera, E. (2019). Structural information contained in the XPS spectra of nd10 metal cyanides. *Journal of Solid State Chemistry*, 276(March), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2019.05.021>

Cao, L., Zhu, T., & Liu, Z. (2006). Formation mechanism of nonspherical gold nanoparticles during seeding growth: Roles of anion adsorption and reduction rate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 293(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.06.012>

Chen, C. L., Zhang, P., & Rosi, N. L. (2008). A new peptide-based method for the design and synthesis of nanoparticle superstructures: Construction of highly ordered gold nanoparticle double helices. *Journal of the American Chemical Society*, 130(41), 13555–13557. <https://doi.org/10.1021/ja805683r>

Chimie, R. R. De. (2017). Rapid Characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy RAPID CHARACTERIZATION OF PEPTIDE SECONDARY STRUCTURE BY FT-IR SPECTROSCOPY. December 2013.

Chou, C. W., Yang, J. M., Yang, T. S., Shih, Y. C., Hsieh, H. H., Chang, K. H., Chen, K. S., Tzu, W. L., Hseu, Y. C., & Wei, Y. S. (2014). Cysteine conjugated gold nanoparticles and their scavenging free radicals properties. *Advanced Materials Research*, 974, 112–115. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.974.112>

Cook, R., Crathorne, E. A., Monhemius, A. J., & Perry, D. L. (1989). An XPS study of the adsorption of gold (I) cyanide by carbons. *Hydrometallurgy*, 22(1–2), 171–182. [https://doi.org/10.1016/0304-386X\(89\)90048-0](https://doi.org/10.1016/0304-386X(89)90048-0)

Daruich De Souza, C., Ribeiro Nogueira, B., & Rostelato, M. E. C. M. (2019). Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. *Journal of Alloys and Compounds*, 798, 714–740. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153>

Delany, I., Rappuoli, R., & De Gregorio, E. (2014). Vaccines for the 21st century. *EMBO Molecular Medicine*, 6(6), 708–720. <https://doi.org/10.1002/emmm.201403876>

Deng, Z. J., Liang, M., Toth, I., Monteiro, M., & Minchin, R. F. (2013). Plasma protein binding of positively and negatively charged polymer-coated gold nanoparticles elicits different biological responses. *7(December 2011)*, 314–322. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.655342>

Devanabanda, M., Latheef, S. A., & Madduri, R. (2016). Immunotoxic effects of gold and silver nanoparticles: Inhibition of mitogen-induced proliferative responses and viability of human and murine lymphocytes in vitro. *Journal of Immunotoxicology*, 13(6), 897–902. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2016.1234522>

Dodero, G., De Michieli, L., Cavalleri, O., Rolandi, R., Oliveri, L., Daccà, A., & Parodi, R. (2000). L-Cysteine chemisorption on gold: An XPS and STM study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 175(1–2), 121–128. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00521-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00521-5)

Dong, J., Carpinone, P. L., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P., & Moudgil, B. M. (2020). Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method. *KONA Powder and Particle Journal*, 37(August), 224–232. <https://doi.org/10.14356/kona.2020011>

Dykman, L. A., Sumaroka, M. V., Staroverov, S. A., Zaitseva, I. S., & Bogatyrev, V. A. (2004). Immunogenic properties of the colloidal gold. *Izvestiia Akademii Nauk. Serii Biologicheskaja / Rossiiskaia Akademiia Nauk*, 31(1), 86–91.

Dykman, Lev A. (2020). Gold nanoparticles for preparation of antibodies and vaccines against infectious diseases. *Expert Review of Vaccines*, 00(00), 1–13. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1758070>

Dykman, Lev A., & Khlebtsov, N. G. (2017). Immunological properties of gold nanoparticles. *Chemical Science*, 8(3), 1719–1735. <https://doi.org/10.1039/c6sc03631g>

Faist, B., Schlott, F., Stemberger, C., Dennehy, K. M., Krackhardt, A., Verbeek, M., Grigoleit, G. U., Schiemann, M., Hoffmann, D., Dick, A., Martin, K., Hildebrandt, M., Busch, D. H., & Neuenhahn, M. (2019). Targeted in-vitro-stimulation reveals highly proliferative multi-virus-specific human central memory T cells as candidates for prophylactic T cell therapy. *PLoS ONE*, 14(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223258>

Geetha, R., Ashokkumar, T., Tamilselvan, S., Govindaraju, K., Sadiq, M., & Singaravelu, G. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer activity. *Cancer Nanotechnology*, 4(4–5), 91–98. <https://doi.org/10.1007/s12645-013-0040-9>

Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., & Rotello, V. M. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>

Guerrero, S., Herance, J. R., Rojas, S., Mena, J. F., Gispert, J. D., Acosta, G. A., Albericio, F., & Kogan, M. J. (2012). Synthesis and in vivo evaluation of the biodistribution of a ¹⁸F-labeled conjugate gold-nanoparticle-peptide with potential biomedical application. *Bioconjugate Chemistry*, 23(3), 399–408. <https://doi.org/10.1021/bc200362a>

Guo, J., Armstrong, M. J., O'Driscoll, C. M., Holmes, J. D., & Rahme, K. (2015). Positively charged, surfactant-free gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *RSC Advances*, 5(23), 17862–17871. <https://doi.org/10.1039/c4ra16294c>

Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>

Higo, M., Mitsushio, M., Yoshidome, T., & Nakatake, S. (2020). Characterization and preservation of gold oxides prepared by an oxygen-dc glow discharge from gold films and studied by X-ray photoelectron spectroscopy. *Gold Bulletin*, 53(2), 77–92. <https://doi.org/10.1007/s13404-020-00276-z>

Kindt, T. J., R. A. Goldsby, B. A. Osborne. 2007. *Inmunología de Kuby*. McGraw-Hill interamericana. Sexta edición. México, D.F. 697 p.

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>

Jürgensen, A., Raschke, H., Esser, N., & Hergenröder, R. (2018). An in situ XPS study of L-cysteine co-adsorbed with water on polycrystalline copper and gold. *Applied Surface Science*, 435, 870–879. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.11.150>

Khlebtsov, N., & Dykmana, L. (2011). Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1647–1671. <https://doi.org/10.1039/c0cs00018c>

Kim, M. G., Park, J. Y., Shon, Y., Kim, G., Shim, G., & Oh, Y. K. (2014). Nanotechnology and vaccine development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(5), 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.002>

Koyama, Y., Matsui, Y., Shimada, Y., & Yoneda, M. (2015). Biodistribution of gold nanoparticles in mice and investigation of their possible translocation by nerve uptake around the alveolus. *Journal of Toxicological Sciences*, 40(2), 243–249. <https://doi.org/10.2131/jts.40.243>

Li, C., Ye, Z., Wen, L., Chen, R., Tian, L., Zhao, F., & Pan, J. (2014). Identification of a novel vaccine candidate by immunogenic screening of *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins. *Vaccine*, 32(46), 6115–6121. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.077>

Li, Z. P., Duan, X. R., Liu, C. H., & Du, B. A. (2006). Selective determination of cysteine by resonance light scattering technique based on self-assembly of gold nanoparticles. *Analytical Biochemistry*, 351(1), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.038>

Lien, S. P., Shih, Y. P., Chen, H. W., Tsai, J. P., Leng, C. H., Lin, M. H., Lin, L. H., Liu, H. Y., Chou, A. H., Chang, Y. W., Chen, Y. M. A., Chong, P., & Liu, S. J. (2007). Identification of synthetic vaccine candidates against SARS CoV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(3), 716–721. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.164>

Ma, Z., & Han, H. (2008). One-step synthesis of cystine-coated gold nanoparticles in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 317(1–3), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.10.018>

Małaczewska, J. (2015). Effect of oral administration of commercial gold nanocolloid on peripheral blood leukocytes in mice. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(2), 273–282. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0036>

Mallick, K., Wang, Z. L., & Pal, T. (2001). Seed-mediated successive growth of gold particles accomplished by UV irradiation: A photochemical approach for size-controlled synthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 140(1), 75–80. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00389-6](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00389-6)

Marques Neto, L. M., Kipnis, A., & Junqueira-Kipnis, A. P. (2017). Role of metallic nanoparticles in vaccinology: Implications for infectious disease vaccine development. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00239>

Mateo, D., Morales, P., Ávalos, A., & Haza, A. (2013). Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro. *Acta Toxicológica Argentina*, 21(2), 102–109.

Majzik Andrea, Patakfalvi Rita, Hornok Viktória, Dékány Imre (2009). Growing and stability of gold nanoparticles and their functionalization by cysteine. *Gold Bulletin*, Volume 42, No. 2.

- Meléndez Anzures, F., & Chávez Guerrero, L. (2016). Nanobiomateriales. *Ingenierías*, 19(70), 5.
- Mocanu, A., Cernica, I., Tomoaia, G., Bobos, L. D., Horovitz, O., & Tomoaia-Cotisel, M. (2009). Self-assembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of cysteine. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 338(1–3), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.12.041>
- Mohtasebi, A., Chowdhury, T., Hsu, L. H. H., Biesinger, M. C., & Kruse, P. (2016). Interfacial Charge Transfer between Phenyl-Capped Aniline Tetramer Films and Iron Oxide Surfaces. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b09950>
- Monti, S., Carravetta, V., & Ågren, H. (2016). Decoration of gold nanoparticles with cysteine in solution: Reactive molecular dynamics simulations. *Nanoscale*, 8(26), 12929–12938. <https://doi.org/10.1039/c6nr03181a>
- Nanoscale, C., Schaeublin, N. M., Braydich-stolle, L. K., Schrand, A. M., Miller, J. M., Hutchison, J., Schlager, J. J., & Hussain, S. M. (2011). *Nanoscale*. 410–420. <https://doi.org/10.1039/c0nr00478b>
- Pati, R., Shevtsov, M., & Sonawane, A. (2018). Nanoparticle vaccines against infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02224>
- Petean, I., Tomoaia, G., Horovitz, O., Mocanu, A., & Tomoaia-Cotisel, M. (2008). Cysteine mediated assembly of gold nanoparticles. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 10(9), 2289–2292.
- Piella, J., Bastús, N. G., & Puentes, V. (2017). Size-dependent protein-nanoparticle interactions in citrate-stabilized gold nanoparticles: The emergence of the protein corona. *Bioconjugate Chemistry*, 28(1), 88–97. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00575>
- Piryazev, A. P., Azizova, O. A., Aseichev, A. V., Dudnik, L. B., & Sergienko, V. I. (2013). Effect of gold nanoparticles on production of reactive oxygen species by human peripheral blood leukocytes stimulated with opsonized zymosan. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 156(1), 101–103. <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2288-9>
- Plotkin, S. (2014). History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34), 12283–12287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400472111>

Poole, C.P. Jr, Owens, F.J., 2003. Introduction to nanotechnology. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. 385 p.

Quach, Q. H., Ang, S. K., Chu, J. H. J., & Kah, J. C. Y. (2018). Size-dependent neutralizing activity of gold nanoparticle-based subunit vaccine against dengue virus. *Acta Biomaterialia*, 78, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.011>

Raj, V., Vijayan, A. N., & Joseph, K. (2015). Cysteine capped gold nanoparticles for naked eye detection of *E. coli* bacteria in UTI patients. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 5, 33–36. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.05.004>

Ringe, E., Langille, M. R., Sohn, K., Zhang, J., Huang, J., Mirkin, C. A., Van Duyne, R. P., & Marks, L. D. (2012). Plasmon length: A universal parameter to describe size effects in gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(11), 1479–1483. <https://doi.org/10.1021/jz300426p>

Safari, D., Marradi, M., Chiodo, F., Th Dekker, H. A., Shan, Y., Adamo, R., Oscarson, S., Rijkers, G. T., Lahmann, M., Kamerling, J. P., Penadés, S., & Snippe, H. (2012). Gold nanoparticles as carriers for a synthetic *Streptococcus pneumoniae* type 14 conjugate vaccine. *Nanomedicine*, 7(5), 651–662. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.151>

Salazar-González, J. A., González-Ortega, O., & Rosales-Mendoza, S. (2015). Gold nanoparticles and vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 14(9), 1197–1211. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1064772>

Saptarshi, S. R., Duschl, A., & Lopata, A. L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: Relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-26>

Si, S., & Mandal, T. K. (2007). pH-controlled reversible assembly of peptide-functionalized gold nanoparticles. *Langmuir*, 23(1), 190–195. <https://doi.org/10.1021/la061505r>

Slocik, J. M., Stone, M. O., & Naik, R. R. (2005). Synthesis of gold nanoparticles using multifunctional peptides. *Small*, 1(11), 1048–1052. <https://doi.org/10.1002/sml.200500172>

Sonck, E., Stuyven, E., Goddeeris, B., & Cox, E. (2010). The effect of β -glucans on porcine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135(3–4), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.11.014>

Song, C., Zhao, G., Zhang, P., & Rosi, N. L. (2010). Expedient synthesis and assembly of sub-100 nm hollow spherical gold nanoparticle superstructures. *Journal of the American Chemical Society*, 132(40), 14033–14035. <https://doi.org/10.1021/ja106833g>

Spicer, C. D., Jumeaux, C., Gupta, B., & Stevens, M. M. (2018). Peptide and protein nanoparticle conjugates: Versatile platforms for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 47(10), 3574–3620. <https://doi.org/10.1039/c7cs00877e>

Talamini, L., Violatto, M. B., Cai, Q., Monopoli, M. P., Kantner, K., Krpetić, Ž., Perez-Potti, A., Cookman, J., Garry, D., Silveira, C. P., Boselli, L., Pelaz, B., Serchi, T., Cambier, S., Gutleb, A. C., Feliu, N., Yan, Y., Salmons, M., Parak, W. J., ... Bigini, P. (2017). Influence of Size and Shape on the Anatomical Distribution of Endotoxin-Free Gold Nanoparticles. *ACS Nano*, 11(6), 5519–5529. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00497>

Tan, L., Liao, Y., Fan, J., Zhang, Y., Mao, X., Sun, Y., Song, C., Qiu, X., Meng, C., & Ding, C. (2016). Prediction and identification of novel IBV S1 protein derived CTL epitopes in chicken. *Vaccine*, 34(3), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.042>

Thompson, F.L., Austin B., Swings J., 2006. *The biology of Vibrios*. ASM Press. American Society for Microbiology. Washington, DC 20036-2904. 455 p

Vlad, I. E., Marisca, O. T., Vulpoi, A., Simon, S., Leopold, N., & Anghel, S. D. (2014). Simple approach for gold nanoparticle synthesis using an Ar-bubbled plasma setup. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(10), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2633-6>

Wang, C., Wang, J., Liu, D., & Wang, Z. (2010). Gold nanoparticle-based colorimetric sensor for studying the interactions of β -amyloid peptide with metallic ions. *Talanta*, 80(5), 1626–1631. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.052>

Wang, J., Bai, R., Yang, R., Liu, J., Tang, J., Liu, Y., Li, J., Chai, Z., & Chen, C. (2015). Size- and surface chemistry-dependent pharmacokinetics and tumor accumulation of engineered gold

nanoparticles after intravenous administration. *Metallomics*, 7(3), 516–524. <https://doi.org/10.1039/c4mt00340c>

Wojnicki, M., Luty-Blocho, M., Bednarski, M., Dudek, M., Knutelska, J., Sapa, J., Zygmunt, M., Nowak, G., & Fitzner, K. (2013). Tissue distribution of gold nanoparticles after single intravenous administration in mice. *Pharmacological Reports*, 65(4), 1033–1038. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71086-7](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71086-7)

Xia, X., Zhang, J., & Sawall, T. (2015). A simple colorimetric method for the quantification of Au(iii) ions and its use in quantifying Au nanoparticles. *Analytical Methods*, 7(9), 3671–3675. <https://doi.org/10.1039/c5ay00490j>

Yannakakis, M. P., Simal, C., Tzoupis, H., Rodi, M., Dargahi, N., Prakash, M., Mouzaki, A., Platts, J. A., Apostolopoulos, V., & Tselios, T. V. (2017). Design and synthesis of non-peptide mimetics mapping the immunodominant myelin basic protein (MBP83-96) epitope to function as T-cell receptor antagonists. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms18061215>

Yu, J., Becker, M. L., & Carri, G. A. (2010). A molecular dynamics simulation of the stability-limited growth mechanism of peptide-mediated gold-nanoparticle synthesis. *Small*, 6(20), 2242–2245. <https://doi.org/10.1002/sml.201000889>

Zha, Z., Li, C., Li, W., Ye, Z., & Pan, J. (2016). LptD is a promising vaccine antigen and potential immunotherapeutic target for protection against *Vibrio* species infection. *Scientific Reports*, 6(November), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep38577>

Zhang, X., Wu, D., Zhao, B., Zhang, L., & Fan, F. (2011). Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. 2071–2081.

Zhang, Y., Jiang, J., Li, M., Gao, P., Zhou, Y., & Zhang, G. (2016). Talanta Colorimetric sensor for cysteine in human urine based on novel gold nanoparticles. *Talanta*, 161, 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.009>

Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C. X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. J. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32(3), 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>

Ziegler, C., & Eychmüller, A. (2011). Seeded growth synthesis of uniform gold nanoparticles with diameters of 15-300 nm. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(11), 4502–4506.
<https://doi.org/10.1021/jp1106982>

<https://Nano.gov> consultado 19 de junio de 2020

<https://chem.libretexts.org> consultado 19 de junio de 2020

<https://ualberta.ca> consultado 20 julio de 2020

B) Solución semilla (*cis@AuNPs-Seed*)

303.3 g (AuCl ₃)	1,000 mL	1 M
X ₁	50 mL	0.0005 M

$$X_1 = 0.1516 \text{ g (AuCl}_3\text{)}$$

0.1516 g (AuCl ₃)	1,000 mL
X ₂	77 mL

$$X_2 = 0.0117 \text{ g (AuCl}_3\text{)}$$

0.0117 g de AuCl₃ en 77 mL de
solución a 0.0005M

303.33 g de AuCl ₃	196.96 g de Au
0.0117 g de AuCl ₃	X ₃

$$X_3 = 7.6 \times 10^{-3} \text{ g de Au}$$

7.6×10^{-3} gr de Au en 77 000
 μL de solución

Concentración final de Au en solución *cis@AuNPs-Seed* es de: 0.099 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

C) Solución 1 (*cis@AuNPs-SI*)

Volumen total de *cis@AuNPs-SI* es de 91 mL, compuesta por:

50 mL de solución precursora AuCl₃

40 mL de solución *cis@AuNPs-Seed*

0.49 mL solución de cisteína

0.33 mL solución de hidroxilamida

Por lo tanto:

$$[(50,000 \mu\text{l}(0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L})) + (40,000 \mu\text{L}(0.099 \mu\text{g}/\mu\text{L}))] / 91,000 \mu\text{L}$$

Concentración de la solución *cis@AuNPs-S1*: 0.097 ug/uL de Au

D) Solución 2 (*cis@AuNPs-S2*)

Volumen total de *cis@AuNPs-S1* es de 75.82 mL, compuesta por:

50 mL de solución precursora AuCl₃

25 mL de solución *cis@AuNPs-S1*

0.49 mL solución de cisteína

0.33 mL solución de hidroxilamida

Por lo tanto:

$$[(50,000 \mu\text{L} (0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L})) + (25,000 \mu\text{L}(0.097 \mu\text{g}/\mu\text{L}))]/75,820 \mu\text{L}$$

Concentración de la solución *cis@AuNPs-S2*: 0.097 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Au

E) Solución 3 (*cis@AuNPs-S3*)

Volumen total de *cis@AuNPs-S1* es de 70.82 mL, compuesta por:

50 mL de solución precursora AuCl₃

20 mL de solución *cis@AuNPs-S2*

0.49 mL solución de cisteína

0.33 mL solución de hidroxilamida

Por lo tanto:

$$[(50,000 \mu\text{L} (0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L})) + (20,000 \mu\text{L}(0.097 \mu\text{g}/\mu\text{L}))]/70,820 \mu\text{L}$$

Concentración de la solución *cis@AuNPs-S3*: 0.097 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Au

F) Solución 4 (*cis@AuNPs-S4*)

Volumen total de *cis@AuNPs-S1* es de 60.82 mL, compuesta por:

40 mL de solución precursora AuCl₃

20 mL de solución *cis@AuNPs-S3*

0.49 mL solución de cisteína

0.33 mL solución de hidroxilamida

Por lo tanto:

$$[(40,000 \mu\text{L} (0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L})) + (20,000 \mu\text{L}(0.097 \mu\text{g}/\mu\text{L}))]/60,820 \mu\text{L}$$

Concentración de la solución *cis@AuNPs-S4*: 0.097 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Au

G) Solución 5 (*cis@AuNPs-S5*)

Volumen total de *cis@AuNPs-S5* es de 60.82 mL, compuesta por:

50 mL de solución precursora AuCl₃

10 mL de solución *cis@AuNPs-S4*

0.49 mL solución de cisteína

0.33 mL solución de hidroxilamida

Por lo tanto:

$$[(50,000 \mu\text{L} (0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L})) + (10,000 \mu\text{L}(0.097 \mu\text{g}/\mu\text{L}))]/60,820 \mu\text{L}$$

Concentración de la solución *cis@AuNPs-S5*: 0.098 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Au

H) Solución 6 (*cis@AuNPs-S6*)

Volumen total de *cis@AuNPs-S6* es de 60.82 mL, compuesta por:

50 mL de solución precursora AuCl₃

10 mL de solución *cis@AuNPs-S5*

0.49 mL solución de cisteína

0.33 mL solución de hidroxilamida

Por lo tanto:

$$[(50,000 \mu\text{L} (0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L})) + (10,000 \mu\text{L}(0.098 \mu\text{g}/\mu\text{L}))]/60,820 \mu\text{L}$$

Concentración de la solución *cis@AuNPs-S6*: 0.098 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Au

RENDIMIENTO REAL

Considerar que: $0.001 \mu\text{g}/\mu\text{L} = 1 \text{ ppm}$

0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1 ppm
0.098 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	X_1

$$X_1 = 98 \text{ ppm}$$

RESULTADO DE ICP_OES

4.25 ppm

Por lo tanto:

98 ppm	100%
4.25 ppm	X_2

$$X_2 = 4.33 \%$$

CÁLCULO DE CONCENTRACIONES Y RENDIMIENTO DE LA SOLUCIÓN

LptD@AuNPs(1:4)

Compuesto	Peso Molecular	unidades
H ₂ AuCl ₄	339.785	g/L/M
Au	196.96	g/L/M

Volumen total de la solución 520 μL , compuesta de:

20 μL de H₂AuCl₄ a 0.1 M

400 μL de HEPES a 0.1 M

100 μL de LptD (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

339.785 g de HAuCl_4	1 M
X_1	0.1 M

$X_1 = 33.9785$ g de HAuCl_4

33.978 g de HAuCl_4	1,000,000 μL
X_2	20 μL

$X_2 = 6.7957 \times 10^{-4}$ gramos de HAuCl_4 en 20 μL de solución

339.785×10^6 μg de HAuCl_4	199.96×10^6 μg de Au
679.57 μg de HAuCl_4	X_3

$X_3 = 393.92$ $\mu\text{g}/20$ μL de Au en solución

**Concentración de Au en la solución de 520 μL de volumen total es de: 0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
~ 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$**

La concentración de péptido de LptD total en 520 μL de volumen de la solución es: $100/520$ $\mu\text{g}/\mu\text{L} = 0.1923$ ~ 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

CÁLCULO DE CONCENTRACIONES Y RENDIMIENTO DE LA SOLUCIÓN

LptD@AuNPs(1:2)

Compuesto	Peso Molecular	unidades
HAuCl_4	339.785	g/L/M
Au	196.96	g/L/M

Volumen total de la solución 520 μL , compuesta de:

10 μL de HAuCl_4 a 0.1 M

400 μL de HEPES a 0.1 M

100 μL de LptD (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

339.785 g de HAuCl_4	1 M
X_1	0.1 M

$X_1 = 33.9785$ g de HAuCl_4

33.9785 g de HAuCl_4	1,000,000 μL
X_2	10 μL

$X_2 = 3.39785 \times 10^{-4}$ gramos de HAuCl_4 en 10 μL de solución

339.785×10^6 μg de HAuCl_4	199.96×10^6 μg de Au
339.785 μg de HAuCl_4	X_3

$X_3 = 196.96$ $\mu\text{g}/10$ μL de Au en solución

Concentración de Au en la solución de 510 μL volumen total es de: 0.38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ~ 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

La concentración de péptido de LptD total en 510 μL de volumen de la solución es: $100/510$ $\mu\text{g}/\mu\text{L} = 0.1960$ ~ 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

RENDIMIENTO

Considerando que: 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L} = 1$ ppm

0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1 ppm
0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	X_1

$X_1 = 750$ ppm

Por lo tanto:

750 ppm	100%
---------	------

625.03 ppm

 X_2 $X_2 = 83.3 \%$

11.2 Anexo B. Comportamiento e interacción molecular de los sistemas *cis@AuNPs* y *LptD@AuNPs* en condiciones de acidez y basicidad.

MECANISMOS DE REACCIÓN DEL SISTEMA *cis@AuNPs*

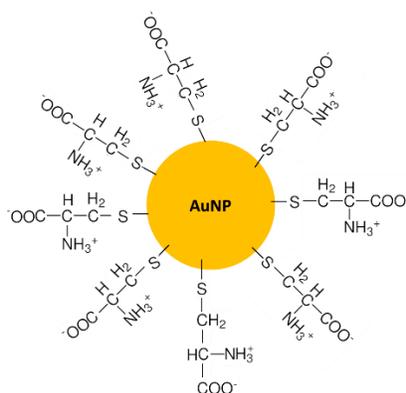


Figura B1. AuNP estabilizada con cisteína

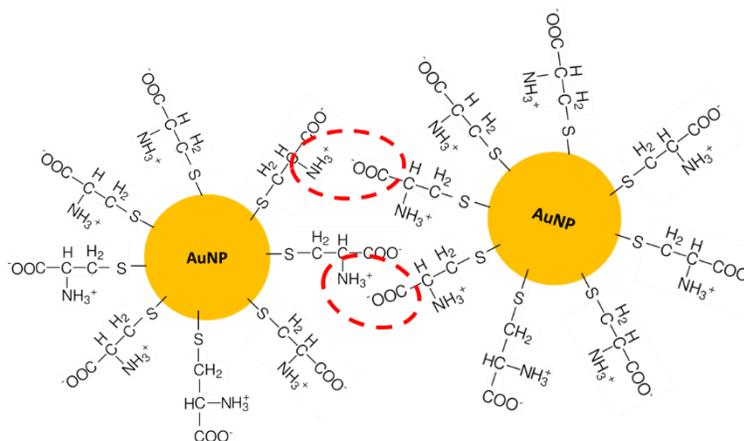


Figura B2. Interacción entre dos AuNPs estabilizadas con cisteína. Se observa que los grupos amino (NH₃) y Carboxilo (COO⁻) interactúan entre sí.

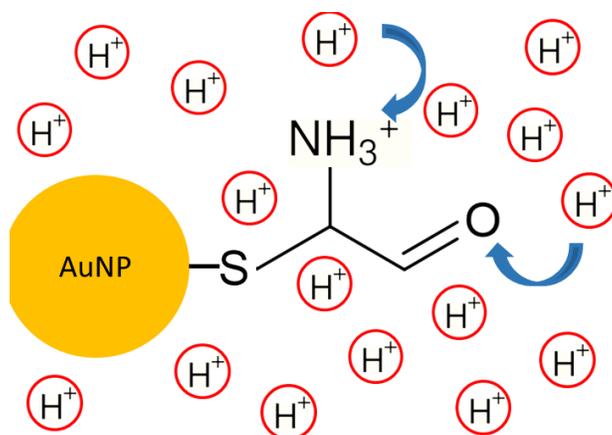


Figura B3. Estructura simple de la interacción de los H^+ con los grupos NH_3 y COO^- se ven afectados en condiciones de acidez.

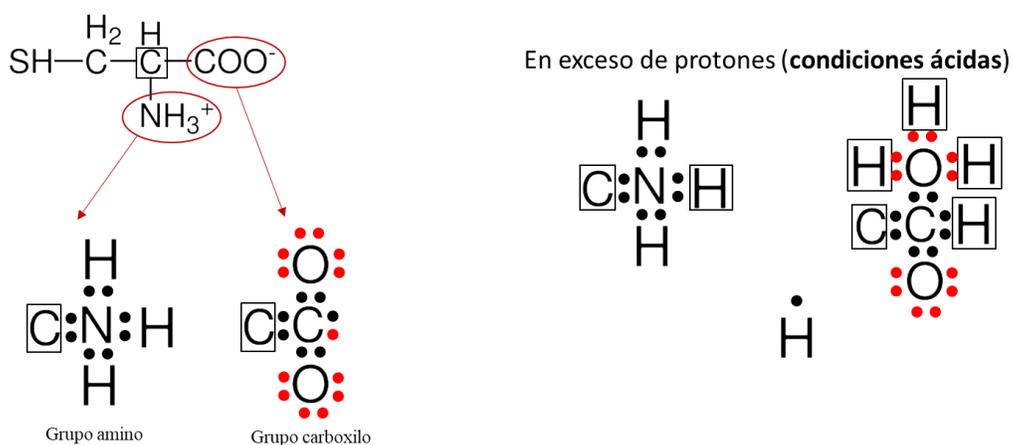


Figura B4. Estructuras de Lewis de la interacción de los grupos NH_3 y COO^- en condiciones de acidez. Se observa que:

-El grupo amino no se ve afectado por los protones.

-El grupo carbonilo sufre una protonación que da lugar a la formación de un carboxilo y protonación de oxígenos.

-No es posible la interacción entre los grupos amino y carboxilo, por lo tanto, **no existe una aglomeración.**

- La carga superficial de la partícula es positiva, dado que el grupo NH_3 no se ve afectado.

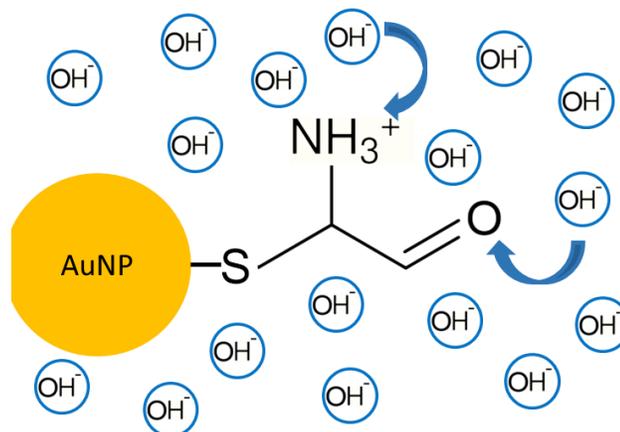


Figura B5. Estructura simple de la interacción de los H^+ con los grupos NH_3 y COO^- se ven afectados en condiciones de basicidad.

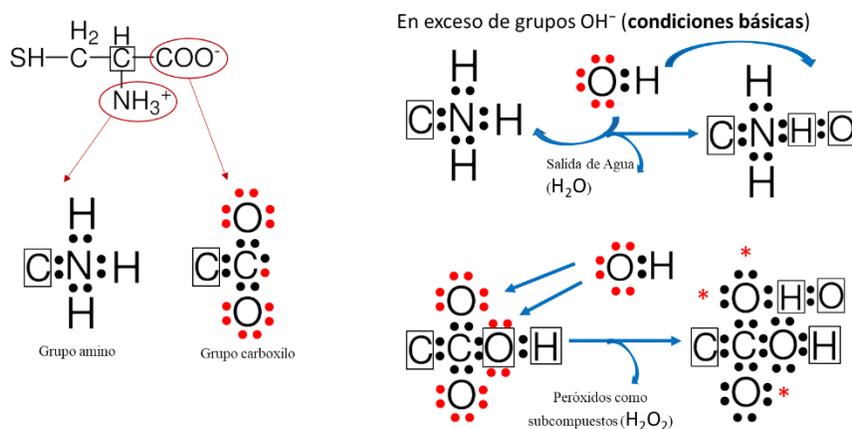


Figura B6. Estructuras de Lewis de la interacción de los grupos NH_3 y COO^- en condiciones de acidez. Se observa que:

-El grupo amino pierde protones (NH_2).

-El grupo carbonilo gana grupos hidroxilo generando subcompuestos como agua oxigenada, sin embargo, la reacción no se caracterizó por el desprendimiento de gases, por lo cual se plantea que no se obtiene en su totalidad agua oxigenada, sino que grupos hidroxilo interaccionan con el grupo amino.

-Electronegativamente, no se da la interacción entre grupos amino y carboxilo por que estos no presentan propiamente características de estos grupos funcionales al estar en contacto con hidroxilos. Por lo tanto, no hay aglomeración de nanopartículas.

-La carga superficial de la partícula es negativa, debido a la gran concentración de hidroxilos (OH⁻) que afectan al grupo NH₃.

MECANISMOS DE REACCIÓN DEL SISTEMA *LptD@AuNPs*

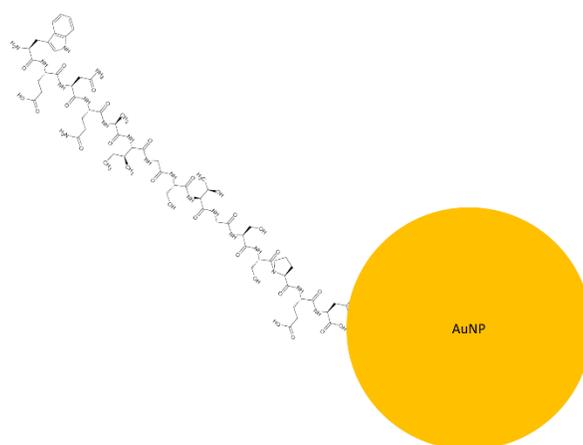


Figura B7. AuNP reducida y estabilizada con el péptido de LptD

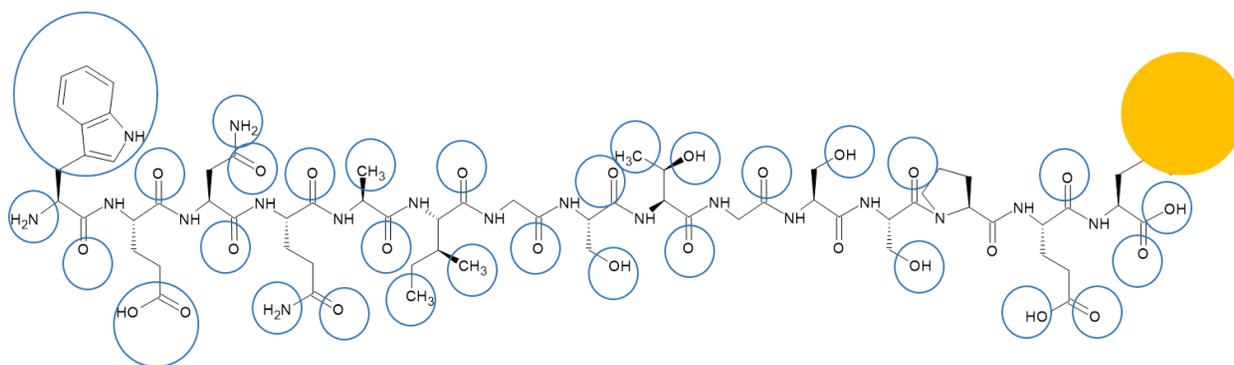


Figura B8. AuNP reducida y estabilizada con el péptido de LptD, donde se observa los grupos funcionales expuestos del péptido anclado a la superficie de la AuNP.

-Grupos funcionales expuestos: Amino, carbonilo, carboxilo, hidroxilo y metil. Sin embargo, predominan amino y carbonilo. Estas nanopartículas tendrían el mismo comportamiento que las soluciones *cis@AuNPs* en pH ácidos y básicos.

-En pH ácidos no existe aglomeración y por lo tanto no hay aumento de tamaño. En pH básico tampoco existe aglomeración y consecuentemente no se percibe un aumento de tamaño.

En PH ácidos, la carga es ligeramente positiva dado que predominan los grupos NH_3 y COO^- , por lo que los grupos NH_3 no se ven afectados en condiciones altas de protones, dando la carga positiva a la superficie de la AuNP. En PH básico, La carga de la AuNP es negativa ya que la alta concentración de OH^- afecta al grupo NH_3 y COO , tal como se observa en la solución con cisteína.