



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO **POSGRADO** 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS CON
NANOTUBOS DE CARBONO
FUNCIONALIZADOS CON ÁCIDOS
NUCLEICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
OMAR ELIGIO OCHOA OLMOS



Tutor: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

MÉXICO, D. F.

Abril 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Transformación de plantas con nanotubos de carbono funcionalizados con ácidos nucleicos

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Tzvetanka Dimitrova Dinkova en el laboratorio 103, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química, UNAM
Dra. Elena Golovataya Dzhybeeva	Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, UNAM
Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra Elena Golovataya Dzhybeeva del Centro de Ciencias Aplicada y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Nacional Autónoma de México en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de funcionalización y caracterización de nanotubos de carbono con aminas alifáticas.

Se reconoce la asesoría técnica de Karina Jiménez Durán e Iván Puentes Lee del Laboratorio de Microcopia de la Facultad de Química de la UNAM, por el manejo del microscopio confocal y los microscopios electrónicos, así como por la toma de las micrografías publicadas en este trabajo.

Se reconoce la asesoría y colaboración de Flavio F. Contreras Torres del Centro de Ciencias Aplicada y Desarrollo Tecnológico de la UNAM, por el manejo del microscopio de Fuerza Atómica, la toma e interpretación de las imágenes utilizadas en este trabajo.

Se reconoce la asesoría de la M. en C. María Teresa de Jesús Olvera Flores y María de Jesús Jiménez Villalobos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química de la UNAM, por la ayuda recibida durante el aprendizaje para el mantenimiento de los callos y las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo.

Se reconoce al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por donar la línea celular de *Nicotiana tabacum L. c.v. Bright Yellow* (NT-1).

El proyecto fue apoyado parcialmente por PAPIIT (IN103009), ICyTDF PIUTE 055-2010 e ICyTDF 333/2009. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y para la realización de la presente tesis una beca bajo el proyecto CONACYT 81708.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día...

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Estela Sánchez Quintanar	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Luis Felipe Jiménez García	Facultad de Ciencias, UNAM
Vocal	Dr. Vladimir Basiuk Evdokimenko	Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM
Secretario	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM, UNAM

“馬の耳に念仏...”

“Rezarle a las orejas de un caballo...”

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1"INTRODUCCIÓN"	2
1.1. Nanotecnología	2
1.1.1. Bionanotecnología	2
1.1.2. Nanomateriales y biocompatibilidad	2
1.2. Nanoestructuras de carbono	3
1.2.1. Historia sobre las nanoestructuras de carbono	3
1.3. Nanotubos de carbono (CNTs)	4
1.3.1. Clasificación de los CNTs	6
1.3.2. Síntesis de CNTs	6
1.3.2.2. Síntesis por vaporización laser	7
1.3.2.3. Síntesis por deposición química de vapor	7
1.3.3. Purificación de CNTs	8
1.3.5. Propiedades generales de los CNTs	8
1.3.5.1. Propiedades electrónicas	9
1.3.5.2. Propiedades térmicas y ópticas	9
1.3.5.3. Propiedades mecánicas	9
1.3.5.4. Solubilidad y dispersabilidad	10
1.4. Modificación y funcionalización química de CNTs	10
1.4.1. Funcionalización no-covalente de CNTs	10
1.4.1.1. Funcionalización por apilamiento π - π	11
1.4.1.2. Funcionalización por interacción endoedraal	12
1.4.1.3. Funcionalización hidrofóbica	12
1.4.2. Funcionalización covalente de CNTs	12
1.4.2.1. Funcionalización covalente de los defectos oxidados	13
1.4.2.2. Funcionalización covalente, libre de solventes, para superficies ideales	13
1.4.2.3. Funcionalización covalente, libre de solventes, para superficies con defectos	15
1.4.3. Funcionalización de CNTs con ácidos nucleicos	16
1.4.3.1. Funcionalización no covalente de CNTs con ácidos nucleicos	16
CAPÍTULO 2"MARCO TEÓRICO"	18
2.1. Biotecnología	18
2.1.1 Biotecnología Agrícola	18
2.1.1.1. Plantas genéticamente modificadas	18

2.1.2. El cultivo de células y tejidos vegetales como herramienta biotecnológica.....	19
2.1.2.1. Desdiferenciación celular	20
2.1.2.2. Fitohormonas	20
2.2. Bases y fundamentos biotecnológicos de la transformación genética en plantas	20
2.2.2. Transformación genética en plantas.....	21
2.2.2.1. Selección e identificación de células y plantas transgénicas.....	22
2.2.3. Métodos de transformación genética en plantas.....	23
2.2.3.1. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
2.2.3.2. Agroinfiltración o floral dip.....	24
2.2.3.3. Transformación de protoplastos.....	25
2.2.3.4. Transformación por plasmólisis	25
2.2.3.5. Transformación por bombardeo o biobalística.....	26
2.2.3.6. Transformación por microinyección.....	27
2.2.3.7. Transferencia de organelos y cromosomas artificiales	27
2.2.3.8. Transformación mediada por vectores virales	28
CAPÍTULO 3” ANTECEDENTES”	30
3.1. Los CNTs son capaces de atravesar la membrana celular en mamíferos	30
3.1.1. Transfección de células de mamífero mediada por CNTs.....	31
3.1.2. Transfección de células de mamífero con RNAs interferentes mediada por CNTs.....	32
3.2. Internalización de CNTs en células con pared celular	33
CAPÍTULO 4” JUSTIFICACIÓN”	36
HIPÓTESIS.....	36
OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVOS PARTICULARES	36
CAPÍTULO 5” MATERIALES Y MÉTODOS”	38
5.1. Materiales “Sección A”	38
5.2. Metodología “Sección A”	38
5.2.1. Funcionalización covalente, libre de solventes, de los defectos de la superficie	38
5.2.2. Purificación de los MWCNTs funcionalizados.....	39
5.2.3. Caracterización de los MWCNTs funcionalizados con aminas alifáticas	39
5.2.3.1. Espectroscopia Raman.....	40
5.2.3.2. Pruebas de solubilidad y dispersabilidad	40
5.2.3.3. Espectroscopia en el Infrarrojo (FT-IR).....	40
5.2.3.4. Análisis Termogravimétrico (TGA)	40
5.2.3.5. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	40
5.2.3.6. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	40
5.2.3.7. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	40

5.3. Materiales “Sección B”	41
5.4. Metodología “Sección B”	43
5.4.1. Obtención las suspensiones celulares	43
5.4.1.1. Inducción de callos a partir de plántulas de NT-X	43
5.4.1.2. Inducción de las suspensiones celulares de NT-X	44
5.4.1.3. Mantenimiento de la línea celular estable NT-1	44
5.4.2. Funcionalización y derivatización de CNTs con moléculas fluorescentes	44
5.4.2.1. Funcionalización no covalente de SWCNTs oxidados con FITC	44
5.4.2.2. Funcionalización y derivatización de MWCNTs con Alexa Fluor® 555-NHS	44
5.4.3. Prueba de internalización de CNTs en células en suspensión	45
5.4.3.1. Prueba de internalización para SWCNT-ox funcionalizados con FITC	45
5.4.3.2. Prueba de internalización para CNT funcionalizados con Alexa Fluor® 555-NHS	45
5.4.3.3. Microscopia confocal	45
5.5. Materiales “Sección C”	46
5.6. Metodología “Sección C”	49
5.6.1. Generación del plásmido AtnCBP-GFP	49
5.6.2. Obtención de células competentes de Escherichia coli DH5α	49
5.6.3. Transformación por choque térmico de Escherichia coli DH5α con el plásmido AtnCBP-GFP	50
5.6.4. Extracción a gran escala del plásmido AtnCBP-GFP	50
5.6.4.1. Preparación de cultivos bacterianos para la extracción del plásmido y stock en glicerol	50
5.6.4.2. Extracción de plásmido a gran escala (midi prep) por lisis alcalina	50
5.6.5. Caracterización del plásmido AtnCBP-GFP	51
5.6.5.1. Cuantificación por espectroscopia	51
5.6.5.2. Digestión enzimática	51
5.6.5.3. Caracterización por reacción de amplificación por PCR	52
5.6.6. Síntesis de DNA marcado fluorescentemente con Alexa Fluor® 555 - NHS	52
5.6.6.1. Marcaje de DNA con 5-(3-aminoalil)-dUTP	52
5.6.6.2. Marcaje de DNA con Alexa Fluor® 555 - NHS	53
5.6.7. Funcionalización de MWCNTs con DNA plasmídico	53
5.6.8. Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos	54
5.6.9. Prueba de transformación genética de células en suspensión con CNTs	54
5.6.9.1. Prueba de transformación genética en células en suspensión con MWCNTs funcionalizados con DNA plasmídico	54
5.6.9.2. Prueba de transformación genética en células en suspensión con MWCNTs funcionalizados con DNA marcado con Alexa Fluor® 555 - NHS	54
5.6.9.3. Microscopia confocal	55
5.6.10. Prueba de biocompatibilidad	55

CAPÍTULO 6 "RESULTADOS Y DISCUSION"	56
6.1. Obtención y caracterización de MWCNTs funcionalizados con aminas alifáticas	56
6.1.1. Espectroscopia Raman	56
6.1.2. Prueba de solubilidad y dispersabilidad	56
6.1.3. Espectroscopia en el Infrarrojo (FT-IR)	58
6.1.4. Análisis termogravimétrico (TGA)	59
6.1.5. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	61
6.1.6. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	61
6.1.7. Microscopia Electrónica de Transmisión	63
6.2. Transformación genética de plantas mediada por MWCNTs funcionalizados con aminas	66
6.2.1. Caracterización del plásmido AtnCBP-GFP	66
6.2.2. Funcionalización no covalente de MWCNTs con DNA plasmídico	67
6.2.3. Transformación genética mediada por MWCNTs	69
6.3. Pruebas de internalización de MWCNTs en células de plantas	71
6.3.1. Prueba de internalización utilizando FITC	71
6.3.2. Prueba de internalización utilizando Alexa® Fluor 555-NHS	74
6.3.3. Prueba de internalización utilizando DNA marcado con Alexa® Fluor 555-NHS	76
6.3.4. Prueba de biocompatibilidad para MWCNTs	79
6.4. Perspectivas del uso de CNTs en la transformación genética de plantas	82
CAPÍTULO 7 "CONCLUSIONES"	86
ABREVIATURAS	88
REFERENCIAS	90

RESUMEN

Transformación de plantas con nanotubos de carbono funcionalizados con ácidos nucleicos

Uno de los objetivos más importantes de la biotecnología agrícola es encontrar un método rápido y eficaz para la transformación genética de plantas. Los métodos existentes para la transformación genética de plantas actualmente no cumplen por completo con ese objetivo, ya que están limitados por diferentes factores tales como el tipo de tejido del que se extraen las células, la especie de interés, o por su nivel de biocompatibilidad. No obstante, la mayor limitante de estos métodos es la presencia de la pared celular, la cual actúa como una barrera física que interfiere con el transporte de macromoléculas hacia interior celular.

Actualmente, ha surgido un gran interés por el uso de nanotubos de carbono (CNTs), especialmente cuando son funcionalizados al añadirles grupos funcionales sobre su superficie debido a sus posibles aplicaciones dentro de la biotecnología. Una de las más importantes aplicaciones es la posibilidad de utilizar CNTs para mediar la transfección de células animales y la transformación genética de células de plantas. Diversos reportes han demostrado que los CNTs pueden ser empleados para mediar la transfección de células de mamífero, ya que éstos son capaces de atravesar la membrana celular fácilmente transportando consigo a los ácidos nucleicos. Sin embargo, debido a la falta de estudios, no se sabe aún con claridad si los CNTs pueden atravesar la pared celular, o si pueden mediar la transformación genética.

En este estudio se realizó la funcionalización de CNTs de pared múltiple (MWCNTs) con aminas alifáticas para aumentar su afinidad por los ácidos nucleicos. Posteriormente, se realizaron pruebas para determinar si los MWCNTs funcionalizados con aminas son capaces de atravesar la pared celular y mediar la transformación genética en células en suspensión de *Nicotiana tabacum*. Los resultados obtenidos a partir de dichas pruebas sugieren que los MWCNTs no son capaces de atravesar la pared celular de células intactas, pero sí son capaces de atravesar la pared celular de las células en proceso de plasmólisis, dando lugar a su transformación genética. Asimismo, se determinó que los MWCNTs funcionalizados con aminas poseen un alto nivel de biocompatibilidad, ya a que no se encontró ninguna evidencia de actividad tóxica. Estos resultados poseen importantes implicaciones nanotecnológicas y biotecnológicas ya que no sólo representan una alternativa atractiva a los métodos de transformación genética de plantas basados en CNTs, sino que también aportan información relevante para el desarrollo de lo que hoy en día se conoce como "bionanotecnología".

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Nanotubos de carbono, características y funcionalización

1.1. Nanotecnología

La “nanotecnología” es la encargada del diseño, caracterización, y aplicación de dispositivos y sistemas creados a partir de materiales de tamaño nanométrico o “nanomateriales”, por lo que son más pequeños que una micra (Figura 1.1). Los “nanomateriales” pueden estar formados por diferentes elementos tales como el oro, el silicio, la plata, el carbono, ente otros, y poseer diversos tamaños y formas que van desde las formas planas, cristalinas, dendríticas y ramificadas, hasta las formas esféricas, tubulares y fibrosas [1-3].

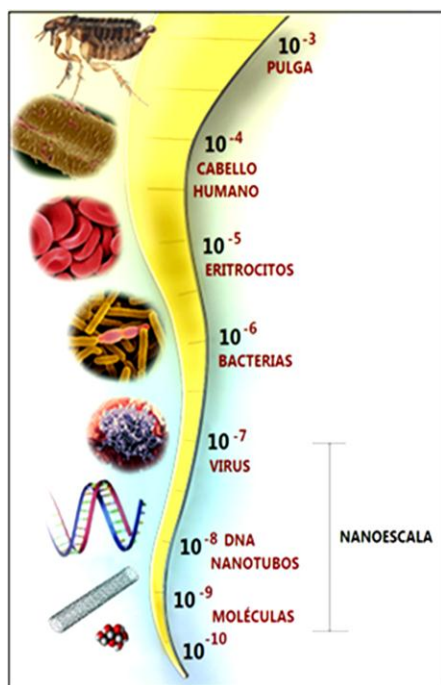


Figura 1.1 La escala nanométrica. Modificado de <http://www.discovernano.northwestern.edu/whatis/index.html/Images/howsal.jpg>

de los bionanomateriales funcionales; d) la modelación y predicción del comportamiento de los mismos; y e) la búsqueda de aplicaciones de interés biológico [1].

1.1.1. Bionanotecnología

La “bionanotecnología” es el campo de estudio de la nanotecnología que involucra a las ciencias biológicas [4]. La bionanotecnología se encarga de la caracterización, procesamiento, y la organización de los nanomateriales dentro de los sistemas biológicos empleando biomoléculas tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos, etc., así como de la fabricación de nanomateriales híbridos o “bionanomateriales” con novedosas propiedades y aplicaciones [2, 4].

Las principales actividades realizadas dentro de la bionanotecnología involucran la manipulación y organización de biomoléculas capaces de autoensamblarse sobre la superficie de un nanomaterial a través de una serie de pasos metodológicos que implican [5]: a) el desarrollo de técnicas de autoensamblaje y alineamiento para la fabricación de los bionanomateriales híbridos a partir de la interacción “biomolécula—nanomaterial”; b) el desarrollo y fabricación de dichos híbridos; c) el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la selección y caracterización

1.1.2. Nanomateriales y biocompatibilidad

La fabricación y el uso de los nanomateriales puede traer consigo un potencial riesgo a la salud y al ambiente, es por eso por lo que diversas áreas dentro de la toxicología se han encargado de determinar el nivel de biocompatibilidad

de estos materiales, a partir del estudio de sus propiedades tóxicas [6-8]. Así, es posible identificar cuáles son las diferentes vías de exposición y mecanismos por los cuáles los nanomateriales pueden actuar como agentes nocivos [8, 9], y definir niveles de exposición seguros, para emplearlos dentro de un sistema biológico con mayor seguridad [2, 8]. La biocompatibilidad entonces se define como la habilidad de un material para actuar de manera segura sin causar daños o efectos adversos a un sistema biológico (célula, tejido, órgano, individuo, población, etc.).

Dentro de los bioensayos recomendados para determinar la biocompatibilidad de un material, se encuentran aquellos que evalúan su actividad citotóxica y genotóxica. El término citotóxico describe la capacidad de un material para inducir muerte o inhibir la proliferación celular, mientras que el término genotóxico describe la capacidad para causar mutaciones directamente en el DNA o en los cromosomas de un organismo [7].

1.2. Nanoestructuras de carbono

Uno de los grupos de nanomateriales más investigados es el de las nanoestructuras o nanomateriales de carbono (Figura 1.2) [8-10]. Estos nanomateriales poseen extraordinarias propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas, y mecánicas, las cuales los hacen excelentes candidatos para el desarrollo de diversas aplicaciones en áreas como la industrial, la electrónica, la química, y especialmente en las ciencias biológicas [1, 3, 9, 11]. Asimismo, cuando estos materiales interactúan con diferentes moléculas biológicas (aminas, proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos) se pueden obtener bionanomateriales híbridos con nuevas propiedades físico-químicas y biológicas [3, 7, 8, 11, 12].

1.2.1. Historia sobre las nanoestructuras de carbono

Antiguamente se pensaba que la familia del carbono elemental estaba conformada por el diamante, el grafito, el carbono amorfo y el poliacetileno (Figura 2); sin embargo, en 1985 Harold Kroto y Richard Smalley [13, 14] descubrieron un nuevo miembro conocido como "fullerenos".

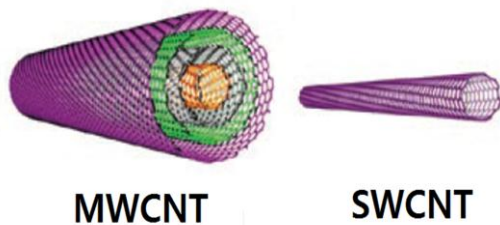


Figura 1.4. Esquema de los dos tipos básicos de CNTs, en el cual se muestra un SWCNT y un MWCNT. Modificado de Hersam, 2008 [16].

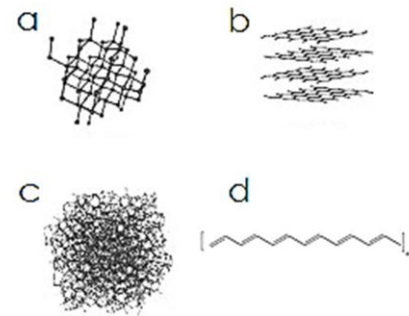


Figura 1.2. Familia del carbono alotrópico elemental: a) diamante; b) grafito; c) carbono amorfo; d) poliacetileno. Modificado de http://wpcontent.an.wcdn.com/wikipe-dia/commons/thumb/ff/ff/Eight_Allotropes_of_Carbon.png/300px-Eight_Allotropes_of_Carbon.png

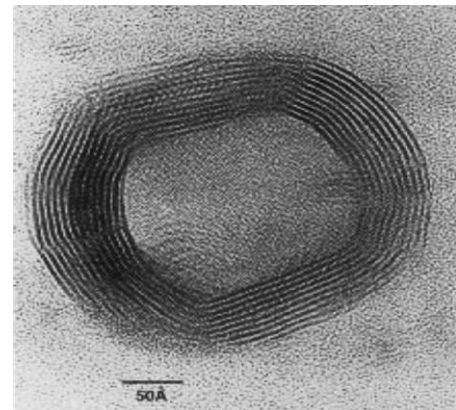


Figura 1.3. Micrografía TEM de un fullereno de paredes múltiples. Tomada de: <http://www.iwr.uni-heidelberg.de/organization/bioms/schwarz/nanoparticle.jpg>.

Los fullerenos son cajas cerradas formadas por átomos de carbono (Figura 1.3) con diferentes estructuras que van desde las formas esféricas y cónicas, hasta las tubulares [15]. A partir de las formas tubulares se puede derivar un nuevo grupo de estructuras conocidas como "nanotubos de carbono" o CNTs; por sus siglas en inglés, las cuales se agrupan básicamente en dos tipos (Figura 1.4): los CNTs de pared simple SWCNTs; por sus siglas en inglés, y los CNTs de pared múltiple o MWCNTs; por sus siglas en inglés [14-16].

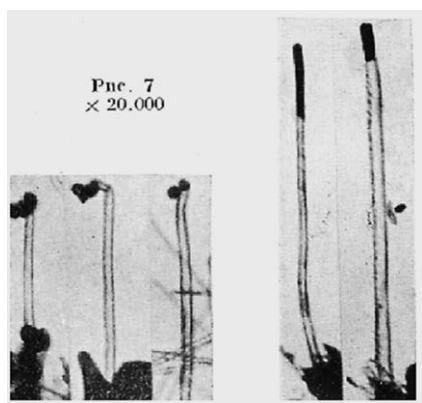


Figura 1.5. Micrografías TEM de Radushkevich y Lukyanovich. Tomada de Radushkevich, 1952 [23].

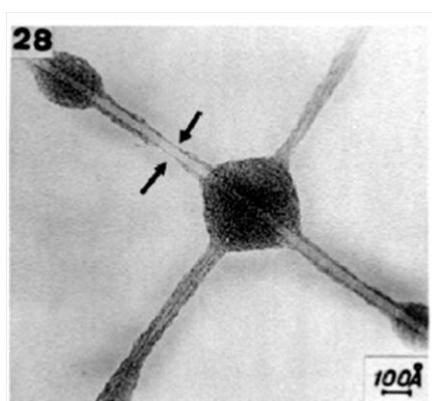


Figura 1.6. Micrografías obtenidas por Oberlin de lo que podría ser un DWCNT. Las flechas indican las zonas semejantes a un SWCNT. Tomado de Oberlin, 1976 [25].

En los años ochenta cuando la microscopía TEM fue mejorada y las investigaciones realizadas por Iijima abrieron paso al estudio de la estructura de los CNTs con una mayor resolución [17, 26, 27]. Iijima hacía pasar chispas eléctricas a través de dos barras de grafito, vaporizándolas para obtener una masa condensada de carbono, que al observar al microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés) presentaba moléculas tubulares y huecas con múltiples capas (Figura 1.7) denominadas MWCNTs [27, 28].

1.3. Nanotubos de carbono (CNTs)

Los CNTs son macromoléculas cilíndricas, cuyas paredes están formadas por átomos de carbono que forman un enrejado hexagonal o de panal (Figura 1.8-A), las cuales presentan diámetros variados que van desde algunos nanómetros hasta unas cuantas micras. Los extremos de las paredes (Figura 1.8-A) pueden

Es bien conocido que en 1991 el descubrimiento de los SWCNTs fue publicado independientemente en la revista Nature [17] por los investigadores Iijima [18] y Bethune [19]; sin embargo, muy pocos saben que a partir del año de 1889 ya se había mencionado la existencia de filamentos formados por carbono obtenidos a partir de la descomposición térmica de hidrocarburos como el metano [20-22]. Posteriormente, con la llegada del Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) en los años 50, los investigadores rusos Radushkevich y Lukyanovich evidenciaron la naturaleza tubular de dichos filamentos (Figura 1.5) [23]; pero, a causa del estallido de la guerra fría y al limitado acceso de las publicaciones rusas, muchos de estos artículos ni siquiera han sido mencionados en la literatura [17]. No obstante, los investigadores rusos deberían ser acreditados por el descubrimiento de los CNTs.

En el año de 1958, Hillert y Lange reportaron la existencia de fibras de carbono con múltiples capas que exhibían una estructura concéntrica, tal como la de los MWCNTs; sin embargo, estas observaciones pasaron desapercibidas [24]. Más tarde, en 1976 Oberlin y colaboradores publicaron una imagen que pareciera mostrar la figura de un CNT de paredes dobles (DWCNT, por sus siglas en inglés) con algunas zonas semejantes a un SWCNT (Figura 1.6) [25].

En los años ochenta cuando la microscopía TEM fue mejorada y las investigaciones realizadas por Iijima abrieron paso al estudio de la estructura de los CNTs con una mayor resolución [17, 26, 27]. Iijima hacía pasar chispas eléctricas a través de dos

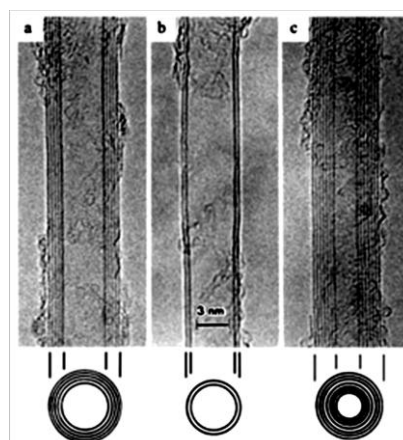


Figura 7. Micrografías HRTEM originales realizadas por Iijima. Tomado de Iijima, 1991 [27].

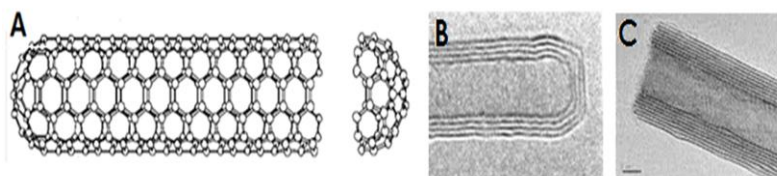


Figura 1.8. A) Esquema de las regiones básicas de un SWCNT; micrografías HRTEM de un MWCNT con extremos cerrados (B), y extremos abiertos (C). Modificado de Dresselhaus 2001 [14]; Dai, 2002 [31]; y <http://www.rsc.org/egg/JM/2004/b310609h-ga.gif>

encontrarse cerrados por estructuras derivadas de fullerenos formando una cápsula (Figura 1.8-B), o a encontrarse abiertas (Figura 1.8-C) [29-31].

La formación del cilindro de un CNT puede ser visualizada a partir del enrollamiento de una hoja de grafito (Figura 1.9), conectando los puntos **O** y **A** dentro del vector quiral C_h [14, 16, 30]. Asimismo, en la hoja de grafito se han determinado diferentes parámetros que influyen en la simetría de un CNT: el vector OA llamado vector quiral o $C = n\hat{a}_1 + m\hat{a}_2$ definido por los vectores a_1 y a_2 , y el ángulo quiral θ respecto al eje zigzag. La operación de simetría básica define la dirección de enrollamiento de la hoja de grafito, y está formada por el vector $OB = T$ (Figura 1.10) [14, 16].

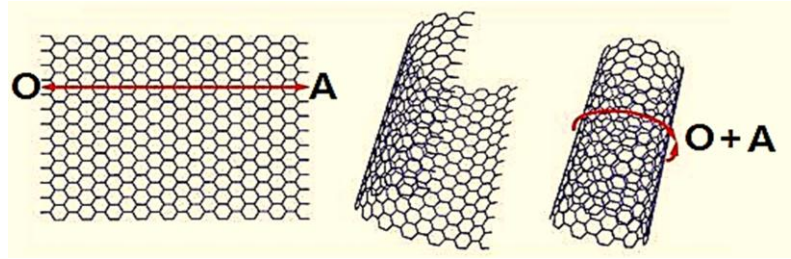


Figura 1.9. Formación del cilindro que compone la pared de un CNT. Los puntos **O** y **A** se unen durante el enrollamiento de la hoja de grafito. Modificada de: http://cdn.dipity.com/uploads/events/cc84e342f043cb06938cf92c1329ec0f_1M.png

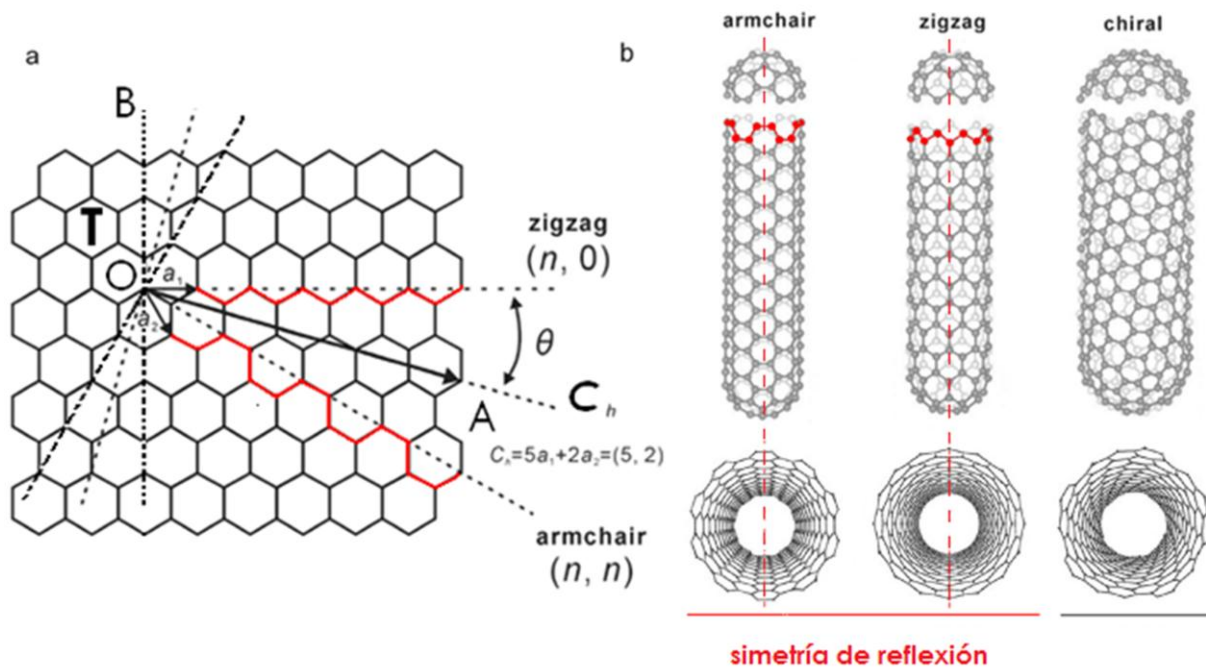


Figura 1.10. Parámetros básicos de la hoja de grafito que dará origen a un nanotubo de carbono (a). Clasificación de los CNTs de acuerdo con su simetría quiral y simetría de reflexión (b). Modificada de Balasubramanian, 2005 [30]; http://fgmdb.nal.go.jp/sspsimg/jimages/jimage3_1/fig-3_1_1.gif; y <http://theory.lsi-polytechnique.fr/results/nanotubes/nanotubes.jpg>.

Los extremos cerrados de los CNTs están formados por la combinación de átomos de carbono dispuestos en anillos pentagonales y hexagonales, como en los fullerenos [15, 32]. El “teorema de Euler” (Figura 1.11-A) indica que se necesitan 12 pentágonos (Figura 1.11-B) para la obtención de un CNT ideal cerrado por ambos lados [15, 33], ya que cuando se coloca un pentágono y a su alrededor cinco hexágonos se obtiene una curvatura convexa de la superficie. Por otro lado, “la regla del pentágono aislado” establece que la distancia entre los pentágonos debe estar maximizada para obtener una mínima curvatura local, resultando así en una estructura muy estable y con un diámetro mayor (Figura 1.11-C) [15, 34].

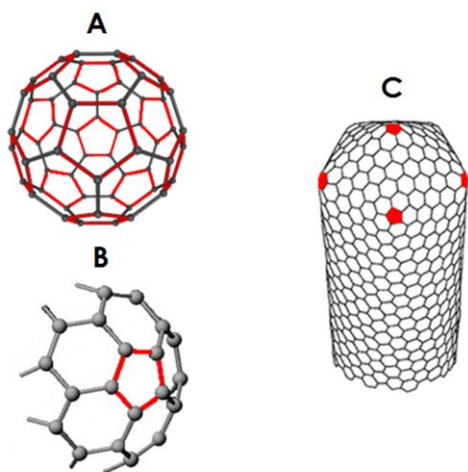


Figura 1.11. A) Estructura ideal que cumple con el teorema de Euler, y presenta 12 pentágonos (rojo). B) Superficie convexa de los extremos cerrados formada por un pentágono asociado a 6 hexágonos. C) Regla del pentágono aislado. Modificado de <http://content.answer.com/main/content/wp/en/thumb/3/31/200px0a.png>; y <http://www.nanonet.g-o.jp/english/mailmag/2006/files/070a1.gif>

1.3.2. Síntesis de CNTs

Teóricamente, la estructura más pequeña estable obtenida durante la síntesis de CNTs, es una molécula de fullereno con 60 átomos de carbono (C_{60}); sin embargo, para formar un CNT ideal se toma dicha molécula y se corta por la mitad, insertándoles un anillo de 10 átomos de carbono para originar una molécula formada por 70 átomos carbonos (C_{70}). Esta molécula es considerada como el CNT de menor tamaño. Así, al ir agregando más anillos se obtienen cilindros que incrementan su longitud de 10 en 10 (Figura 1.13) [30].

En la realidad, el modelo más aceptado para explicar la formación y el crecimiento de un CNT (Figura 1.14) propone que durante su síntesis los átomos de carbono obtenidos a partir de fuentes como el metano, acetileno, C_2 , etc., comienzan a difundir sobre una superficie catalizadora que contiene partículas metálicas (Fe, Co, Ni, o el Mo), sobre las cuales se forma

1.3.1. Clasificación de los CNTs

Los CNTs presentan tres diferentes clasificaciones de acuerdo con las características de sus paredes. La primera clasificación se basa en el número de paredes que presentan [35], y básicamente existen dos tipos: los SWCNTs (Figura 1.12-A) que consisten en de una sola pared [16, 32, 36, 37]; y los MCWNTs (Figura 1.12-B), considerados como colecciones concéntricas de múltiples paredes o SWCNTs separados por un espacio interplanar aproximado de 0.36 nm [14, 15, 27, 31, 32, 37, 38]. La segunda clasificación se basa en la simetría que poseen (Figura 1.10-b) dividiéndose en dos tipos: 1) los CNTs con simetría de reflexión isomórfica; y 2) los CNT sin simetría de reflexión o no-isomórficos [35]. La tercera clasificación se basada en los *índices de Hamada* o de "quiralidad n y m " (Figura 1.10-a), de los cuales se derivan tres tipos (Figura 1.10-b): 1) los CNTs de tipo armchair cuando $n = m$, y $\Phi = 30^\circ$ [14, 30, 39]; 2) los CNTs de tipo zigzag cuando $m=0$ y $\Phi = 0^\circ$; y 3) los CNTs de tipo quiral, cuando $n > m > 0$, y $0^\circ < \Phi < 30^\circ$ [14, 16, 30].

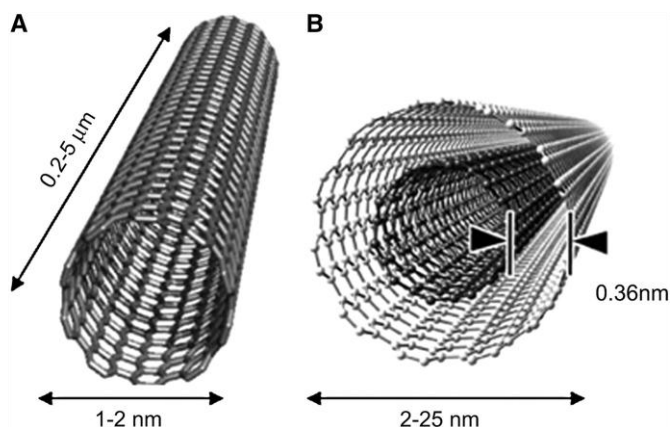


Figura 1.12. Comparación entre las estructuras y dimensiones de un SWCNT (A) y un MWCNT (B) de dos paredes (DWCNT). Tomado de <http://jnm.snmjournals.org/content/48/7/1039/F1.large.jpg>.

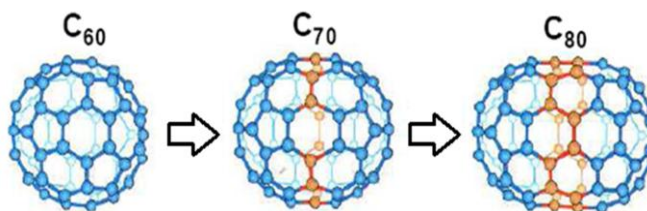


Figura 1.13. Modelo de la inserción de anillos con 10 átomos de carbono que originan un CNT a partir de un fullereno C_{60} . Modificada de: <http://nano.nchc.org.tw/dictionary/ima-ge/c60-4.gif>

un precursor que sufre un proceso de grafitización (formación de hexágonos) por el cual se origina la pared cilíndrica de un CNT [15, 40, 41]. En la actualidad existen diversos métodos la síntesis de CNTs que emplean diferentes estrategias con las que se pueden obtener SWCNTs o MWCNTs con diferentes dimensiones, grados de pureza, y escala de producción.

1.3.2.1. Síntesis por descarga de arco

En este método se hace pasar una corriente directa a través de dos barras de grafito separadas por una distancia aproximada de 1 mm, vaporizándolas en presencia de gas He o Ar a baja presión. Esto origina un plasma caliente (Figura 1.15) [14, 40] que contiene una porción interna muy frágil formada por CNTs y fullerenos; y otra porción externa muy dura formada por cristales de grafito [15, 42]. Si la descarga se realiza en presencia de catalizadores metálicos se obtendrán mayoritariamente SWCNTs; de otro modo se obtendrán en su mayoría MWCNTs [15].

1.3.2.2. Síntesis por vaporización láser

El método consiste en hacer incidir un láser de manera continua o en forma intermitente sobre grafito en presencia de una mezcla de metales y gases (He, Ar, etc.) a baja presión dentro de un horno a temperatura de 1200°C (Figura 1.16). El grafito se vaporiza y expande, enfriándose rápidamente, permitiendo que clústeres de carbono se adhieran y depositen en un colector, los cuales contendrán básicamente una mezcla de SWCNTs con algunas nanopartículas de carbono amorfo y fullerenos [15, 40].

1.3.2.3. Síntesis por deposición química de vapor

El método de síntesis por deposición química de vapor es utilizado para producir CNTs a gran escala (Figura 1.17). La técnica utiliza una fuente de carbono en fase gaseosa (metano, acetileno, etc.) dentro de un horno en presencia de gases como He o Ar, a una temperatura

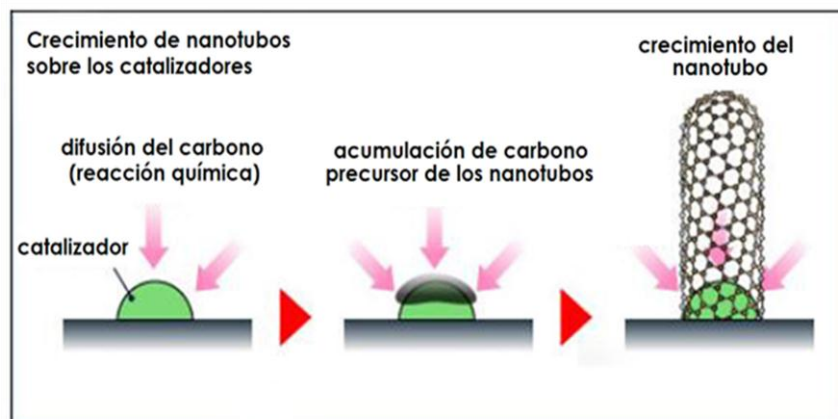


Figura 1.14. Modelo de crecimiento de CNTs sobre catalizadores metálicos durante su síntesis. Modificado de Kageyama, 2007 [40].



Figura 1.15. Esquema del método de síntesis por descarga de arco. Modificado de Kageyama, 2007 [40].

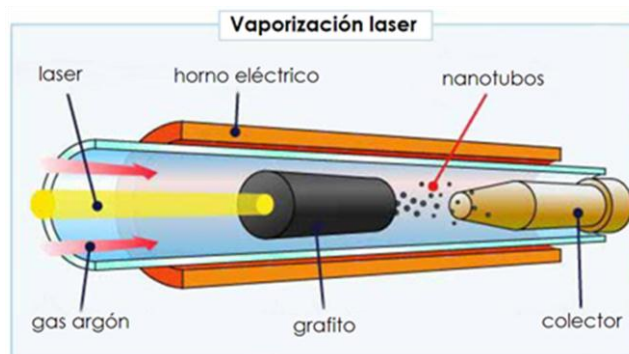


Figura 1.16. Esquema del método de síntesis por vaporización láser. Modificado de Kageyama, 2007 [40].

aproximada de 500-1000 °C [15, 40, 41]. Con este método se pueden obtener tanto SWCNTs como MWCNTs con diámetros y longitudes que van desde unas cuantas micras hasta a unos cuantos milímetros [40].

1.3.3. Purificación de CNTs

Una vez que los CNTs han sido sintetizados, se procede a purificarlos y seleccionarlos. Los métodos de purificación incluyen procedimientos selectivos entre los que destacan los métodos de oxidación, tratamientos con sustancias orgánicas, centrifugaciones, filtraciones, ultrasonificaciones, cromatografías, entre otros. Estos procedimientos permiten la separación de formas indeseables (fullerenos, carbono amorfo) e impurezas (catalizadores, etc.) que son producidas durante la síntesis, con la posibilidad de separarlos por diámetro, longitud y tipos (SWCNTs o MWCNTs) [14, 15, 35, 42].

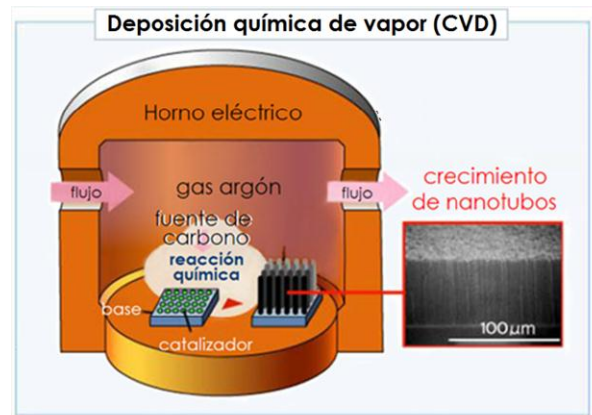


Figura 1.17. Esquema del método de síntesis por vaporización por deposición. Modificado de Kageyama, 2007 [40].

1.3.4. Defectos de la superficie

Los CNTs no son estructuras ideales, ya que durante su síntesis se forman defectos sobre la superficie de sus paredes que alteran el número de átomos de carbono que los componen y por lo tanto su morfología. Aproximadamente más del 3% de los átomos de carbono de un CNT se localizan en sitios con defectos, principalmente formando estructuras en forma de anillos pentagonales. Estos defectos producen una distorsión local en la superficie, provocando una curvatura convexa, muy pronunciada y tensa que aumenta considerablemente la reactividad química del CNT [30, 43-45].

Una de las estructuras con defectos más conocidas localizadas en los extremos cerrados de un CNT son las unidades de piracileno o estructuras "6-5-5-6" (Figura 1.18) las cuales poseen defectos pentagonales [30, 43, 46]. Otras estructuras asociadas a defectos pentagonales son las unidades "Stone-Wales" o estructuras "7-5-5-7" (Figura 1.19), las cuales presentan un par de anillos pentagonales unido a un par de anillos heptagonales). Debido a la gran importancia que tienen los defectos en la modificación química de los CNTs, existen diversas estrategias para inducir defectos sobre las paredes ideales, ya sea variando las condiciones para la síntesis, o una vez sintetizados exponerlos a radiación o la oxidación [30, 44, 45].

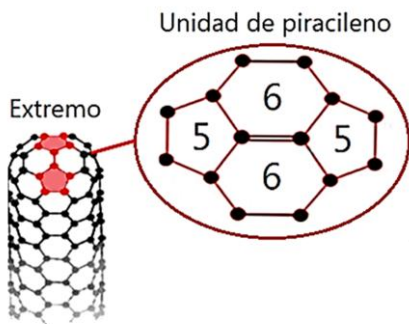


Figura 1.18. Extremo de un CNT que presenta una unidad de piracileno. Modificado de <http://ertekin.mechs.illinois.edu/files/2011/08/K.T.png>

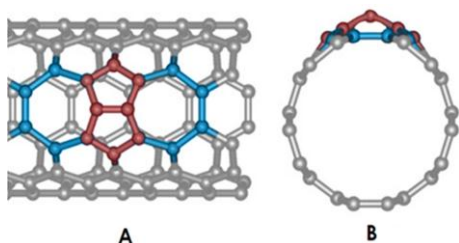


Figura 1.19. Defectos tipo Stone-Wales: A) Vista superior de un CNT con defectos pentagonales (en rojo); B) vista frontal del CNT que muestra la distorsión en la superficie debido a la presencia del defecto. Modificado de Balasubramanian, 2005 [30].

1.3.5. Propiedades generales de los CNTs

Los CNTs son estructuras con extraordinarias e inigualables propiedades, las cuales se originan a partir del peculiar arreglo que se forma por los enlaces entre sus átomos de carbono [36, 47].

1.3.5.1. Propiedades electrónicas

Las propiedades electrónicas de un CNT dependen del diámetro y del arreglo geométrico-espacial de sus átomos de carbono, por lo que existen CNTs que se comportan como largos cables por los cuales los electrones pueden propagarse libremente como si fueran metales ordinarios, y CNTs que se comportan como materiales semiconductores (Figura 1.20-A). Estas propiedades los hacen candidatos ideales para el desarrollo de circuitos eléctricos, nanoprocesadores, y otros dispositivos electrónicos [47, 48].

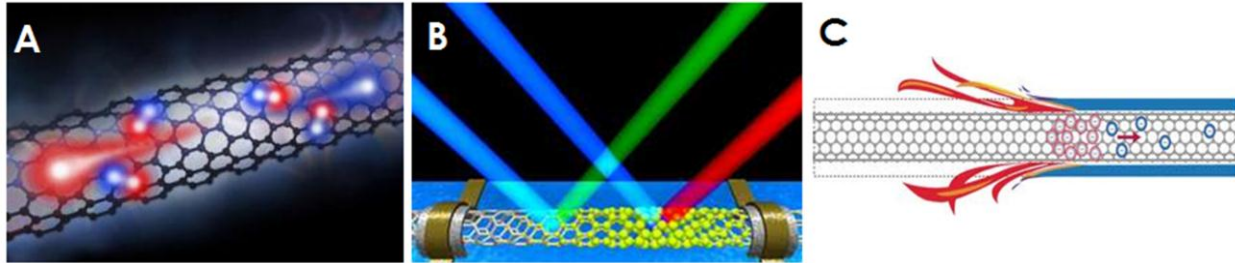


Figura 1.20. Representación gráfica de un SWCNT conduciendo a lo largo de su eje electrones (A) y calor (C). En (B) se muestra un SWCNT emitiendo fotones en diferentes longitudes de onda al ser radiado con luz infrarroja.

Las paredes de un CNT presentan un patrón hexagonal que se repite periódicamente en el espacio, cada átomo de carbono está unido covalentemente a tres átomos de carbono vecinos cuya hibridación es sp^2 [36]. A diferencia del grafito, las uniones sp^2 en los nanotubos no son “puras”, debido a que el enrollamiento de la hoja de grafito produce una rehibridación de los orbitales σ y π , cambiando el tamaño de sus lóbulos (Figura 1.21) [49]. Particularmente, los enlaces π que se encuentran por fuera del plano son enlaces muy débiles, y cuando se hace pasar una corriente eléctrica los electrones fluyen a través de éstos [14, 33, 36, 47, 48, 50].

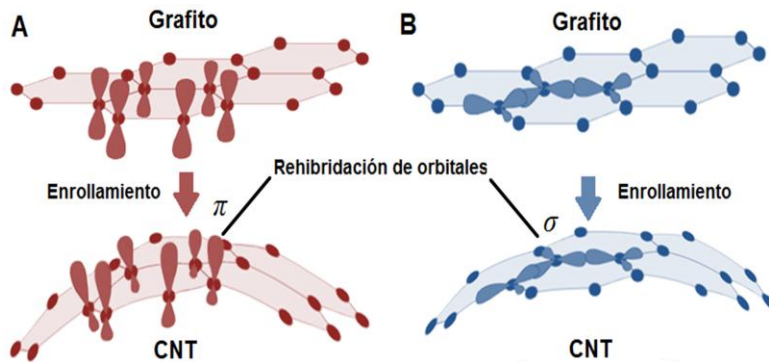


Figura 1.21. A) Rehibridación de orbitales π y σ debido al enrollamiento de la hoja del grafito. Modificada de http://www.fq.uh.cu/dpto/qi/nestor/enlace_web/descriptiva_final_web/Periodicidadlaminas/Grafito-Pi.gif

onda cuando son irradiados con luz infrarroja (Figura 1.20-B). Por lo anterior, los CNTs se han propuesto para el desarrollo de dispositivos ópticos y sensores [15, 52, 53].

1.3.5.2. Propiedades térmicas y ópticas

1.3.5.2. Propiedades térmicas y ópticas

Los CNTs presentan una notoria conductividad térmica en dirección a su eje (Figura 1.20-C) [35], la cual es inversamente proporcional al su diámetro y directamente proporcional al número de defectos [51]. Por otro lado, los CNTs también poseen cierta actividad óptica, la cual está muy relacionada con el carácter metálico o semiconductor; éstos son capaces de emitir fotones a diferentes longitudes de

onda cuando son irradiados con luz infrarroja (Figura 1.20-B). Por lo anterior, los CNTs se han propuesto para el desarrollo de dispositivos ópticos y sensores [15, 52, 53].

presencia de los enlaces σ de alta energía entre los átomos de carbono (Figura 1.21) [49, 55]. Los CNTs pueden ser doblados y comprimidos a lo largo de su eje sin causarles daño alguno por un mecanismo conocido como “compresión axial”. Inicialmente el CNT permanece rígido y erecto, hasta un punto en el que la presión ejercida sobre él aumenta hasta doblarlo en un ángulo perpendicular a su eje, al retirar la fuerza el CNT regresa a su estado original sin daño alguno aparente (Figura 1.22) [55, 56] [54, 57-59].

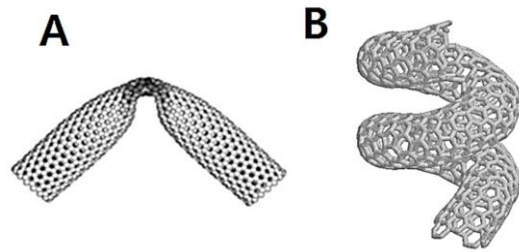


Figura 1.22. A) SWCNT doblado por la mitad; B) SWCNT enroscado. Modificado de Bernholc, 2002 [57]; y <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/unwin/nano tub.GIF>.

1.3.5.4. Solubilidad y dispersabilidad

Una de las características de los CNTs es su baja solubilidad y dispersabilidad en agua [43], por lo que son considerados como moléculas altamente hidrofóbicas. Los CNTs tienden a formar cúmulos y agregados (Figura 1.23) a través de fuerzas Van der Waals muy estables, lo cual impide su dispersión y separación en nanotubos individuales [60]. La solubilidad /dispersabilidad de los CNTs se ve influenciada principalmente por el diámetro y la longitud [61], por tal motivo un CNTs corto será mucho más fácil de dispersar y solubilizar que un CNT de mayor dimensión [62].

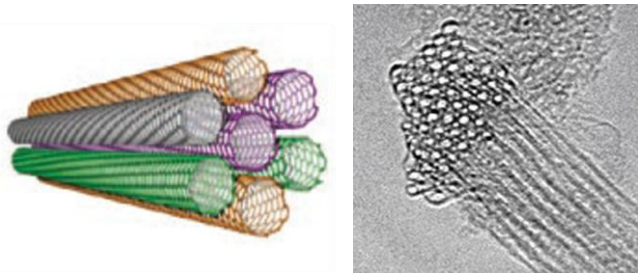


Figura 1.23. Representación de un cúmulo de SWCNTs (izquierda). Micrografía TEM de un cúmulo de SWCNTs. Modificado de Hersam, 2008 [16]; y Dresselhaus, 2001 [14].

En la actualidad se recurre al uso de solventes orgánicos como el tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF) y el isopropanol para aumentar la solubilidad y dispersabilidad en medios acuosos [63]; sin embargo, el uso de solventes orgánicos puede ser nocivo para su aplicación dentro de los sistemas biológicos [7, 8, 12, 64]. Otra forma de aumentar la solubilidad/dispersabilidad de los CNTs

es a través de su modificación química por medio de la adición de grupos funcionales como las aminas que son capaces de interactuar con el agua [43, 65, 66].

1.4. Modificación y funcionalización química de CNTs

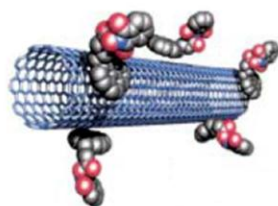
Cuando se efectúa una modificación o cambio en la naturaleza química de un CNT, se emplea el término “modificación química”. El término “funcionalización” se utiliza cuando dicha modificación requiere de la introducción de grupos funcionales o grupos químicamente reactivos respecto al CNT. Si se generan derivados a partir de los grupos funcionales previamente introducidos se utiliza el término “derivatización” [7, 43]. Como resultado de la modificación química es posible obtener “nanoestructuras híbridas” con mayor solubilidad y con novedosas propiedades físico-químicas y biológicas [7, 43, 65]. La funcionalización de CNTs puede dividirse en dos grandes grupos: 1) la funcionalización no-covalente, y 2) la funcionalización covalente (Figura 1.24) [65].

1.4.1. Funcionalización no-covalente de CNTs

Los métodos de funcionalización no-covalente de CNTs están basados en la interacción exoedral (externa) y endoedral (interna) con otras moléculas, sin la necesidad de formar enlaces entre los átomos de carbono de la pared del CNT [65].

FUNCIONALIZACIÓN

NO-COVALENTE



Apilamiento π - π
(exoedra)



Interacción endoedra



Hidrofóbica
(exoedra)

FUNCIONALIZACIÓN

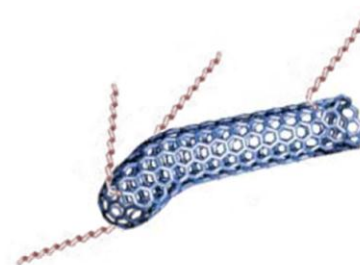
COVALENTE



Defectos oxidados



Superficie ideal



Defectos de la superficie

Figura 1.24. Tipos de funcionalización de CNTs: 1) funcionalización covalente; y 2) funcionalización no-covalente. Modificado de Hirsch, 2002 [45].

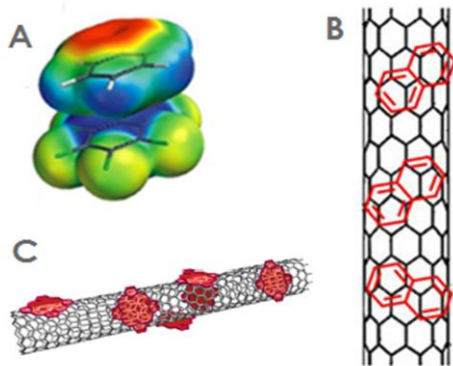


Figura 1.25. Interacción por apilamiento π - π . A) Las nubes electrónicas de los anillos aromáticos interactúan con los anillos aromáticos de otras moléculas (B). Porfirinas (rojo) unidas a la superficie de un SWCNT (C). Modificado de Murakami 2007 [67]; <http://homepages.eac.uk/scockroff/images/gallery/4.jpg>; y <http://inbt.jhuedu/images/newsimages/carbon-nanotubes.jpg>

1.4.1.1. Funcionalización por apilamiento π - π

La funcionalización exoedra por apilamiento π - π (Figuras 1.24 y 1.25) se realiza cuando los anillos hexagonales de la pared de un CNT interactúan con los anillos de compuestos aromáticos con orbitales π deslocalizados. Al apilarse el uno sobre el otro desplazan los electrones de sus nubes electrónicas (Figura 1.25—A), resultando en una interacción muy estable [65]. Algunos de los compuestos aromáticos típicamente utilizados son aquellos derivados de pirenos como el N-succimidiléster-1-pirenobutanoato, los derivados de pirroles como las porfirinas (Figura 1.25—C), los derivados de índoles, piridinas y xantinas como algunos aminoácidos, bases nitrogenadas del DNA y moléculas fluorescentes, entre otros [45, 65, 67].

1.4.1.2. Funcionalización por interacción endoedra

Cuando los CNTs poseen extremos abiertos, su cavidad interna ofrece un espacio para el almacenamiento de moléculas hospederas (Figura 1.24 y 1.26) como partículas metálicas y metalofullerenos (fullerenos que contienen partículas metálicas asociadas en su interior [45]). Particularmente, los metalofullerenos se encapsulan formando largas cadenas que interactúan a través de fuerzas Van der Waals (Figura 1.27) [68]. A este arreglo peculiar en general se le conoce como “peapods” o de “vaina de chicharos” [45, 68].

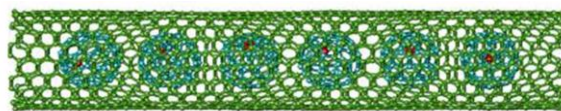


Figura 1.26. Representación gráfica de un “peapod”. Se muestra un CNT que contiene metalofullerenos encapsulados en su interior. Modificado de <http://www.lme.pku.edu.cn/~guoao/research/fig1.1.jpg>; <http://www.chem.nagoya-u.ac.jp/0050/0501.jpg>

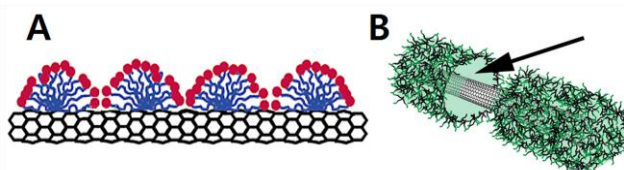


Figura 1.27. A) Ejemplo de interacción hidrofóbica entre un SWCNT y el SDS. B) Se puede observar el espacio hidrofóbico que se forma entre el SDS y el CNT (flecha negra) en solución. Modificado de http://ziegler.che.ufl.edu/Research/s_wcnts.htm.

1.4.1.3. Funcionalización hidrofóbica

Este método de funcionalización exoedra no covalente involucra la interacción hidrofóbica de CNTs con moléculas anfifílicas (Figura 1.24). Las moléculas anfifílicas interactúan a través de sus regiones hidrofóbicas con la superficie del CNT, exponiendo al medio acuoso sus regiones hidrofílicas para minimizar la interfase hidrofóbica entre los CNTs y el agua (Figura 1.26-B). Algunos de los compuestos anfifílicos empleados son algunos fosfolípidos [69] y detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS) (Figura 1.27-B). La funcionalización por interacciones hidrofóbicas se emplea para acoplar algunos péptidos anfifílicos y ácidos nucleicos, los cuales son capaces de enrollarse sobre la superficie de los CNTs a través de su región hidrofóbica adoptando una estructura helicoidal (Figura 1.24) [65]. Otros compuestos como el poliestireno-sulfonato (PSS), el polivinilpirrolidona (PVP) interactúan tanto hidrofóbicamente como por apilamiento π - π , haciendo más estable su interacción con los CNTs [65].

1.4.2. Funcionalización covalente de CNTs

A diferencia de la funcionalización no covalente, la funcionalización covalente requiere de la formación de enlaces químicos para la adición de grupos funcional. Muchas de las aplicaciones de los CNT requieren de la funcionalización covalente, es por eso que se han desarrollado diferentes métodos entre los que destacan los que hacen uso de tratamientos oxidativos y los que realizan la adición directa de un grupo funcional en la pared [43, 45, 65, 70].

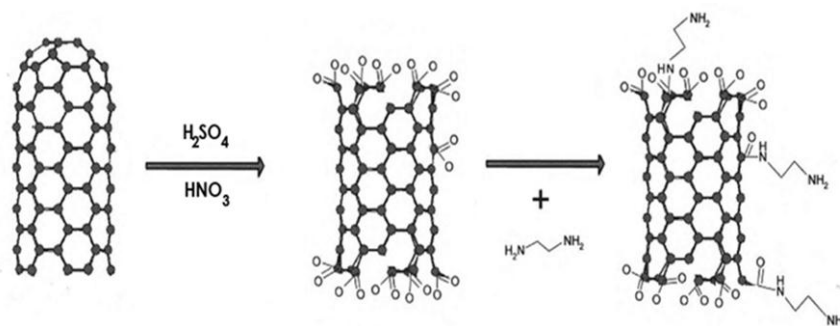


Figura 1.28. Funcionalización covalente de los defectos oxidados. Los CNTs son tratados con ácidos para inducir la aparición de defectos oxidados y cortes en las paredes. Durante la derivatización, los grupos carboxilo de los defectos reaccionan con los grupos amino de la amina alifática DO por simple reacción de amidación, permitiendo que ésta se adhiera covalentemente a la pared.

1.4.2.1. Funcionalización covalente de los defectos oxidados

Esta metodología utiliza mezclas de ácidos como el H_2SO_4 y el HNO_3 u otros agentes oxidantes como el OsO_4 y el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, para obtener CNTs altamente desgastados y con una gran cantidad de defectos oxidados (Figura 1.28) los cuales poseen grupos funcionales (ácidos carboxílicos, cetonas, alcoholes y ésteres) capaces de unirse a otras moléculas a través de la amidación y la esterificación [65].

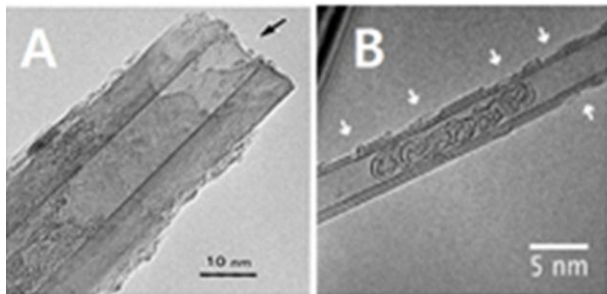


Figura 1.29. A) Extremo de un MWCNT abierto (flecha negra) de un MWCNT por tratamiento ácido. B) Paredes desgastadas y rotas (flechas blancas) de un MWCNT tratados con ácidos. Modificado de Saito, 1997 [73]; <http://www.fz-juelich.de/cae/Servlet/contentblob/923550/poster/10861/TEMox.jpg.jpg;jsessionid=CE64E54E98049E9518754FDED8B75DA2>.

(Figura 1.29) que han perdido sus propiedades intrínsecas [43, 46, 48, 70, 72, 73], y debido a que los defectos oxidados se asocian a la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) presentan una notable actividad tóxica [74-78], contaminante e indeseada [8, 43, 46, 70, 72].

1.4.2.2. Funcionalización covalente, libre de solventes, para superficies ideales

En comparación con el método de funcionalización por defectos oxidados, la funcionalización covalente, libre de solventes, para superficies ideales introduce directamente los grupos funcionales sin necesidad de utilizar tratamientos oxidativos. Este tipo de funcionalización se basa en la química de fullerenos, por lo que la reactividad química será inversamente proporcional al diámetro; por lo que un CNT de menor diámetro presentará una mayor reactividad química en comparación a uno de mayor diámetro [45, 79]. Sin embargo, los CNTs con paredes ideales son prácticamente inertes, y es necesario que se cumplan dos condiciones para que aumente su reactividad: 1) la piramidalización del orbital π del átomo de carbono al que se unirán al grupo funcional de interés; y 2) el desalineamiento de los orbitales π entre un par de átomos de carbono (Figura 1.30).

La “piramidalización” es el proceso por el cual un átomo de carbono de la pared de un CNT sufre un proceso de rehibridación durante su unión a un grupo funcional, pasando de una geometría trigonal sp^2 a una geometría tetraédrica sp^3 (Figura 1.30-A). Este proceso es altamente permisible en fullerenos debido a su curvatura pronunciada, mientras que únicamente los CNTs con extremos cerrados serán los más susceptibles a la piramidalización; sin embargo el uso de especies altamente reactivas como carbenos, nitrenos, arilos y halógenos promueve que la piramidalización puede realizarse en las paredes de CNTs con extremos abiertos [45, 80]. En fullerenos los enlaces π entre átomos de carbono están casi perfectamente alineados por lo que no sufren ninguna distorsión aparente; no obstante, en los CNTs debido al efecto de enrollamiento de la hoja de grafito, los orbitales π de algún par de átomos de carbono pueden “desalinearse” y sufrir una torsión en direcciones opuestas, lo cual aumenta la tensión de aquel enlace y por lo tanto su reactividad química (Figura 1.30-B).

Una de las reacciones más conocidas en la funcionalización covalente, para las superficies ideales es la “fluoración”, la cual da origen a CNTs altamente reactivos, a través de la adición directa del flúor en las paredes del CNT (Figura 1.31-A). El flúor es posteriormente sustituido por grupos alquilo derivados de compuestos alquilo-litio u organometálicos. Las “reacciones de adición radical” (Figura 1.31-B) se inducen tanto electroquímica como termoquímicamente en presencia de compuestos alquilo perfluorados fotoinducidos a partir del yoduro de perfluoroalquilo, los compuestos de arilo obtenidos por reducción de sales de diazonio, y los compuestos producidos por descomposición del peróxido de benzoilo. Otro grupo de reacciones son las “reacciones de cicloadición” (Figura 1.31-C) que permiten la introducción de estructuras cíclicas; ejemplos de éstas son: la cicloadición [2 + 1] del diclorocarbena, nitrenos y bromomalonatos, la cicloadición [4 + 2] de Diels-Alder para *o*-quinodimetano activada por microondas, la ciclo adición [3 + 2] de azidas activada por luz UV, y la cicloadición de azometinilidas. Finalmente, se encuentran las “reacciones electrofílicas-nucleofílicas” (Figura 1.31-D) que utilizan agentes altamente nucleofílicos como el carbeno, sec-butilitio, carbaniones poliméricos, reactivos reductores de Birch (litio/1,2 diaminoetano o litio/amonio) [45, 65].

1.4.2.3. Funcionalización covalente, libre de solventes, para superficies con defectos

Actualmente, la búsqueda de metodologías más amigables y biocompatibles con el medio ambiente y los sistemas biológicos es una tarea de gran interés dentro de la “química verde” o “química libre de solventes”. Es por eso que la funcionalización covalente, libre de solventes, para superficies con defectos aprovecha los “defectos de fabricación” que se forman durante la síntesis de los CNTs para la introducción de los grupos funcionales. Tal y como se ha descrito anteriormente, los CNTs que poseen una pared ideal sin defectos son prácticamente inertes, por lo que su reactividad dependerá de su diámetro, de su grado de piramidalización y del desalineamiento de sus orbitales π [45, 65]. Sin embargo, cuando un CNT posee una gran cantidad de defectos de fabricación, los sitios donde éstos se localizan producen una deformación local convexa que aumenta la tensión y por lo tanto la reactividad química del CNT [30, 45, 48, 65], es por eso que estos sitios son un blanco ideal para la introducción de grupos funcionales variados.

Por lo tanto, cuando se aprovechan los defectos de las paredes, es posible introducir compuestos orgánicos volátiles como aminas y tioles sin necesidad de utilizar solventes ni agentes oxidantes. Durante la reacción (Figura 1.32) se eleva a temperatura al vacío para obtener un compuesto en “fase gaseosa” capaz de cubrir por completo la superficie de los CNTs, uniéndose covalentemente a los defectos de la superficie por medio de un ataque nucleofílico [30, 43, 46, 70, 72, 81-84]. A través de una serie de cálculos y predicciones Basiuk y colaboradores han determinado que las reacciones de adición pueden llevarse a cabo de manera sitio-específica tanto en las paredes como en los extremos cerrados que poseen defectos pentagonales o unidades de piracileno [43, 70, 81].

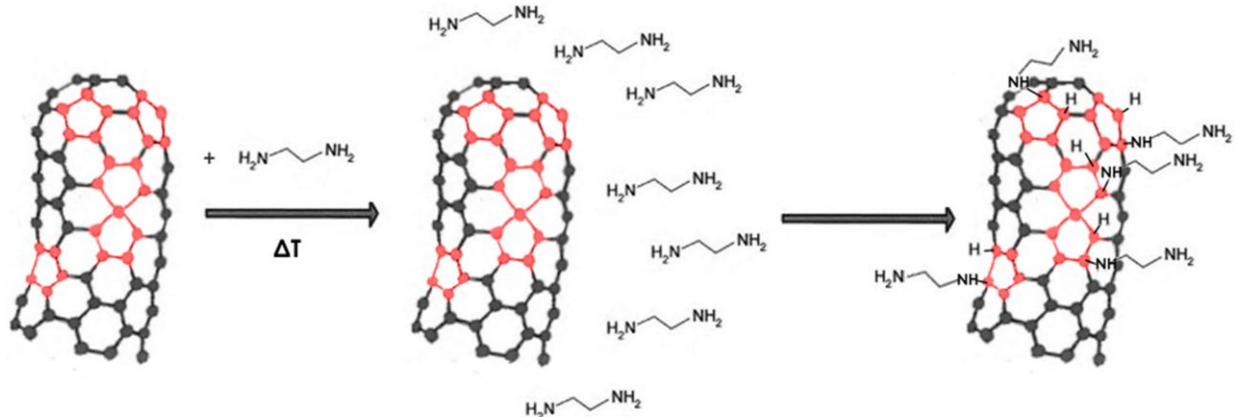


Figura 1.32. Funcionalización covalente, libre de solventes, con aminas en fase de gas. La amina en fase gaseosa recubre la superficie de los CNTs y se une a los defectos pentagonales covalentemente a través de un ataque nucleofílico.

Una de las primeras funcionalizaciones realizadas utilizando este método fue la reacción de adición de la amina de cadena alifática 1,8-diaminooctano (DO) a la superficie de los MWCNTs (Figura 1.32). Posteriormente, se realizó la derivatización a partir de DO unido al CNT con ϵ -caprolactam para la síntesis *in situ* de nylon-6 [72, 85]. En comparación con los CNTs prístinos, los CNTs funcionalizados con nylon-6 por este método, mostraron un mayor nivel de biocompatibilidad, la cual fue determinada a partir de ensayos toxicológicos tales como la prueba de micronúcleos en linfocitos humanos y la prueba del sistema del complemento [7, 86].

1.4.3. Funcionalización de CNTs con ácidos nucleicos

La funcionalización de CNTs con ácidos nucleicos ha sido ampliamente utilizada para incrementar su solubilidad en solución, determinar su carácter conductivo [87-94]. Existen estudios que reportan exitosamente la amplificación de secuencias de DNA por reacción cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), transcripciones (síntesis de RNAs mensajeros) y traducciones (síntesis de proteína) *in vitro* [95, 96] sobre la superficie de un CNTs. Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido dedicados a la funcionalización de CNTs con ácidos nucleicos para el desarrollo de biosensores [97-100] y transportadores para la entrega de material genético en células y tejidos [95, 101-115]. Con base en dichos estudios, podemos dividir la funcionalización con ácidos nucleicos en dos tipos: a) la funcionalización no covalente de CNTs con ácidos nucleicos y b) la interacción electrostática de ácidos nucleicos con CNTs funcionalizados con aminas.

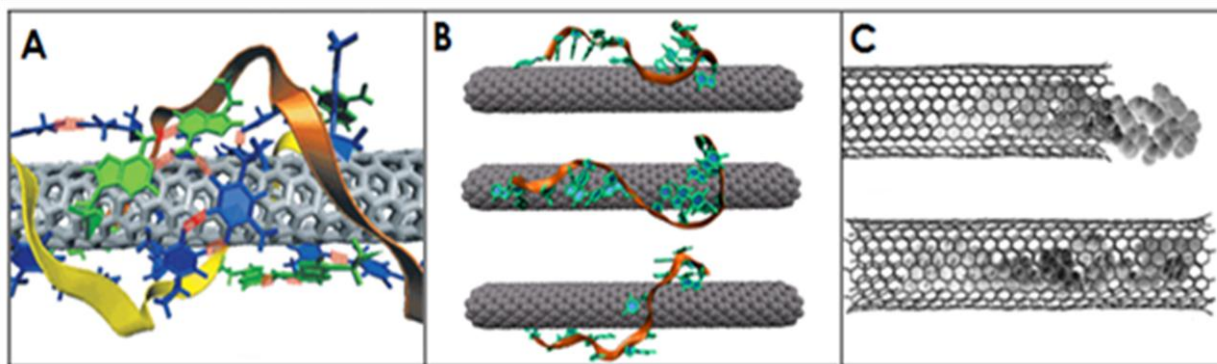


Figura 1.33. Interacción exoedral no covalente: A) interacción hidrofóbica entre un dsDNA enrollado alrededor de un SWCNT o “modelo de la envoltura”; B) interacción por apilamiento π - π entre un SWCNT y un ssDNA. Interacción endoedral no covalente entre un SWCNT y un dsDNA. Modificado de Gao, 2004 [92]; Johnson [121], 2008; y Tu, 2009 [94].

1.4.3.1. Funcionalización no covalente de CNTs con ácidos nucleicos

Cuando se coloca en solución DNA de doble cadena (dsDNA) en presencia de CNTs, se enrolla sobre la superficie de éstos a través de interacciones hidrofóbicas de tipo Van der Waals, debido a que el interior de la doble hélice del dsDNA es altamente hidrofóbico (Figura 1.33-A) [93, 116, 117], durante este proceso la molécula de dsDNA sufre una transición de su estructura B (común e hidratada) a una estructura tipo A (menos hidratada y más ancha) conocida como “desestabilización B-A”. Otra interacción que se da entre DNA y CNTs es de tipo endoedral, en la cual el DNA se encapsula al interior de los CNTs cuando éstos tienen extremos cerrados (Figura 1.33-D) tal y como sucede con los “peapods” [118] [119, 120].

La interacción entre CNTs y DNA de cadena sencilla (ssDNA) se lleva a cabo a través de los anillos aromáticos de las bases nitrogenadas y el CNT vía apilamiento π - π (Figura 1.33-B), dejando al esqueleto fosfatado expuesto hacia la superficie acuosa, lo cual aumenta la solubilidad de los CNTs [90-92, 121, 122]. Esta interacción en particular ha

servido para para el desarrollo de métodos de secuenciación masiva de última generación. Un estudio realizado por Meng, demostró que si se coloca una secuencia de ssDNA conocida en presencia de SWCNTs y a éstos se les aplica un voltaje para hacerlos girar, es posible conocer la secuencia del ssDNA con una exactitud del 100% escaneándolo con una punta para microscopio de tunelaje (STM, por sus siglas en inglés) para determinar la densidad electrónica de los relieves pertenecientes a cada una de las bases nitrogenadas, simulando al cilindro de una cajita musical (Figura 1.34) [123].

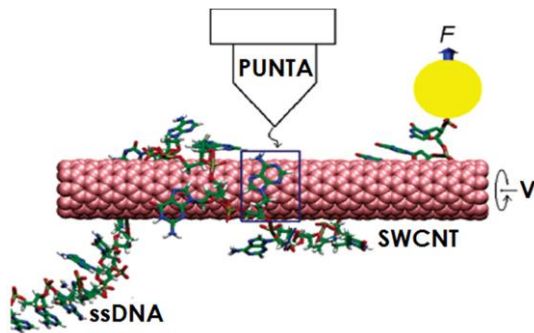


Figura 1.34. Método descrito por para secuenciación masiva basadas en la interacción de un SWCNT y una molécula ssDNA. Modificado de Meng, 2007[123].

1.4.3.2. Interacción electrostática de ácidos nucleicos con CNTs funcionalizados con aminas

Este tipo de funcionalización para CNTs aprovecha la carga negativa de los ácidos nucleicos (Figura 1.35), atrayéndolos electrostáticamente a través de CNTs funcionalizados con aminas u otros grupos funcionales cargados positivamente. Uno de los primeros estudios que demostró experimentalmente la interacción electrostática entre las moléculas de DNA y los grupos amino unidos covalentemente a la superficie de un CNT fue realizado por Pantarotto y colaboradores [115]. En este estudio

se funcionalizaron SWCNTs y MWCNTs covalentemente por el método de cicloadición con oligoetilenglicol (OEG) unido a un anillo de pirrolidina y aun grupo amino terminal (Figura 35). A partir de este estudio, diferentes grupos de investigación comenzaron a sintetizar CNTs unidos a diferentes tipos de aminas para retener electrostáticamente moléculas de DNA sobre la superficie de SWCNTs y MWCNTs [101, 102, 104-110, 124].

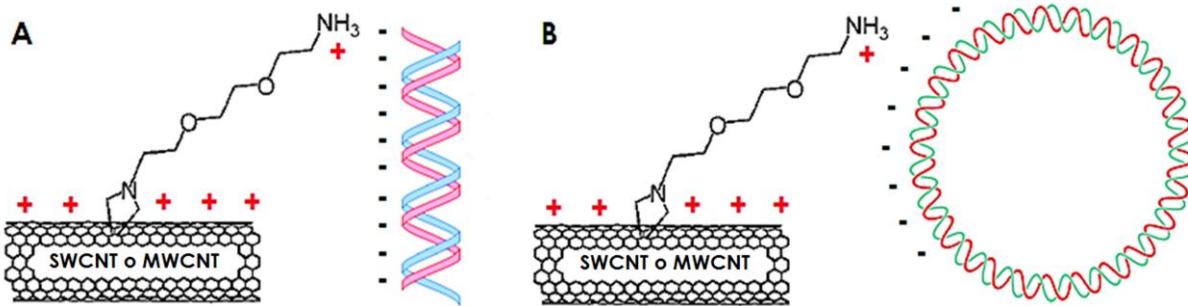


Figura 1.35. Interacción electrostática entre un grupo amino cargado positivamente unido a un CNT y una molécula de DNA lineal (A) o plasmídica (B) con carga negativa. Modificado de Pantarotto, 2004 [115].

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

Biotecnología, transfección y transformación genética

2.1. Biotecnología

De acuerdo con la definición propuesta por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD), la biotecnología es una actividad multidisciplinaria que hace uso de las técnicas de biología molecular, ingeniería genética y cultivo de tejidos, para la selección y modificación de plantas, animales, y microorganismos (ya sean células vivas o sus componentes) con la finalidad de potenciar o conferir alguna característica que permita la obtención de productos o derivados de éstos con mayor calidad, mejorando así la calidad de vida humana [125].

En general, los organismos genéticamente modificados (OMGs) o transgénicos son organismos diseñados a partir de la incorporación de uno o múltiples genes homólogos o heterólogos, a través de técnicas de ingeniería genética y biología molecular. Uno de los ejemplos más conocidos en mamíferos son los ratones que expresan una proteína verde fluorescente o GFP; por sus siglas en inglés (Figura 2.1-A) [126].

2.1.1 Biotecnología Agrícola

Una rama de la biotecnología enfocada en el área de la agricultura es la biotecnología agrícola, la cual ha sido practicada desde la antigüedad, a través de la cruce y selección de distintas variedades de plantas de importancia alimenticia [127]. Actualmente se recurre al uso de las técnicas de biotecnología para la obtención de plantas con nuevas características modificando sus genes o insertando otros provenientes de otras especies. Así, el híbrido resultante se denomina como “*planta genéticamente modificada*” o “*planta transgénica*”.

2.1.1.1. Plantas genéticamente modificadas

En plantas, es posible crear individuos transgénicos insertándoles genes que les confieren resistencia o tolerancia a estrés biótico y abiótico (insectos, enfermedades, desecación, salinidad, y temperatura), resistencia a herbicidas, a

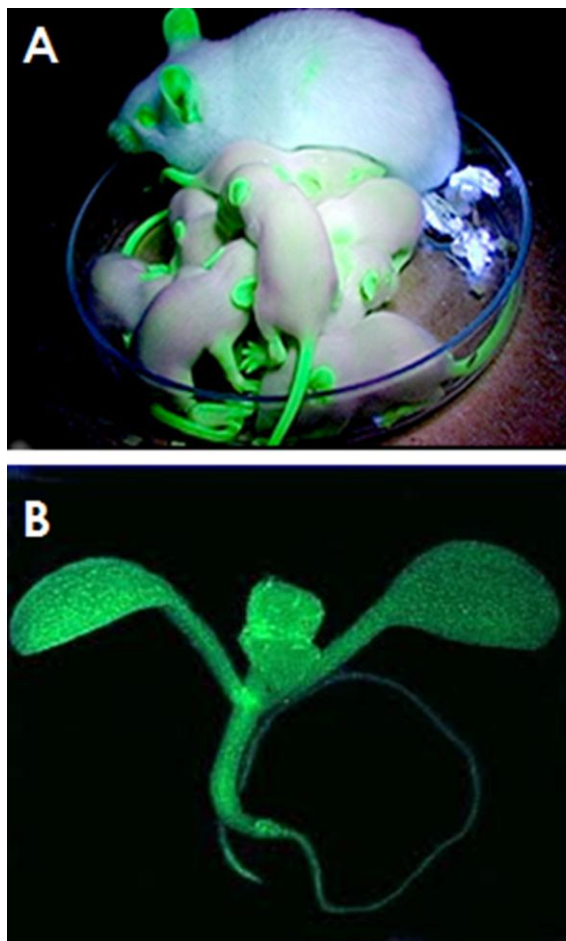
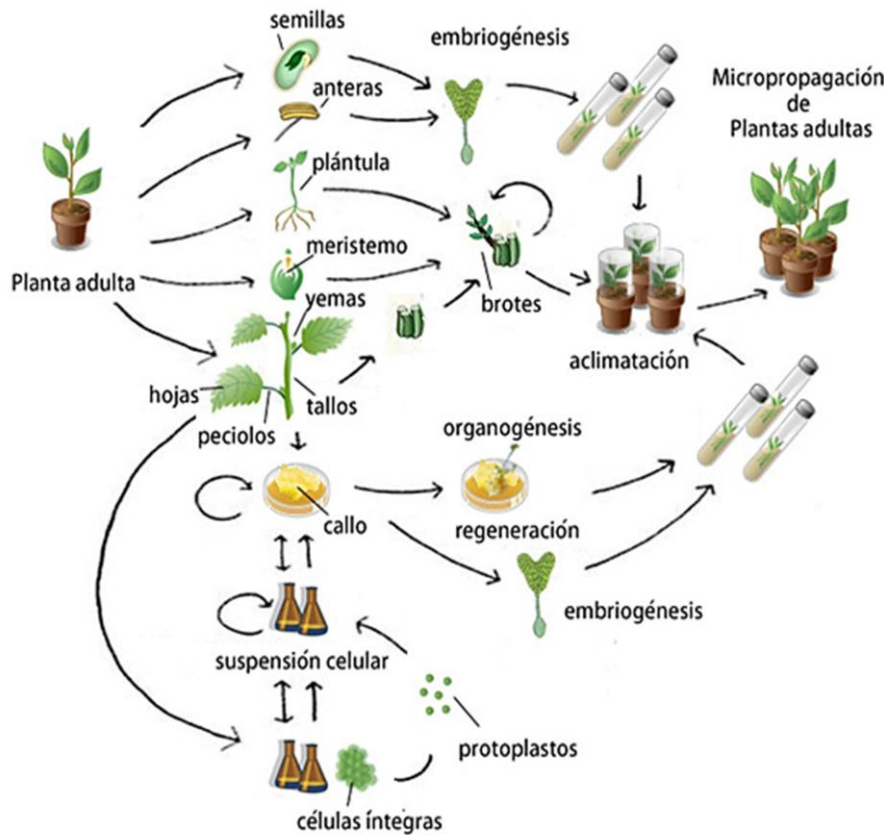


Figura 2.1. A) Ratones transgénicos que expresan una proteína verde fluorescente (GFP). B) Plántula transgénica de *Arabidopsis thaliana* que expresa a la proteína GFP. Tomada de http://www.wired.com/news/images/full/sentinel2_f.jpg; y http://leonardo4c.files.wordpress.com/2009/05/1237842965013_f1.jpg?w=400&h=300

tales genes exógenos se les denomina con el término de “transgenes” [128]. Los primeros reportes que existen de plantas transgénicas surgieron en los años 80; a partir de entonces la introducción de genes exógenos en plantas se ha empleado para el desarrollo de la agricultura a nivel mundial.

En la actualidad, extensas áreas son utilizadas en todo el mundo para la siembra de plantas transgénicas destinadas a la industria alimenticia, textil y farmacéutica [128, 129]. Tan sólo en el año 2006, alrededor de 100 millones de hectáreas en 22 países fueron cultivadas con especies genéticamente modificadas, y año con año estas cifras han ido aumentando [128]. Sin embargo, la generación de plantas transgénicas inevitablemente ha causado una gran incertidumbre entre la población principalmente por grupos activistas a nivel mundial debido a las posibles consecuencias de su consumo y liberación al medio ambiente, así como por los efectos nocivos que puedan causar a las especies endémicas [130, 131].

Muchos de los cultivos transgénicos pertenecen a especies de plantas como el algodón y la soya, los cuales son capaces de resistir a plagas y herbicidas. Otras especies han sido modificadas para desarrollar flores con nuevos colores, vidas más prolongadas, para la optimización de producción de semillas o el contenido de nutrientes [129]. Además, transgénicos obtenidos a partir de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (Figura 2.1-B), *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Zea Mays* (maíz), han servido para el estudio de la expresión y regulación de genes involucrados en procesos fisiológicos y metabólicos en plantas [128].



2.1.2. El cultivo de células y tejidos vegetales como herramienta biotecnológica

Las plantas transgénicas son producidas a través de complejas metodologías y poco eficientes [132], las cuales pueden depender en un principio de las técnicas biotecnológicas del cultivo de tejidos vegetales (CTV), con la finalidad de obtener a partir de éstos plantas completas modificadas genéticamente (Figura 2.2) [129].

El CTV se define como el conjunto de técnicas usadas

para el crecimiento y proliferación de células, tejidos y órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas en medios de cultivo nutritivos [131, 133, 134]. Las técnicas de CTV están basadas en el concepto de “desdiferenciación celular”, el cual se refiere a la capacidad que posee cualquier célula vegetal sin importar el tejido del que

proviene o el grado de especialización que posean para recobrar su actividad meristemática con ayuda de tratamientos hormonales [131, 135]. Las células meristemáticas son células morfológicamente indiferenciadas que se dividen numerosa y ordenadamente, las cuales son capaces de especializarse para regenerar tejidos o plantas completas [136]. Existen algunas células vegetales que no tienen esta capacidad, y por lo tanto se les denomina “células recalcitrantes” [137].

2.1.2.1. Desdiferenciación celular

Para la obtención de células y tejidos “desdiferenciados” es necesario un fragmento de tejido u órgano vegetal desinfectado o estéril conocido como “explantado” obtenido a partir de tejidos jóvenes como hojas, peciolo, tallos, yemas, plántulas y embriones (Figura 2.2). Estos tejidos son colocados en un medio de cultivo sólido rico en nutrientes y fitohormonas bajo condiciones de luz, temperatura y humedad controladas. El efecto hormonal de las fitohormonas (Figura 2.38) induce el proceso de “desdiferenciación”, formándose una masa celular amorfa conocida como “callo” [131, 138]. Los callos pueden subcultivarse periódicamente para mantenerlos, hasta que se cambien las condiciones del medio y las fitohormonas para promover su “diferenciación” debido a su “pluripotencialidad” para dar origen a ciertos tipos celulares, órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o plantas completas masivamente por un proceso conocido como “micropropagación”. El callo también puede ser colocado en un medio de cultivo líquido, y disgregarlo hasta obtener células individuales (y pequeños agregados) en suspensión para lograr la dispersión de células individuales en suspensión celular [131].

2.1.2.2. Fitohormonas

Las fitohormonas son sustancias producidas por las plantas que responden a estímulos ambientales como luz, temperatura y humedad, regulando el desarrollo de la planta. Por ejemplo, Las auxinas y las giberelinas promueven el alargamiento y crecimiento celular, e inhiben la diferenciación y especialización celular (Figura 2.3). Las citocininas estimulan la división y proliferación celular, e inhiben el envejecimiento celular; mientras que el etileno lo estimula. Por otro lado, el ácido abscísico actúa como un sistema de defensa natural que inhibe la acción de las auxinas, giberelinas y citocininas [131, 139]. Las fitohormonas más utilizadas en CTV son las auxinas, tales como el ácido indolacético (AIA), y la auxina sintética 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Figura 2.3), las cuales inducen y mantienen al callo en un estado “desdiferenciado”; también se emplean aquellas fitohormonas que promueven la proliferación y diferenciación celular, tales como la 2-indolaminopurina (2iP), la bencilaminopurina (BAP) y la kinetina (Kin) [131, 133, 139, 140].

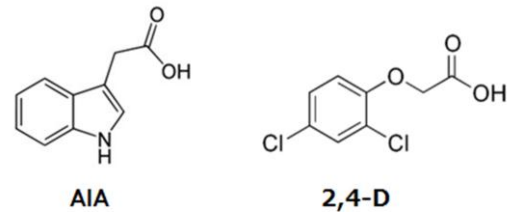


Figura 2.3. Estructura química del ácido indolacético (AIA), y de la auxina sintética 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), éstas inducen y mantienen al callo en un estado “desdiferenciado”.

2.2. Bases y fundamentos biotecnológicos de la transformación genética en plantas

Un hecho sorprendente que revolucionó la biotecnología en los años 70 fue la posibilidad de introducir y transportar material genético a través de la membrana de células de mamífero, tal es el caso de los transgenes, los cuales son clonados en un vector de naturaleza lineal o circular como los plásmidos [128]. La novedosa técnica llamada “transfección” ha permitido el desarrollo de muchas áreas de la biología tales como la genética, la biología del desarrollo, la medicina genómica y la terapia génica [141].

2.2.1. Transfección en mamíferos

La “transfección” (Figura 2.4) es el proceso de transferencia de un transgene hacia el interior de una célula, por medio de un agente físico o químico conocido como “transportador”, el cual debe ser capaz de atravesar la membrana celular [124, 129, 141-143]. La transfección es un método que neutraliza o evade el problema de introducir moléculas cargadas negativamente como los grupos fosfato de los ácidos nucleicos a través de una membrana celular cargada negativamente [142].

Los principales métodos para la transfección (Figura 2.4) en células animales pueden dividirse en tres grupos: a) los métodos químicos, b) los métodos físicos y c) los virales [141].

Los métodos químicos (a) emplean sustancias químicas como el fosfato de calcio, polímeros catiónicos (policationes) como DEAE-dextrano, polietilenglicol (PEG) [144, 145], polietiliminina (PEI) [146, 147], péptidos [124] y lípidos catiónicos [148-152] tales como la lipofectamina, formando complejos que protegen y transportan el material genético a través de la membrana celular. En particular, los lípidos catiónicos tienen un componente “fusogénico” que permite su fusión con la bicapa lipídica de la membrana celular, lo cual es conocido también como “lipofección” [141, 142]. Los métodos físicos (b) como, la electroporación [153], la microinyección [154, 155] y las técnicas de biobalística o bombardeo utilizan transportadores físicos como nanopartículas de tungsteno y oro [147], nanopuntas o nanojeringas, etc., que perforan o atraviesan la membrana celular para la introducción directa del material genético [141, 142, 156]. Por su parte, los vectores virales (c) son los retrovirus porque alcanzan una alta eficiencia de transfección o transducción viral [157]. Uno de los retrovirus más utilizados es el virus de la leucemia murina (MuLV), del cual se pueden obtener virus recombinantes con el transgene de interés, el cual puede integrar en el genoma de la célula una copia de DNA al azar utilizando sus repeticiones terminales largas (LTRs) [158, 159].

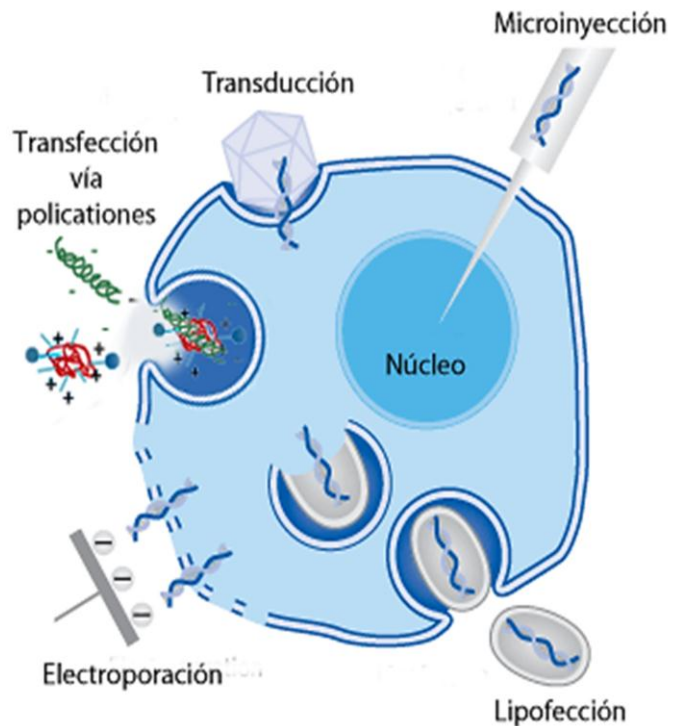


Figura 2.4. Principales métodos de transfección en células de mamífero. Modificado de http://www.biontexas.com/con_4_6_4/cms/u_pload/bilder/Transfektion1_en.png

2.2.2. Transformación genética en plantas

Desafortunadamente la transfección no puede llevarse a cabo en algunas de las células que poseen pared celular tales como las de hongos y de plantas. En plantas, la pared celular presenta un alto contenido de polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa, pectina (pared primaria), lignina (pared secundaria) y glicoproteínas (Figura 2.5), lo que la convierte en una barrera rígida casi impenetrable que obstaculiza la introducción de ácidos nucleicos al interior celular [160-162]. Por tales motivos se han desarrollado diversas técnicas conocidas como “transformación genética”, las cuales requieren de la remoción o perforación de la pared para la introducción de un transgene al interior celular [129, 143, 163].

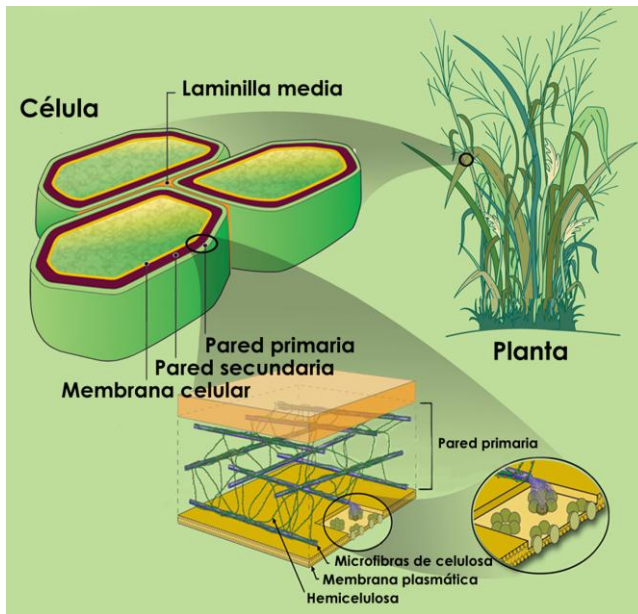


Figura 2.5. Pared celular en plantas. Se muestran en el esquema los principales componentes de la pared celular: pared primaria, pared secundaria y la laminilla media. Modificado de http://genomicscience.energy.gov/biofuels/cellwall_placemat.pdf.

Cuando la inserción de un transgene se realiza exitosamente, es posible observar un elevado nivel de expresión de su RNA mensajero durante varios días o meses, con lo cual se puede concluir que el material genético se ha integrado permanentemente al cromosoma de la célula, a esto se le conoce como “expresión estable”. Por el contrario, cuando el material genético no se integra permanentemente al cromosoma de la célula, y la expresión del transgene únicamente se observa durante un intervalo de 24 - 72 horas se le denomina “expresión transitoria” [141]. Algunos vectores de clonación se pierden durante la división celular, por lo que no logran ser retenidos ni replicados en el núcleo. Algunos plásmidos son capaces de replicarse y retenerse extracromosómicamente en el núcleo por largos periodos de tiempo sin la necesidad de integrarse al genoma de la célula [141, 164].

2.2.2.1. Selección e identificación de células y plantas transgénicas

Una vez que las células han sido transformadas, es crucial identificarlas y seleccionar aquellas que portan el transgene a partir de una población celular por medio de las técnicas de CTV. [165]. Actualmente, la mayoría de los vectores de clonación contienen uno o dos genes que confieren resistencia a agentes como los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas de cloroplastos y mitocondrias, o los herbicidas que inhiben la biosíntesis de aminoácidos en

las células. Para asegurar la propagación del transgene, aquellas células que lo portan serán resistentes a dichos agentes y sobrevivirán, mientras que las células que no lo portan morirán. Algunos de los genes de resistencia en plantas más utilizados son el gene BAR que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (BASTA®) y el gene KmR que confiere resistencia al antibiotico kanamicina [166].

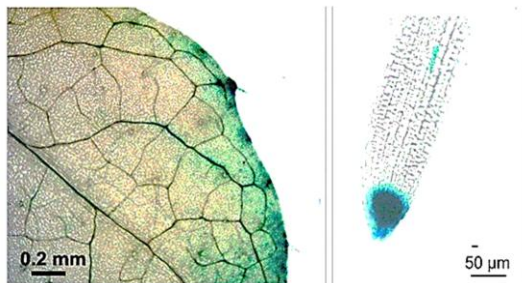


Figura 2.6. Hojas y raíces de *Arabidopsis thaliana* que expresan al gene GUS. Tomado de <http://mplant.oxfordjournals.org/content/3/3/610/F3.large.jpg>.

Alternativamente, los marcadores visuales o “genes reporteros” son utilizados para la identificación de células transformadas y para la identificación subcelular de proteínas específicas [167]. Inicialmente, el gene de la β -glucuronidasa (GUS) fue uno de los primeros genes reporteros utilizados para la identificación de células transgénicas (Figura 2.6) [168]. La β -glucuronidasa corta

glucorónidos tales como X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico) y MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucurónico). El rompimiento de la X-Gluc libera un compuesto que en contacto con el aire, se tiñe de azul, mientras que el rompimiento del MUG libera un compuesto fluorescente [165]. Otro grupo de genes reporteros son los genes responsables de la “bioluminiscencia” [169]. Por ejemplo, el gene Luc de la luciérnaga, codifica para una enzima conocida como luciferasa que oxida a un compuesto llamado luciferina hasta una molécula en estado excitado de alta energía (oxiluciferina) capaz de emitir fotones [170].

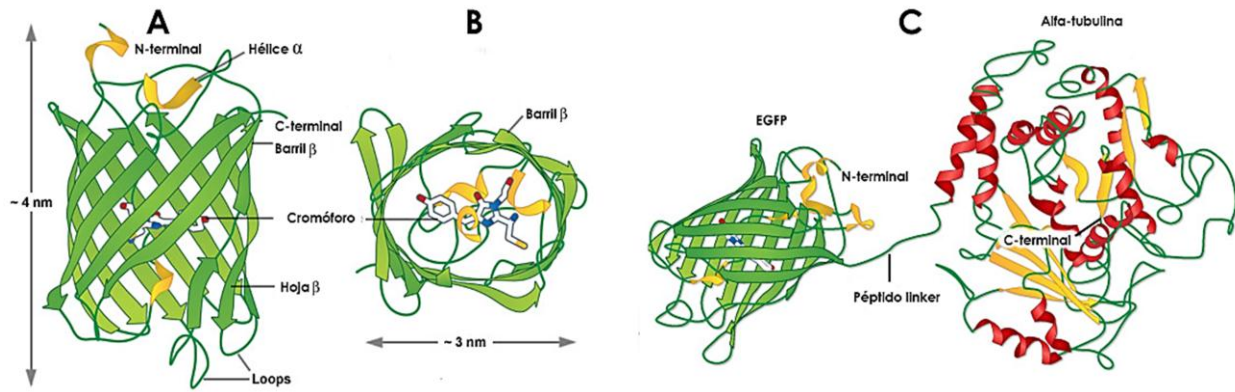


Figura 2.7. Estructura de la proteína verde fluorescente GFP: A) vista superior; B) vista frontal; C) proteína fusionada a GFP a través de un péptido linker. Modificado de <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/image/hi gh lighter-fpsfigure1.jpg> y <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/images/fpintrofigure4.jpg>:

En la actualidad, en plantas se prefiere el uso de genes reporteros que codifican para proteínas que emiten fluorescencia. Por ejemplo, el gene que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) producida por la medusa *Aequorea victoria* (Figura 2.7) [171-175], o el gene RFP de la proteína roja fluorescente (RFP o dsRed) obtenida de la anémona *Discomona coral* [176-180]. Una de las ventajas que tienen las proteínas fluorescentes es la posibilidad de

fusionarlas a otras proteínas (Figura 2.7-C), y observar su ubicación exacta dentro de la célula a través de microscopia de fluorescencia o microscopia confocal [165, 181, 182].

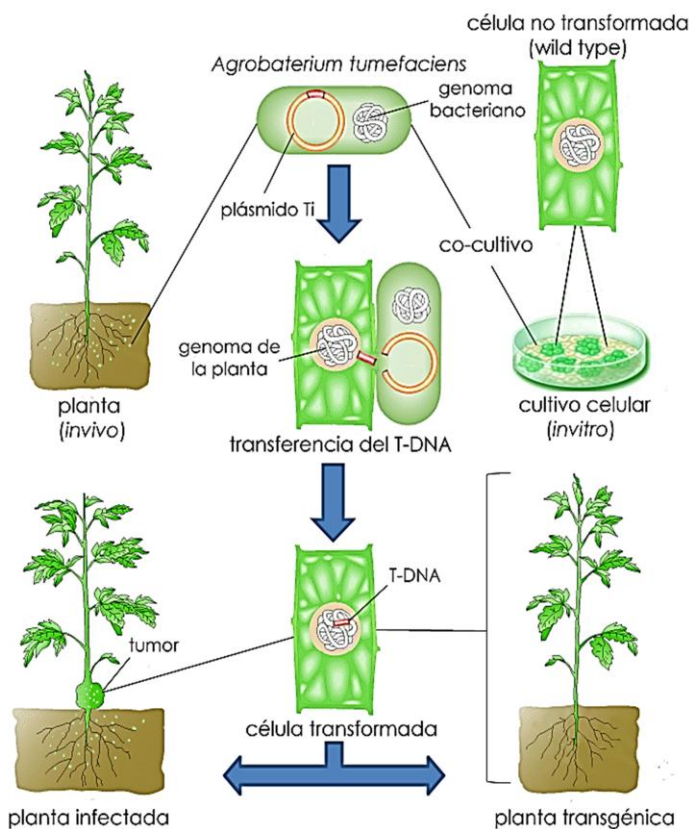


Figura 2.8. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* *in vivo* e *in vitro*. Modificado de http://bib2011geneik.wikispaces.com/file/view/Agrobacterium_tumefaciens.gif/212375160/Agrobacterium_tumefaciens.gif.

2.2.3. Métodos de transformación genética en plantas

La necesidad de entregar el material genético de manera directa en células intactas con pared celular, y regenerar a partir de ellas tejidos o plantas completas, ha estimulado el desarrollo de diversas técnicas especializadas para la transformación genética en plantas. Estas metodologías se encuentran muy restringidas tanto por el número de especies permisibles para la transformación como por la presencia de la pared celular, por tales motivos dependiendo de la técnica la transformación se realiza en diferentes tejidos tales como callos, suspensión celulares, tejidos aéreos, raíces, etc. [143]. Los principales métodos utilizados para la transformación genética en plantas se describen a continuación.

2.2.3.1. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es una eubacteria gram-negativa que pertenece a la familia Rhizobiaceae, es responsable de la formación de tumores en plantas dicotiledóneas y en algunas monocotiledóneas, provocándoles una enfermedad conocida como “agalla de tallos y raíces” [183]. Para que se dé la inducción del tumor durante la infección (Figura 2.8) es necesario que *Agrobacterium* transfiera e integre en el genoma de la planta un fragmento de DNA conocido como “T-DNA” a través de un vector plasmídico conocido como “plásmido Ti” [184]. El T-DNA contiene genes que codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis de auxinas y citosinas que promueven la formación de los tumores característicos de la enfermedad [183-186].

Basándose en la capacidad natural de *Agrobacterium tumefaciens* para transformar plantas, se han desarrollado vectores derivados del plásmido Ti que no producen virulencia, y que contiene un T-DNA artificial al cual se le puede insertar el transgene de interés [165, 184, 187]. La inserción del T-DNA en el genoma de la planta actúa en *trans*; es por eso que a este sistema de inserción se denomina como “sistema binario”, y por lo tanto al plásmido portador como “vector binario” [184]. El vector binario es un plásmido “suicida” incapaz de replicarse por sí mismo, el cual sólo sobrevivirá si se recombina con el genoma de la planta [129, 188, 189]. La transformación con *Agrobacterium* puede realizarse en diferentes tipos de tejidos vegetales tales como protoplastos (células desprovistas de pared celular), células en suspensión, callos, hojas, peciolo, raíces y segmentos de hipocótilos [190-192].

2.2.3.2. Agroinfiltración o floral dip

Es posible realizar la transformación genética *in vivo* en plantas completas a través de un método conocido como “agroinfiltración floral” o “floral dip” (Figura 2.9) ampliamente utilizado en *Arabidopsis thaliana*, que no requiere de tejidos parciales o líneas celulares. Este método permite obtener directamente de plantas adultas semillas transgénicas en periodos de tiempo relativamente cortos [132, 165, 193] sumergiendo las inflorescencias y silicuas (Figura 2.9-a) en una suspensión celular de *Agrobacterium* para que ésta las infecte (Figura 2.9-b). Posteriormente las plantas se incuban durante 1 mes para obtener semillas (Figura 2.9-c) y colectarlas para su selección (Figura 2.9-d) [194]. Los tejidos blancos preferidos por *Agrobacterium* son los gametofitos femeninos jóvenes o maduros y los tejidos embrionarios localizados en inflorescencias y silicuas [132, 194, 195].

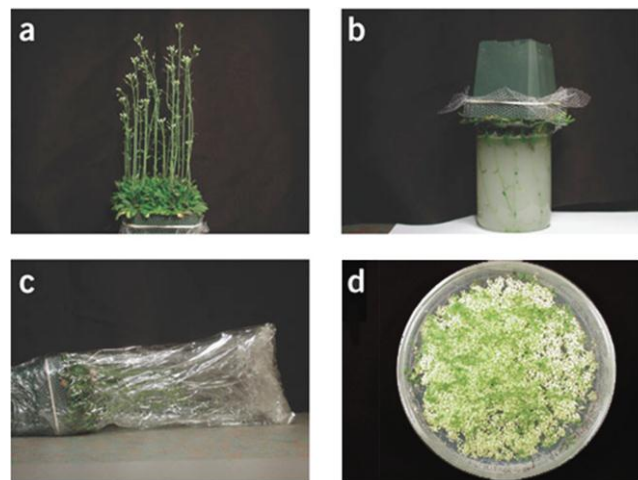


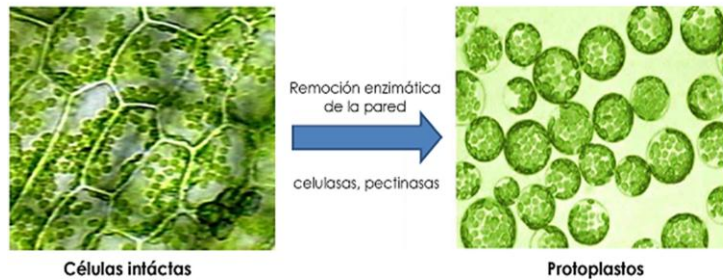
Figura 2.9. Floral dip. a) Plantas adultas con 20-30 inflorescencias y algunas silicuas; b) partes aéreas son sumergidas en una suspensión celular de *Agrobacterium*; c) plantas incubadas y cubiertas con un plástico durante 16–24 h; d) después de incubarlas en una cámara durante 1 mes se obtienen suficientes inflorescencias y silicuas para la obtención de semillas transformantes y su posterior selección. Modificado de Zhang, 2006.

En monocotiledóneas como los cereales (maíz, cebada, trigo, etc.), la producción de ácidos hidroxámicos y sus derivados (DIMBOA, DIBOA, MBOA, etc.) ejercen una fuerte influencia sobre la transformación mediada por *Agrobacterium*, inhibiendo su crecimiento y reduciendo la eficiencia de la transformación. Para la transformación genética en cereales, se han utilizado cepas de *Agrobacterium* resistentes a DIMBOA; sin embargo existen otros metabolitos producidos por éstos a los que *Agrobacterium* es completamente vulnerable, por lo que el número de especies que esta bacteria puede infectar sigue siendo una limitante importante [196].

2.2.3.3. Transformación de protoplastos

Tal y como se ha descrito, la pared celular es uno de los mayores obstáculos para transportar ácidos nucleicos al interior celular. Existen algunos métodos que utilizan tratamientos enzimáticos para degradar y remover la pared utilizando celulasas y pectinasas, permitiendo la obtención de células individuales conocidas como “protoplastos” (Figura 2.10) [165, 197-199]. Los protoplastos requieren de delicados tratamientos debido a su fragilidad, y bajo ciertas condiciones de cultivo pueden ser utilizados para regenerar hasta plantas adultas fértiles, siempre y cuando éstos se obtengan a partir de células del mesófilo de hojas y no a partir de células de callo en suspensión o de células recalcitrantes [200].

Algunos métodos que se utilizan para transfectar células de mamíferos son también utilizados para protoplastos de plantas debido a la ausencia de la pared celular, mientras que otros han sido desarrollados específicamente para éstos [201-203].



- Agentes químicos.** El uso de poliacetatos (poli-lisina, poli-L-ornitina, DEAE-dextrano, PEI y PEG) [204], cationes divalentes (Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++}), y CaCl_2 [203, 205] protegen al material genético de la degradación enzimática, y lo transportan al interior de la célula cuando se ha removido la pared [203].
- Electroporación.** Haciendo uso de cargas eléctricas de alto voltaje por periodos de tiempo cortos se hace permeable a la membrana celular transitoriamente y el DNA pueda ingresar. Una vez dentro si la célula está en pleno ciclo celular, aumenta la probabilidad de que éste ingrese al núcleo [129, 165, 199] [206].
- Lipofección.** El material genético es encapsulado dentro de liposomas (bicapas lipídicas en forma de esferas huecas) a través de una ligera sonicación [165, 207]. La presencia de agentes químicos como el PEG y Ca^{++} promueve la fusión de los liposomas con la membrana celular y la internalización del DNA [208].
- Esferoplastos de Agrobacterium.** Los esferoplastos se obtienen a partir de la remoción enzimática de las paredes de células de Agrobacterium de manera similar a la obtención de protoplastos de plantas [191]. En presencia de agentes químicos como el PEG y PVA (alcohol polivinílico) los esferoplastos son transportados por endocitosis al interior del protoplasto, y una vez dentro éstos pierden su integridad y liberan al medio intracelular sus componentes, entre los cuales se encuentran los vectores que portan al transgene [190, 191]

Figura 2.10. Obtención de protoplastos. Modificado de <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/images/Protoplasts/Slide1.jpg> y de <http://www.williamsclass.com/SeventhScienceWork/ImagesCells/ElodeCells.jpg>

2.2.3.4. Transformación por plasmólisis

Existen algunos reportes que sostienen que la pared celular de células de plantas no impide del todo el transporte del DNA cuando éstas son previamente “plasmolizadas” [206, 209-211]. Cuando una célula con pared celular es colocada en una solución hipertónica, el agua dentro de la célula tiende a difundir hacia al exterior celular. El resultado de esta “exosmosis” provoca que la membrana celular se desprege de la pared celular, a este proceso se le conoce como “plasmólisis” (Figura 2. 11). En un inicio, debido a la pérdida de agua, las vacuolas comienzan a encogerse, y la membrana celular comienza a despregarse de algunos sitios de la pared, observándose una “plasmólisis incipiente”. Hasta este punto la plasmólisis se considera “cóncava” o reversible únicamente si se cambia la concentración de solutos en el medio. Si la exosmosis continúa, la membrana se desprega por completo de la pared y las

vacuolas se encogen por completo. En este punto la plasmólisis es “evidente”, debido a que el agua ha difundido casi por completo hacia el exterior y la célula pierde su turgencia, por lo que ya no es reversible o “convexa” y se conduce a la muerte celular [212-216].

A pesar de que la electroporación típicamente se lleva a cabo para la transformación de protoplastos, esta puede ser utilizada para transformar en células plasmolizadas en presencia del material genético [161, 209, 210]. Cuando la transformación es exitosa, el material genético parece atravesar por el espacio que queda entre la pared y la membrana celular llamado periplasma (Figura 2.11) hasta llegar al interior celular. Sin embargo, dependiendo del estado en el que se encuentre la plasmólisis se puede conducir a la muerte celular, por lo que la transformación por este método es casi siempre transitoria, y regenerar tejidos o plantas completas es realmente complicado y poco viable [209, 210].

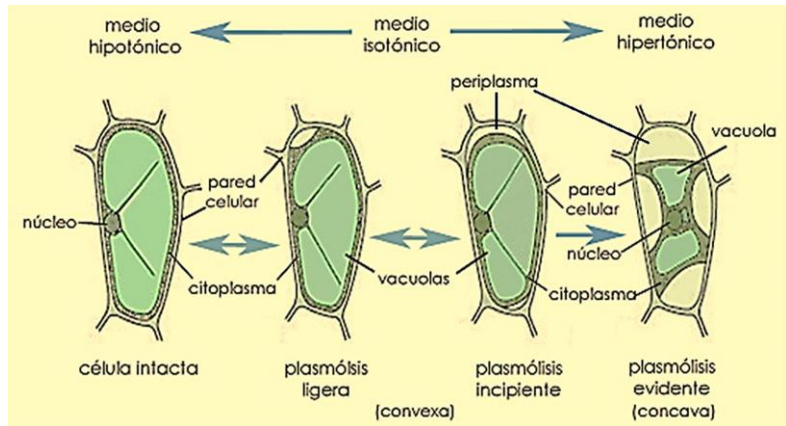


Figura 2.11. Etapas, tipos y morfología de la plasmólisis en plantas. Modificado de <http://www.wissenschaft-online.de/lexika/images/biok/f2f762.jpg>

2.2.3.5. Transformación por bombardeo o biobalística

En el método de transformación por bombardeo utiliza a las nanopartículas metálicas de oro o tungsteno recubiertas con el vector de clonación de interés (Figura 2.12) en presencia de protamina o espermidina y CaCl_2 [217-220]. Las nanopartículas recubiertas son aceleradas a una gran velocidad y disparadas como balas a través de una cámara de presión de helio o nitrógeno, permitiendo que el material genético atraviese la pared celular, y logre llegar directamente al interior del núcleo [217, 219, 220] de células de callos u otros tejidos.

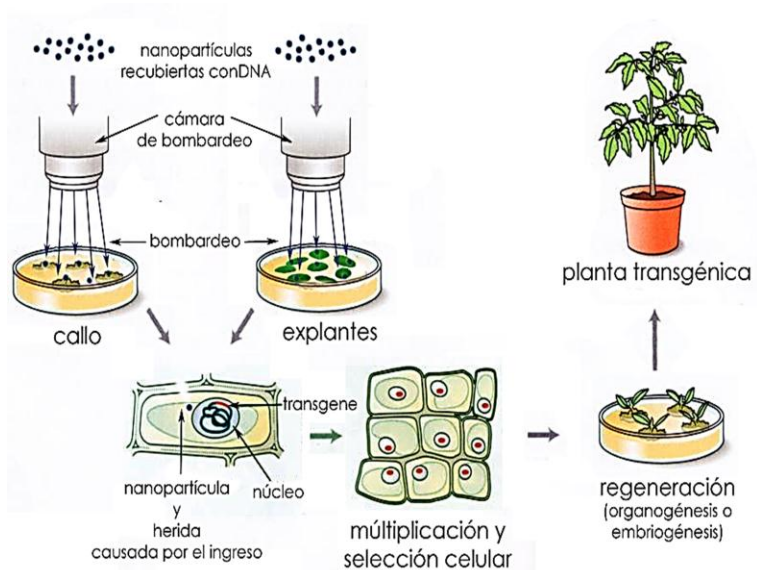


Figura 2.13. Esquema del método de transformación por bombardeo o biobalística, utilizando callos o explantes de plantas. Modificado de https://www.msu.edu/course/isb/202/ebertmay/drivers/mirkov_gentran.jpg.

Aunque este método es muy efectivo, la presión y velocidad que se utilizan para el disparo deben ser muy exactas. Inicialmente el impacto de las nanopartículas deja muy pocas células transgénicas vivas, y las que sobreviven quedan muy dañadas [129, 217, 220]. En la actualidad este método es ampliamente utilizado para la transformación estable y transitoria de diferentes especies como tabaco, papa, taxus, maíz, etc. [218, 221-229].

2.2.3.6. Transformación por microinyección

Básicamente existen dos tipos de transformación genética por microinyección, uno utiliza microfibras de carburo de silicio (SiC), mientras que el otro utiliza microinyectores o micropipetas (Figura 2.13). En el método de microinyección por nanofibras de SiC o también conocido como “nanopinchado”, en el cual se pueden utilizar células intactas, plasmolizadas o protoplastos. Las células se colocan en una solución que contiene tanto al material genético como a las nanofibras de SiC, las cuales asemejan agujas, y causan pequeñas heridas en la pared y en la membrana por donde atraviesa el material genético [165, 230, 231].

El proceso de microinyección con microinyectores manuales o automáticas, se realiza en células individuales y requiere de gran precisión debido a las puntas pueden dañar por completo las células, o simplemente los polisacáridos de la pared pueden interferir con la inyección al tapar las puntas [129]. Si lo anterior se logra exitosamente, la pared y la membrana celular son perforadas, y el material depositado directamente en el citoplasma o en el núcleo [232, 233].



Figura 2.13. Imagen de una célula de planta siendo inyectada con micropunta para su transformación. Tomada de: http://www.viewingspace.com/genetics_culture/pages_genetics_culture/gc_w03/ka_c_webarchive/transgenic_article/dogcell.gif.

2.2.3.7. Transferencia de organelos y cromosomas artificiales

Algunos organelos aislados como cloroplastos [234-236], núcleos [237, 238], o cromosomas [233, 237, 239] son reintroducidos en células intactas por microinyección [233] o bombardeo, y en protoplastos [240] por agentes químicos como el PEG o PVA [240], siendo un método altamente exitoso en *Nicotiana tabacum* [241] y algas unicelulares como *Chlamydomonas* [242]. A diferencia de la transformación directa y azarosa en el genoma de una planta, la integración de los transgenes en el cloroplasto se realiza por recombinación de secuencias homólogas, lo que evita el apagado de otros genes endógenos en la planta (Figura 2.14-A). La expresión de los transgenes es muy estable debido a que se tiene aproximadamente de 50-1000 copias del genoma del cloroplasto por célula [129, 241, 243]. Otra ventaja es que debido a que

los cloroplastos se heredarán vía materna se evita la pérdida del transgene durante la dispersión del polen [129, 243].

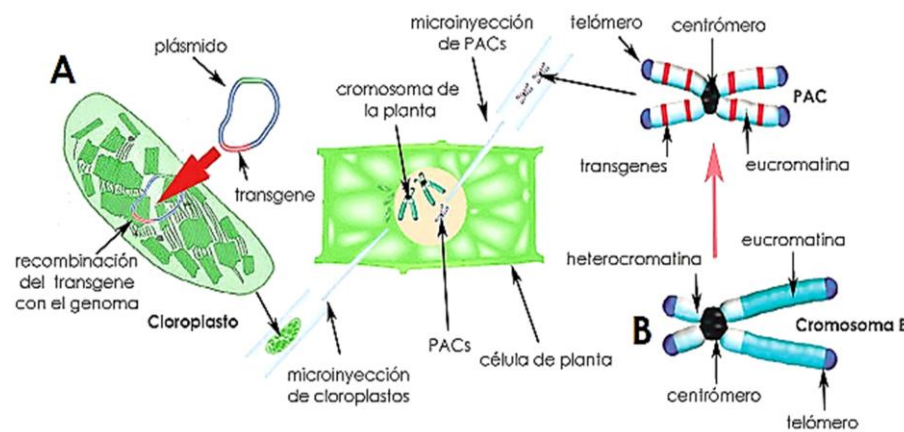


Figura 2.14. Transformación por transferencia de orgánulos. La transferencia de cloroplastos (A) y de PACs generados a partir de cromosomas B (B).

Arabidopsis thaliana (Figura 2.14-B) [244]. Los cromosomas B (Bs) son cromosomas accesorios innecesarios para el desarrollo normal de la planta que coexisten con el resto de los cromosomas de manera natural en plantas como el maíz [245-248]. Los Bs se transmiten de una generación a otra con una frecuencia mucho mayor a la mendeliana,

por un proceso de “no-disyunción” durante la segunda mitosis del polen originando núcleos espermáticos dos copias de un Bs [245]. Los PACs se obtienen a partir de Bs modificando el brazo corto y por ende eliminando la no-disyunción. A diferencia de los vectores convencionales, los PACs al ser unidades independientes evitan la inserción azarosa en el genoma de la planta y pueden contener desde uno hasta todo un juego de transgenes [249]. Una de las ventajas de este método es que a los PACs se les puede adicionar secuencias funcionales y regulatorias tales como secuencias teloméricas y centroméricas, sitios de origen de la replicación, genes de resistencia a antibióticos y herbicidas, genes que autorregulan el número de copias de PACs, regiones de adhesión a la matriz nuclear, elementos delimitadores de la heterocromatización o “insulators”, elementos potenciadores o “enhancers”, silenciadores transcripcionales, regiones promotoras, sitios de recombinación, entre otros [244, 250].

2.2.3.8. Transformación mediada por vectores virales

Tanto en bacterias como en animales, la transducción o utilización de virus para mediar la transferencia de genes directamente en el genoma es ampliamente utilizada porque éstos han desarrollado a lo largo de la evolución estrategias naturales para introducir su material genético al interior celular; sin embargo, los virus en plantas son raramente utilizados para la transformación genética. A principios de los años 80, comenzaron los primeros intentos por utilizar virus de DNA, y más recientemente virus de RNA para la transformación genética en plantas [129]. Lamentablemente, al igual que en animales, el uso de vectores virales para la transformación genética de plantas puede causar severos daños por su patogenicidad. Otro problema asociado al uso de virus es el de la bioseguridad, debido a que algunos virus usados para la transformación genética pueden infectar otras especies de plantas endémicas, modificándolas, y causándoles severos daños [129].

Una estrategia utilizada es el diseño de vectores virales o “virus desarmados” que carecen de los genes que producen patogenicidad en plantas. Los viriones recombinantes obtenidos son utilizados para la transfección de la planta y transformación genética con el transgene de interés. Uno los primeros virus de DNA utilizado fue el virus del mosaico de la coliflor (CaMV, por sus siglas en inglés), una de las ventajas de este virus es que puede replicarse como un retrovirus e insertar el transgene directamente en el genoma; sin embargo, presenta una tasa de mutación muy alta que puede trucar las regiones promotoras y codificantes del transgene, además de presentar una limitada capacidad espacial para almacenar secuencias de DNA grandes [129].

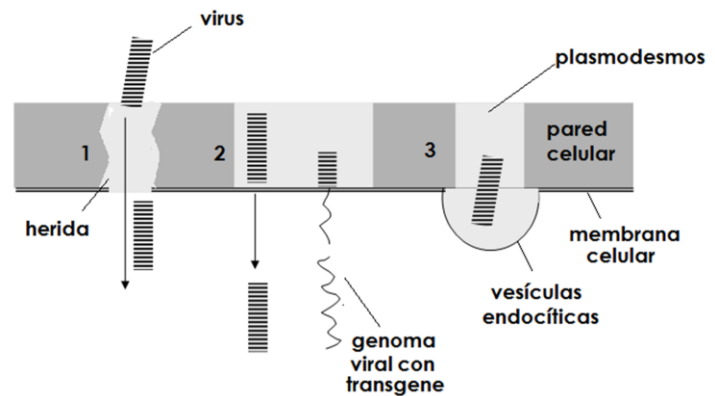


Figura 2.15. Posibles mecanismos naturales de entrada e introducción del material genético del virus del mosaico del tabaco TMV. Entrada directa a través de una herida (infiltración) en la pared y membrana celular (1); interacción directa con la membrana a través de los plasmodesmos ingresando directamente o inyectando únicamente al material genético (2) o por la vía de endocitosis (3). Modificado de <http://users.aber.ac.uk/lum/tmv2002.htm>.

Los virus de RNA tales como virus del mosaico del tabaco (TMV, por sus siglas en inglés) son ampliamente utilizados para la transformación transitoria de *Nicotiana tabaco* y *Nicotiana Benthamiana* (Figura 2.15) [251]. Otros virus utilizados para a transformación de plantas son el virus que infecta a la papa (PVX, pos sus siglas en inglés) por su capacidad para contener transgenes de gran tamaño, y el virus del mosaico del pepino (CMV, por sus siglas en inglés) que a diferencia de otros virus es mucho más fácil de controlar y presenta un número mayor de especies a las que puede transformar [129, 251-254].

CAPÍTULO 3

ANTECEDENTES

Transfección y transformación genética mediada por nanotubos de carbono

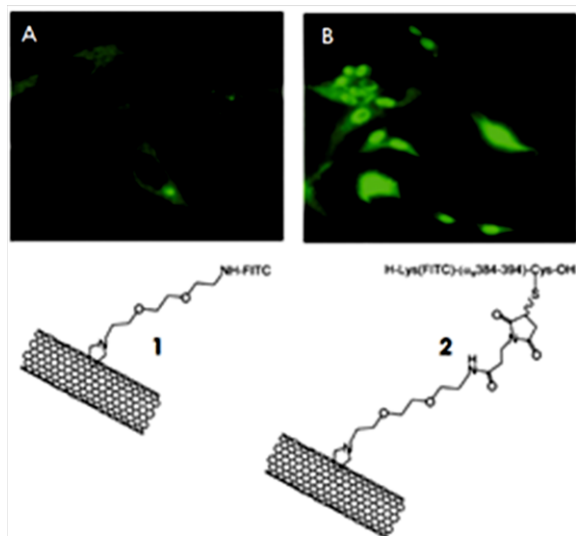


Figura 3.1. Micrografías confocales de queratinocitos humanos (A y B) que exhiben en su interior la fluorescencia de los SWCNTs funcionalizados con aminas marcadas con FITC (1 y 2). Modificado de Pantarotto, 2003 [256].

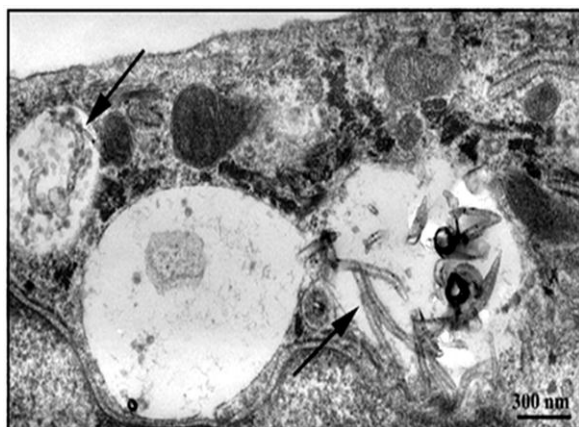


Figura 3.2, Micrografía electrónica de queratinocitos humanos mostrando en su interior MWCNTs (señalados con flechas). Modificado de Monteiro-Riviera 2005 [257].

3.1. Los CNTs son capaces de atravesar la membrana celular en mamíferos

En la actualidad, el uso de CNTs para transportar ácidos nucleicos y otras moléculas ha sido posible gracias a la posibilidad de funcionalizarlos [95, 101, 102, 104-113, 255] y al hecho de que éstos pueden atravesar libremente la membrana celular sin ningún estímulo.

Pantarotto y colaboradores observaron por primera vez que tanto los SWCNTs prístinos (no funcionalizados) como los SWCNTs funcionalizados con aminas marcadas fluorescentemente con fluorescein isotiocianato (FITC) eran capaces de atravesar la membrana celular de queratinocitos humanos (Figura 3.1) [256]. Posteriormente, Monteiro-Riviera y colaboradores observaron que los MWCNTs también atraviesan la membrana celular encontrándolos al interior del citoplasma y núcleo (Figura 3.2) [257].

Fue tal el descubrimiento que inmediatamente comenzaron a surgir estudios para determinar si los CNTs podían atravesar la membrana celular sin estímulos en diferentes líneas celulares de mamífero marcándolos fluorescentemente para su detección [106-110, 113, 114, 258-261]. Así mismo se estudió su capacidad para transportar moléculas más complejas como vitaminas, péptidos, proteínas, aminas [115, 259-264], y ácidos nucleicos [95, 101-115].

Existen diferentes estudios que indican que la endocitosis es el proceso por el cual los CNTs atraviesan la membrana, en particular aquella mediada por receptor dependiente de clatrina (Figura 3.3-A) [114, 124]; sin embargo, otros mecanismos como la difusión, la endocitosis caveolar, y la macropinocitosis también han sido propuestos (Figura 3.3-B – 54-D) [106, 114, 124, 265-267].

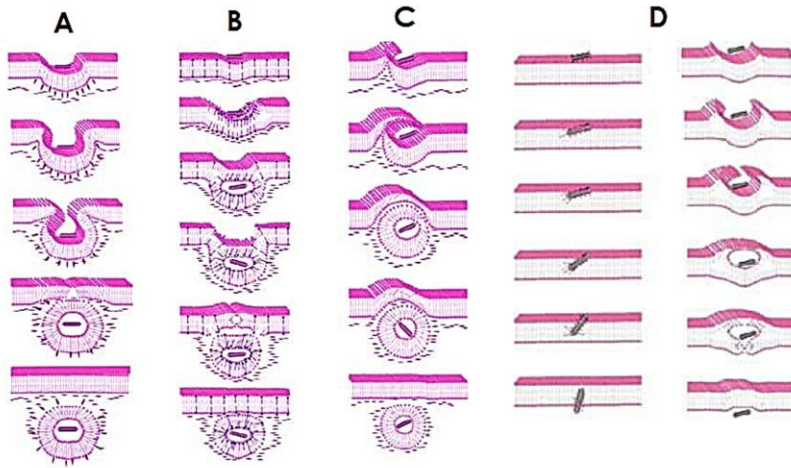


Figura 3.3. Posibles mecanismos de entrada a través de la membrana celular para CNTs: A) endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina; B) endocitosis caveolar; C) macropinocitosis; D) difusión. Modificado de All-Boucetta 2008 [265].

Sin embargo, los estudios más convincentes han sido realizados por Kam y colaboradores en células epiteliales humanas de carcinoma cervical (HeLa) y células promielíticas de leucemia humana (HL-60). Ambos tipos celulares fueron incubados a 4°C en presencia de SWCNTs funcionalizados con moléculas fluorescentes y con un pretratamiento de NaN_3 , para disminuir la síntesis global de ATP (adenosín trifosfato) y por lo tanto a la endocitosis mediada por receptor, observando una disminución en la fluorescencia. La fluorescencia también fue disminuida al realizar un pretratamiento hipertónico con sacarosa en ausencia de K^+ , dicho tratamiento impide la formación de vesículas revestidas con clatrina, bloqueando el transporte de los SWCNTs a través de la membrana celular. Finalmente, para descartar que la internalización pudiera ser debida parcialmente por la endocitosis caveolar, se realizó un pretratamiento con los antibióticos filipina y nistatina para inhibir la formación de vesículas caveolares; sin embargo la fluorescencia en este tratamiento no se vio afectada en comparación con el tratamiento realizado con la toxina B del cólera (CTX-B) cuya entrada es mediada por la vía de endocitosis caveolar [114, 124].

tamiento hipertónico con sacarosa en ausencia de K^+ , dicho tratamiento impide la formación de vesículas revestidas con clatrina, bloqueando el transporte de los SWCNTs a través de la membrana celular. Finalmente, para descartar que la internalización pudiera ser debida parcialmente por la endocitosis caveolar, se realizó un pretratamiento con los antibióticos filipina y nistatina para inhibir la formación de vesículas caveolares; sin embargo la fluorescencia en este tratamiento no se vio afectada en comparación con el tratamiento realizado con la toxina B del cólera (CTX-B) cuya entrada es mediada por la vía de endocitosis caveolar [114, 124].

3.1.1. Transfección de células de mamífero mediada por CNTs

Actualmente el uso de CNTs para la transfección de células de mamífero es una realidad, y es por eso por lo que se han utilizado diferentes vectores plasmídicos que codifican principalmente para proteínas reporteras tales como la GFP [101, 103, 105, 113], la luciferasa [104] y la β -galactosidasa [102, 106, 115], las cuales han permitido determinar la eficiencia de los CNTs para transfectar. Por otro lado, se ha demostrado que la capacidad que tiene un CNT para transfectar está muy relacionada con el grupo funcional con el que se ha funcionalizado.

Por ejemplo, Gao y colaboradores funcionalizaron MWCNTs con amino (MWCNTs- NH_2), carboxilo (MWCNTs- COOH), hidroxilo (MWCNTs- OH) y alquilo (MWCNTs- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) y los conjugaron con un plásmido que codifica para la proteína GFP. El plásmido únicamente fue retenido y transportado al interior de células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) por los MWCNTs- NH_2 (Figura 3.4). A pesar de que la expresión de la GFP fue menor que la transfección medida por lipofec-

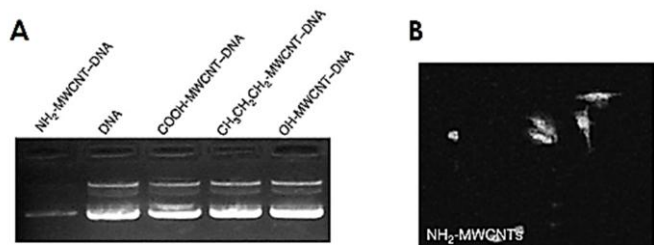


Figura 3.4. Gel de electroforesis para DNA unido a MWCNTs funcionalizados con diferentes grupos funcionales (A). Micrografías de la fluorescencia emitida por la proteína EGFP en células HUVEC transfectadas con MWCNTs- NH_2 (B). Modificado de Gao, 2006 [101].

ción, el tratamiento con MWCNTs mostró un mayor nivel de biocompatibilidad en términos de viabilidad celular [101].

En los estudios realizados por, Liu [104] y por Yu [105] se utilizaron MWCNTs funcionalizados con PEI, y con ellos transfectaron células de hígado de embriones humanos (HEK293T) con un plásmido que expresa a la proteína luciferasa [104] y con uno que expresa a la GFP (Figura 55) [105]. La transfección con MWCNTs-PEI resultó en una

mayor expresión y menor toxicidad a la obtenida utilizando únicamente con PEI o DNA en ausencia de MWCNTs (Figura 3.5-C) [104, 105].

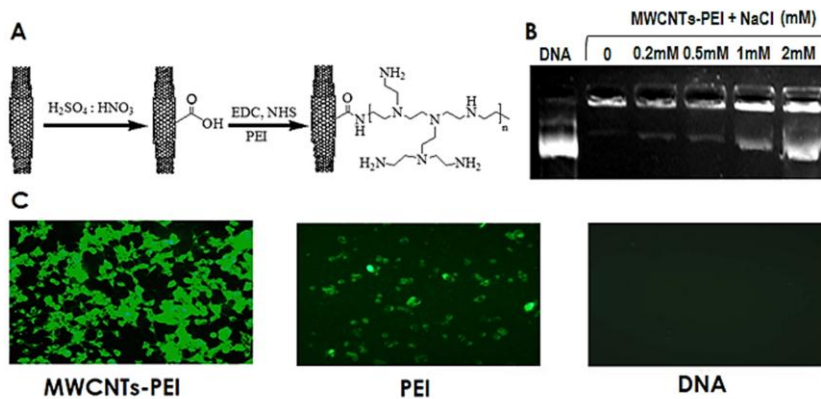


Figura 3.5. A) Síntesis de MWCNTs-PEI por el método de oxidación. B) Electroforesis del plásmido en presencia de MWCNTs-PEI y diferentes concentraciones de NaCl. C) Micrografías confocales de células HEK293T expresando GFP transfectadas con MWCNTs-PEI, PEI y únicamente DNA. Modificado de Yu, 2009 [105].

Algunos estudios han demostrado que los CNTs funcionalizados con oligoetilenglicol diamina (CNTs-OEG-DA), lisina, PEI, polialilamina (PAA), y sus derivados son capaces de transfectar diferentes tipos celulares, tales como células HeLa y células epiteliales de carcinoma alveolar humano (A-549) con un plásmido que codifica para la β -galactosidasa [102, 106,

115]. En dichos estudios se observó que la expresión de la β -galactosidasa aumentaba conforme la concentración de CNTs y el tiempo de incubación eran aumentados, sin observar daños tóxicos aparentes [102, 115].

3.1.2. Transfección de células de mamífero con RNAs interferentes mediada por CNTs

Se ha recurrido también al uso de CNTs para introducir RNAs interferentes (siRNAs) por su alta eficiencia de transfección [107, 268]. Los siRNAs tienen la capacidad de interferir con el RNA mensajero de genes endógenos, silenciando o apagando su expresión. Particularmente los siRNAs se han utilizado para el silenciamiento de genes involucrados en el desarrollo de cáncer y otras enfermedades [269].

Una de las estrategias más utilizadas para transfectar células de mamífero con siRNAs vía CNTs fue desarrollada por Kam y colaboradores [107, 124],

la cual consiste en funcionalizar CNTs no covalentemente con fosfolípidos (PL) acoplados a cadenas de PEG con terminaciones amino a través de interacciones hidrofóbicas (Figura 3.6-A). Los CNTs-PL-PEG-NH₂ son unidos a través de un interconector (sulfo-LC-SPDP) capaz de formar puentes disulfuro entre el CNT y el siRNA (Figura 3.6-B). Una vez que el CNT penetra la membrana celular es transportado tanto a endosomas como a lisosomas, donde los puentes disulfuro son cortados ya sea enzimáticamente o por cambio de pH, liberando el siRNA hacia el

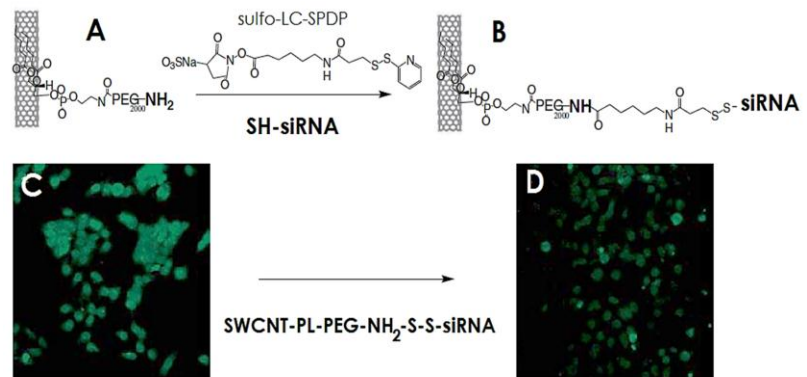


Figura 3.6. A) Síntesis de SWCNTs-PL-PEG-NH₂; B) unión del nanohíbrido a un siRNA a través de puentes disulfuro; C) células expresando a la lámina nuclear marcada con anticuerpos fluorescentes; D) células después de la transfección con SWCNTs. Modificado de Kam, 2006 [124].

citoplasma donde interactúa con un RNA mensajero (mRNA) específico. Esta estrategia ha sido muy eficaz para el silenciamiento de los genes que codifican para las proteínas de la lámina nuclear (Figura 3.6-D) [107, 124], los receptores de quimiocinas tipo 4 (CXCR4) [111], los correceptores CD4 y el canal de potencial receptor transitorio 3 (TRPC3) [110].

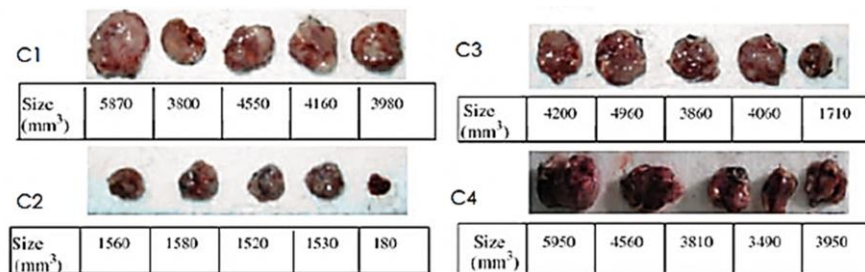


Figura 3.7. Silenciamiento *in vivo* de mTERT en tumores de ratón. Tamaño de los tumores extraídos después de 7 días de la transfección. C1) control; C2) SWCNTs-COONH-(CH₂)-NH₂::siRNA; C3) siRNA; C4) mock. Modificado de Zhang, 2006 [108].

y de humano *in vitro* e *in vivo* (Figura 3.7) [108], el antígeno CD80 [109], el supresor de señalización de citosina 1 (SOCS1) [109], y la ciclina A₂ [112].

Se ha observado que al utilizar la funcionalización de MWCNTs con PEI o con cloruro de cetilpiridinio se obtiene una mayor eficiencia que la obtenida por lipofección para el silenciamiento de genes como el de la luciferasa en células transgénicas de cáncer pulmonar H1299 que sobreexpresan a dicho gene [270].

3.2. Internalización de CNTs en células con pared celular

A pesar de que el uso de CNTs para la transfección de células en mamíferos ha sido ampliamente estudiado por la facilidad que tienen para atravesar la membrana celular, no existen evidencias suficientes que demuestren que éstos sean capaces de atravesar de la misma manera la pared celular de bacterias o de plantas. Además, los estudios relacionados con este tema son muy escasos.

Existe un reporte realizado por Rojas-Chapana y colaboradores acerca de la interacción entre CNTs y paredes celulares en células de bacterias. A diferencia de las paredes celulares en plantas las de bacterias se encuentran formadas en su mayoría por peptidoglucano. El grupo de investigación logró la transformación genética de *Escherichia coli* al hacer pasar un plásmido a través de nanocanales transitorios en la pared celular formados por MWCNTs prístinos radiados con microondas (Figura 3.8); sin embargo en el estudio no se contempló la posibilidad de que los MWCNTs pudieran atravesar por sí mismos la pared celular [271].

Estudios realizados en plantas con suspensiones de *Arabidopsis thaliana* determinaron que era necesario inmovilizar una enzima degradadora de celulosa (celulasa) en la superficie de SWCNTs oxidados (Figura 3.9-A) para promover su entrada a través de la pared celular y lograr una transfección exitosa expresando a la proteína reportera GFP (Figura 3.9-B), ya que la pared obstaculiza visiblemente el paso de los CNTs hacia el interior celular [272, 273].

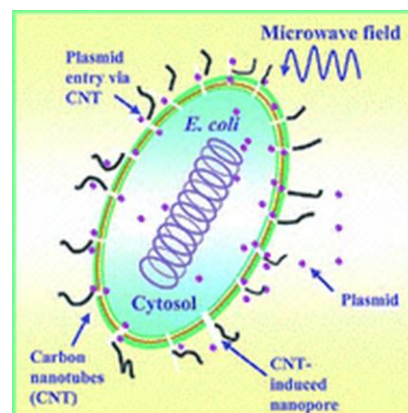


Figura 3.8. Representación del proceso de transformación bacteriana por MWCNTs irradiados con microondas que promueven la formación de canales transitorios en la pared celular de *Escherichia coli*. Rojas-Chapana, 2005 [271].

Serag y colaboradores utilizaron protoplastos de *Catharanthus roseus* (vinka de Madagascar) para investigar si los CNTs son capaces de atravesar la membrana celular en plantas y los mecanismos por los cuales podrían hacerlo [274]. Observaron que los MWCNTs funcionalizados con FITC colocalizaban con muy pocas vesículas endocíticas teñidas con el marcador FM4-64 (Figura 3.10), indicando que la endocitosis no es el principal mecanismo por el cual los MWCNTs atraviesan la membrana celular en protoplastos, sugiriendo que a diferencia de lo que sucede en mamíferos [114, 124], en plantas lo hacen por difusión simple. A través de microscopia HRTEM (Figura 3.11) los MWCNTs se encontraron principalmente localizados en el citoplasma y al interior de orgánulos como el núcleo, vacuolas, plástidos y mitocondrias [274].

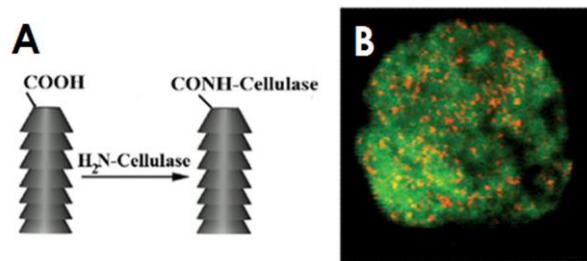


Figura 3.9. 1) SWCNTs funcionalizados con celulasa (A); fluorescencia emitida por GFP (verde) y por SWCNTs (puntos rojos) en células de *Arabidopsis thaliana*. Modificado de Serag, 2008 [272, 273].

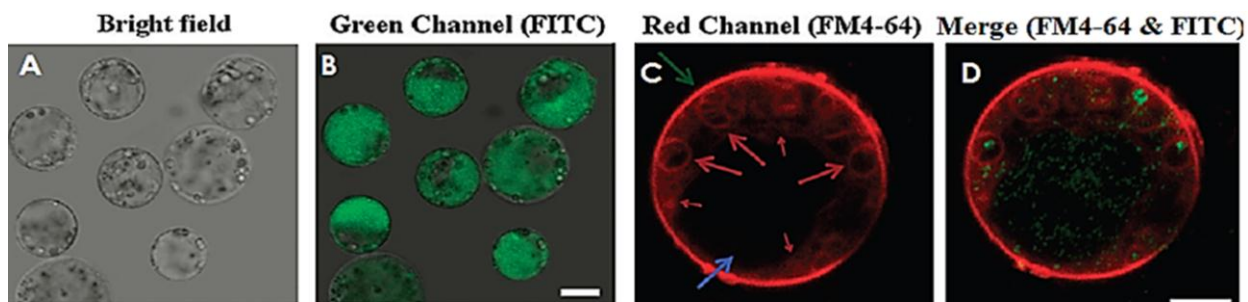


Figura 3.10. Micrografías confocales de protoplastos en campo claro (A); fluorescencia debida a FITC (B); fluorescencia de la membrana (flecha verde) y vesículas endocíticas (flechas rojas) marcadas con FM4-64 y su colocalización con FITC (D). En B, la flecha azul indica la vacuola. Serag, 2011 [274].

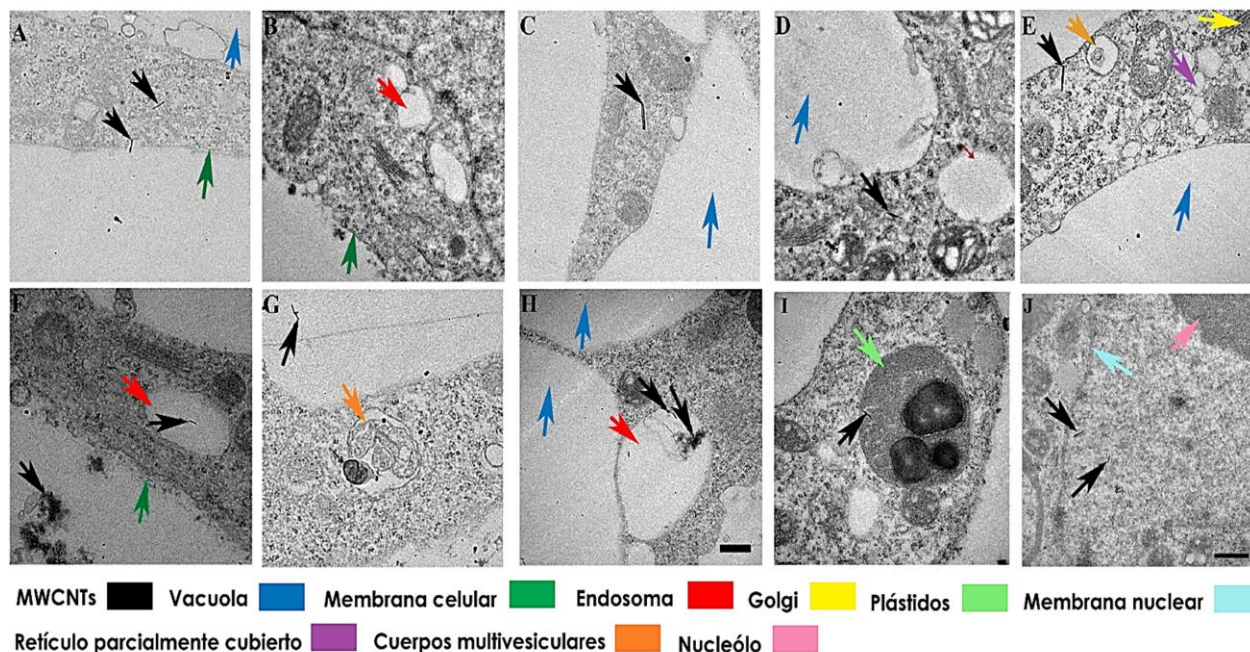


Figura 3.11. Micrografías HRTEM donde se muestra la localización de los MWCNTs al interior de protoplastos. Modificado de Serag, 2011[274].

Los estudios realizados por Liu y colaboradores en células intactas en suspensión celular de *Nicotiana tabacum* Bright-Yellow-2 (BY-2) sugieren que los SWCNTs son capaces de atravesar la pared celular en plantas [275]. Primero funcionalizaron SWCNTs oxidados no covalentemente con FITC por apilamiento π - π (SWCNTs-FITC) y al incubarlos en presencia de las células BY-2 observaron que éstos habían atravesado la pared y membrana celular localizándose en el sistema vacuolar de células intactas (Figuras 3.12-A y 3.12-B), las cuales fueron diferenciadas de las células plasmolizadas y muertas con yoduro de propidium (PI). En contraste, cuando las células BY-2 se incubaron con SWCNTs prístinos funcionalizados no covalentemente con una molécula de ssDNA marcada con FITC vía apilamiento π - π (SWCNTs-DNA-FITC), ésta fue transportada hacia el citoplasma localizado en las periferias de las vacuolas (Figuras 3.12-C y 3.12-D) [275]. Estas observaciones sugieren que existe un mecanismo de reconocimiento, separación y distribución que envía a diferentes compartimientos a los SWCNTs dependiendo del tipo de molécula que transportan. A diferencia de lo propuesto por Serag y colaboradores [274], Liu propone que los CNTs atraviesan la membrana celular por endocitosis tal y como sucede en mamíferos, inhibiendo la internalización de los CNTs al realizar los tratamientos en presencia de un inhibidor de endocitosis dependiente de clatrina conocido como wortmannina [275].

En un estudio más reciente publicado por Yuan y colaboradores, se introdujo una secuencia de DNA marcada con FITC utilizando SWCNTs en células de mesófilo y en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* (Figura 3.13—E y 3.13—F) [276]. Las micrografías HRTEM muestran a los SWCNTs en el interior del núcleo, mitocondrias, cloroplastos y vacuolas, en la superficie de la pared celular (Figura 3.13-A – 3.13-D). No se encontraron evidencias de un mecanismo de entrada mediado por endocitosis en los protoplastos, pero sí un mecanismo de internalización por difusión [276] que concuerda con lo propuesto por Serag y colaboradores en protoplastos [274].

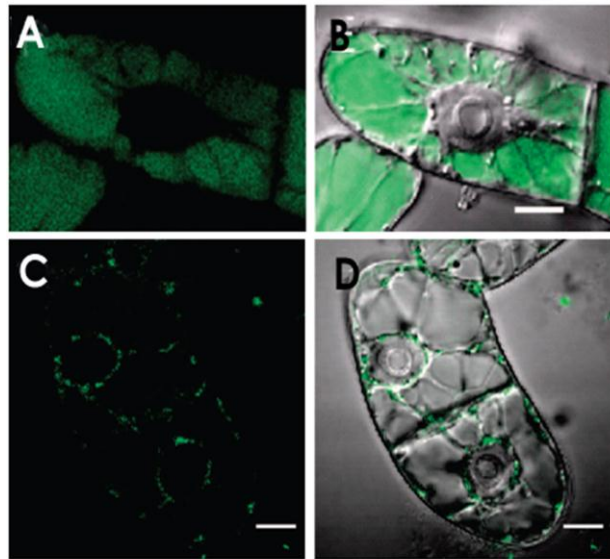


Figura 3.12. Micrografías confocales en campo claro (B y C) y de fluorescencia (A y C) de SWCNTs-FITC localizados al interior de células intactas dentro de vacuolas (A y B) y de SWCNTs-DNA-FITC localizados en el citoplasma (C y D). Modificado de Liu, 2009 [275].

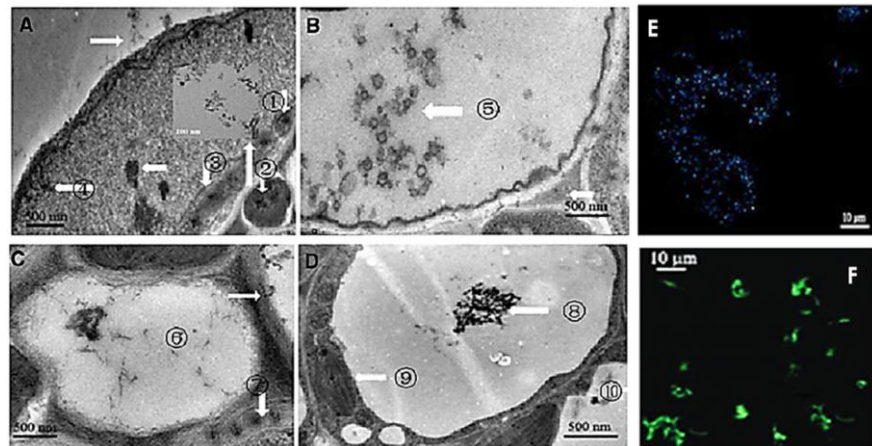


Figura 3.13. Micrografías HRTEM que muestran la localización de los SWCNTs en las células del mesófilo de *Arabidopsis thaliana*: (1) mitocondria; (2) núcleo; (3,7 y 9) cloroplasto; (4) pared celular; (5, 6 y 8) vacuola. Las micrografías de fluorescencia (E y F) muestran en el interior de las vacuolas (E) y núcleo (F) a los SWCNTs funcionalizados no covalentemente con una secuencia de DNA marcada con FITC. Modificado de Yuan, 2011 [276].

CAPÍTULO 4

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos

En plantas, los métodos existentes de transformación genética existentes son laboriosos, poco eficientes, y únicamente permisibles en número limitado de especies. En la actualidad, los CNTs funcionalizados con aminas (particularmente los MWCNTs por lo fácil que es sintetizarlos y adquirirlos) son utilizados como un método eficiente para la transfección de células de mamífero, ya que pueden atravesar la membrana celular fácilmente mientras transportan consigo ácidos nucleicos. Sin embargo, en plantas el uso de CNTs para la transformación genética no ha sido probado debido a que existe una gran incertidumbre en cuanto a si son capaces o no de atravesar la pared celular. Con base en lo anterior, el presente estudio busca determinar si los CNTs pueden mediar la transformación genética de células intactas de cultivos celulares de plantas, ya que son accesibles y de fácil manejo.

HIPÓTESIS

Los MWCNTs funcionalizados con aminas son capaces de atravesar la pared celular, transportar y entregar DNA plasmídico al interior de células de *Nicotiana tabacum* en suspensión, dando lugar a la transformación genética de la célula con un alto nivel de biocompatibilidad.

OBJETIVO GENERAL

Transformar células en suspensión de *Nicotiana tabacum* utilizando MWCNTs funcionalizados con aminas para transportar, internalizar y entregar DNA plasmídico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Funcionalizar MWCNTs prístinos por el método de “funcionalización covalente, libre de solventes, para superficies con defectos” con diferentes tipos de aminas alifáticas, caracterizarlos, y determinar si la funcionalización se realiza con éxito.
- 2) Utilizar los MWCNTs prístinos y funcionalizados con aminas para transportar y entregar un plásmido al interior de células en suspensión de *Nicotiana tabacum*, y determinar si se da el proceso de transformación genética.
- 3) Estudiar la capacidad de los MWCNTs prístinos y funcionalizados con aminas para internalizarse en células en suspensión.
- 4) Analizar el nivel de biocompatibilidad de los CNTs funcionalizados en presencia de las células en suspensión.

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS SECCIÓN A

Funcionalización covalente, libre de solventes, de MWCNTs con aminas alifáticas

5.1. Materiales

- 1) MWCNTs prístinos cortos y de fácil dispersión: MWCNTs (Nanoestructured & Amorphous Materials) con una pureza de > 95%, longitud de 0.5-2 μm , diámetro externo de 10 – 20 nm, y un diámetro interno de 5 - 10 nm.
- 2) Aminas alifáticas de cadena larga:
 - octadecilamina (Sigma Aldrich & Fluka)
 - 1,8-diaminooctano (Sigma Aldrich & Fluka)
- 3) Aminas alifáticas poliméricas:
 - Polietilenglicol-diamina 2000 kDa (Sigma Aldrich & Fluka)
 - Polietilenimina ramificada de 25000 kDa (Sigma Aldrich & Fluka).

5.2. Metodología

5.2.1. Funcionalización covalente, libre de solventes, de los defectos de la superficie

Las aminas se colocaron por separado en tubos de vidrio Pyrex junto con la misma proporción de MWCNTs prístinos (proporción 1:1), y se sellaron al vacío (10^{-2} – 10^{-1} Torr) para formar las ampollitas. Las ampollitas se colocaron dentro de un horno cilíndrico utilizando los parámetros de temperatura mostrados en la Tabla 5.1. Debido a la naturaleza química de las aminas utilizadas, la funcionalización se dividió en dos tipos: 1) la funcionalización covalente libre de solventes en fase de gas para 1-octadecilamina (ODA), 1,8-diaminooctano (DO), y 2) la funcionalización covalente libre de solventes en fase de fusión para polietilenglicol diamina (PEGDA) y polietilenimina (PEI).

Ampollita	Proporción (w/w)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Tipo de funcionalización
1	MWCNTs : ODA	160	3	Fase de gas
2	MWCNTs: DO	170	6	
3	MWCNTs : PEGDA	170	8	Fase de fusión
4	MWCNTs : PEI	190	12	

Tabla 5.1. Parámetros de temperatura y tiempo empleados para la funcionalización covalente, libre de solventes, en fase de gas, y en fase de fusión utilizando.

5.2.2. Purificación de los MWCNTs funcionalizados

Después de la reacción de funcionalización, las ampollas fueron abiertas para purificar las muestras extrayendo el exceso de aminas que no reaccionaron durante la funcionalización, utilizando los parámetros mostrados en la Tabla 5.2. Las muestras de MWCNTs funcionalizadas con ODA y DO (referidos como MWCNTs-ODA y MWCNTs-DO, respectivamente) fueron desgasificadas al vacío utilizando un equipo de vidrio para desgasificación y colocándolas en el reactor (Figura 5.1–2); mientras que las muestras de MWCNTs funcionalizados con PEGDA y PEI (referidos como MWCNTs-PEGDA y MWNTs-PEI, respectivamente) fueron purificadas con ciclos de lavados y centrifugaciones utilizando H₂O destilada.

Ampolleta	Método de	Temperatura (°C)	Velocidad (rpm)	Tiempo total
1	MWCNTs - ODA	120	-	2h
2	MWCNTs- DO			
3	MWCNTs - PEGDA	25	5000	Ciclos de 20 min
4	MWCNTs - PEI			

Tabla 5.2. Parámetros de temperatura y tiempo empleados purificación de los MWCNTs funcionalizados con aminas.

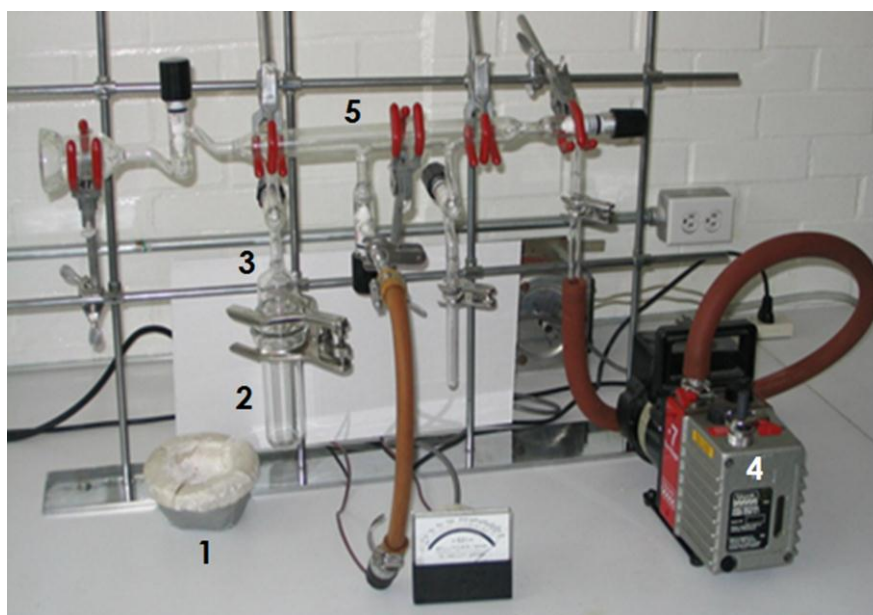


Figura 5.1. Equipo de vidrio utilizado para la desgasificación diseñado en el Laboratorio de Materiales y Sensores del CCADET de la UNAM: parrilla regulada por voltaje (1); reactor (2); sección colectora del reactor (3); bomba de vacío (4); sistema de válvulas de cierre y escape (5).

5.2.3. Caracterización de los MWCNTs funcionalizados con aminas alifáticas

Se emplearon diferentes métodos de espectroscopia y microscopia para la caracterización físico-química, estructural y topográfica de los MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas.

5.2.3.1. Espectroscopia Raman

Se utilizó un equipo modelo NICOLET-Almega XR para determinar el espectro Raman de los MWCNTs prístinos.

5.2.3.2. Pruebas de solubilidad y dispersabilidad

Los MWCNTs prístinos y funcionalizados (1 mg) fueron previamente macerados en un mortero de ágata y ultrasonicados en 1 ml de H₂O mili-Q o isopropanol absoluto con un equipo Branson-2510 durante 15 min a 45kHz, y el comportamiento de las muestras se observó durante 48 h.

5.2.3.3. Espectroscopia en el Infrarrojo (FT-IR)

Tanto los MWCNTs prístinos como los funcionalizados con aminas fueron ultrasonicados en isopropanol absoluto y colocados sobre la superficie de una ventana de ZnSe, la cual se colocó en un equipo Nicolet Nexus 670 FT-IR para la obtención de los espectros en el Infrarrojo.

5.2.3.4. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Las curvas termogravimétricas para cada tipo de MWCNTs se obtuvieron con termobalanza Mettler Toledo 851e TGA/SDTA con flujo de aire de 100 ml/min y con una rampa de calentamiento de 10°C/min hasta llegar a una temperatura de 1000 °C.

5.2.3.5. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Las micrografías de cada tipo de MWCNTs se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM-5900LV operando a 30 kV.

5.2.3.6. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

Las muestras de MWCNTs fueron sonicadas en isopropanol y colocadas en un soporte de silicio por el método de rotación "spin-coating" a 300 rpm durante, 1.5 min. Las micrografías se obtuvieron con el software Pico View 1.6 a través de un microscopio Agilent 5500 Multimode Scanning Probe con cantiléver de silicón empleando el modo de contacto intermitente (acústico) a una frecuencia 300 kHz.

5.2.3.7. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

Las micrografías de los MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas fueron obtenidas con un equipo JEOL 400EX operando a 200 kV, ambos tipos de CNTs fueron sonicados en isopropanol y colocados en un soporte para microscopio TEM de nitrocelulosa.

MATERIALES Y MÉTODOS SECCIÓN B

Pruebas de internalización de MWCNTs en células de plantas

5.3. Materiales

1) CNTs:

- SWCNTs (Nanoestructured & Amorphous Materials)
- SWCNTs oxidados (Nanoestructured & Amorphous Materials)
- MWCNTs prístinos
- MWCNTs-ODA
- MWCNTs-DO
- MWCNTs-PEGDA
- MWCNTs-PEI

2) Fluoróforos:

- FITC (Sigma Aldrich)
- Azul de Evans (Sigma Aldrich)
- Ioduro de propidium (Sigma Aldrich)
- Alexa Fluor® 555-NHS (Invitrogen)

3) Buffer de marcaje fluorescente:

- 25 mg de NaHCO₃
- 1 ml de H₂O mili-Q estéril
- Mezclar vigorosamente con vórtex hasta disolver completamente y guardar a -20°C.

4) Material biológico:

- Semillas de *Nicotiana tabacum* L. c.v. Xanthi (NT-X)
- Línea celular estable de *Nicotiana tabacum* L. c.v. Bright Yellow (NT-1) donada por el Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPYCYT).

5) Medios de cultivo:

a) Medio Murashige Skoog (MS) para germinación de semillas:

- 500 ml de H₂O destilada
- 10 ml de las soluciones stock I-VIII mostrados en Tabla 5.1.
- 30 g de sacarosa
- 3.3 g de Gellan
- Ajustar el pH a 5.7 – 6.0 con KOH y aforar a 1L.
- Esterilizar por autoclave, servir en frascos estériles utilizando una campana de flujo laminar y guardar a -4°C.

b) Medio de inducción y mantenimiento para callo (TC) y suspensión celular (TS) de la línea celular NT-X:

- 500 ml de H₂O destilada
- 10 ml de cada una de las soluciones stock I-IX mostradas en Tabla 5.3.
- 30 g de sacarosa
- * 3.3. g de Gellan (únicamente para medio TC)
- Ajustar el pH a 5.7 con KOH, y aforar a 1L.
- Esterilizar por autoclave, servir en frascos estériles utilizando una campana de flujo laminar y guardar a - 4°C.

Solución stock	Contenido	Concentración (g/L)
I (100X) Nitratos	Nitrato de amonio	46.3
	Nitrato de potasio	283
II (100X) Sulfatos	Sulfato de magnesio 7H ₂ O	18.5
	Sulfato de manganeso H ₂ O	0.334
	Sulfato de Zinc 7H ₂ O	0.15
III (100X) Halógenos	Cloruro de calcio 2H ₂ O	16.6
	Yoduro de potasio	0.08
IV (100X) Fosfatos	Fosfato de potasio H ₂ O	40
	Ácido bórico	0.16
V(100X) Quelantes	Sulfato ferroso 7H ₂ O	2.78
	EDTA 2H ₂ O	3.73
VI Vitamina R2 (1X)	Mioinositol	100
	Ácido nicotínico	1
	Piridoxina	1
	Tiamina	2
VII Antioxidantes	Ácido ascórbico	0.5
	Ácido cítrico	0.5
VIII Aminoácidos	Glicina	20
IX Fito hormonas	2,4-D	0.2
	BAP	0.01

Tabla 5.3. Contenido de las soluciones stock para medio de germinación, medio TS y medio TC.

c) Medio BY-2 de para mantenimiento de la línea celular estable NT-1

- 500 ml de H₂O destilada
- 10 ml década una de las solución stock I-IX mostradas en la Tabla 5.4.
- 30 g de sacarosa
- Ajustar el pH a 5.7 con KOH y aforar a 1L.
- Esterilizar por autoclave
- Transferir a frascos estériles utilizando una campana de flujo laminar y guardar a - 4°C.

Solución stock	Contenido	Concentración (g/L)
I (100X) Nitratos	Nitrato de amonio Nitrato de potasio	19.91 121.7
II (100X) Sulfatos	Sulfato de magnesio 7H ₂ O Sulfato de manganeso H ₂ O Sulfato de Zinc 7H ₂ O	7.955 0.143 0.065
III (100X) Halógenos	Cloruro de calcio 2H ₂ O Yoduro de potasio	7.138 0.035
IV (100X) Fosfatos	Fosfato de potasio H ₂ O Ácido bórico	25.5 0.068
V(100X) Quelantes	Sulfato ferroso 7H ₂ O EDTA 2H ₂ O	1.195 1.604
VI Vitaminas	Mioinositol	10
VII Antioxidantes	Ácido ascórbico Ácido cítrico	0.5 0.5
VIII Aminoácidos	Glicina Tiamina	20 0.1
IX Fitohormonas	2,4-D	0.2

Tabla 5.4. Contenido de las soluciones stock para la preparación del medio BY-2.

5.4. Metodología

5.4.1. Obtención las suspensiones celulares

5.4.1.1. Inducción de callos a partir de plántulas de NT-X

1. Las semillas de NT-X se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10 % y tween 20 al 0.1% agitándolas suavemente con ayuda de un vórtex durante 10 min, y lavadas con H₂O destilada estéril.
2. Las semillas desinfectadas se colocaron sobre el medio MS para germinación con ayuda de una punta estéril, y se incubaron a 25°C bajo condiciones de día largo (16 h de luz: 8 h de oscuridad) durante unos días hasta obtener plántulas de 15 días.
3. Se extrajeron hipocótilos, tallos, peciolos, cotiledones, y algunas hojas a partir de las plántulas con ayuda de una navaja estéril, y se colocaron sobre el medio TC para inducción de callos asegurando que el envés de las hojas y cotiledones estuvieran en contacto con la superficie del medio, y se incubaron a 25°C en condiciones de oscuridad.
4. Al paso de unas semanas, se observó la formación de una masa blanquecina en las periferias de los explantes, y ésta fue transferida con ayuda de una navaja estéril a medios TC fresco para permitir el crecimiento masivo del callo.
5. Finalmente, se realizaron subcultivos periódicos cada 15 días, retirando las zonas oxidadas y viejas ricas en compuestos fenólicos con ayuda de una navaja y pinzas estériles, transfiriendo el cayo joven y blanquecino a medios TC frescos para su mantenimiento.

5.4.1.2. Inducción de las suspensiones celulares de NT-X

1. Se sumergieron 6 g de callo joven de NT-X en matraces con 50 ml de medio líquido para inducción de suspensión celular TS. Los matraces se sellaron con papel aluminio estéril y se incubaron a 25°C con agitación orbital (130 rpm) en condiciones de oscuridad durante unos días hasta que el callo se disgregó casi por completo.
2. Se utilizó un dispersor (Sigma Aldrich) para disgregar y homogenizar la suspensión celular, de la cual se tomaron 10 ml y se colocaron en un matraz con 50 ml de medio TS fresco. Este proceso se realizó periódicamente cada 7 días hasta obtener una suspensión celular homogénea.

5.4.1.3. Mantenimiento de la línea celular estable NT-1

La línea celular NT-1 se subcultivó periódicamente cada 7 días, transfiriendo 10 ml de la suspensión celular a un matraz con 50 ml de medio fresco BY-2 líquido, el cual se selló con papel aluminio estéril, y se incubó a 25°C con agitación orbital a 130 rpm en condiciones de oscuridad.

5.4.2. Funcionalización y derivatización de CNTs con moléculas fluorescentes

Los siguientes procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas, y cada tipo de CNT fue esterilizado al vacío previamente durante 24 h utilizando un desecador.

5.4.2.1. Funcionalización no covalente de SWCNTs oxidados con FITC

La funcionalización no covalente vía apilamiento π - π de SWCNTs oxidados (SWCNTs-ox) con el fluoróforo FITC se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Liu y colaboradores [275].

1. Se preparó una solución con 50 μ g de SWCNTs-ox (previamente esterilizados al vacío en un desecador durante 24 h) en un volumen total de 500 μ l de H₂O mili-Q estéril, a la cual se le agregaron 5 μ l de FITC a una concentración de 1 mg/ml. La solución se sonicó durante 5 min para romper los cúmulos y agregados, y se incubó a 25°C durante 1h en oscuridad.
2. Posteriormente, la solución se centrifugó durante 5 min a 12000 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante con ayuda de una punta de micropipeta, y se realizaron ciclos de lavados y centrifugaciones con H₂O mili-Q estéril para eliminar los residuos de FITC.
3. Los SWCNTs-ox funcionalizados con FITC se resuspendieron en 100 μ l de H₂O mili-Q estéril.

5.4.2.2. Funcionalización y derivatización de MWCNTs con Alexa Fluor® 555-NHS

- a) Funcionalización no covalente vía apilamiento π - π de MWCNTs prístinos, SWCNTs prístinos y MWCNTs-ODA con Alexa Fluor® 555-NHS:
1. Se preparó una solución con 30 μ g de Alexa Fluor® 555 -NHS en 6 μ l de MSO (stock de Alexa Fluor® 555 -NHS).
 2. A continuación, se prepararon soluciones de MWCNTs prístinos, SWCNTs prístinos o MWCNTs-ODA, con 50 μ g de cada uno por separado en volumen total de 20 μ l con H₂O mili-Q estéril. A cada solución se le añadió 1 μ l del stock de Alexa Fluor® 555 -NHS y se sonicaron durante 5 min para romper los

cúmulos y agregados, y posteriormente se incubaron durante 1 h a 25°C en oscuridad, y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min.

3. El sobrenadante se desechó con ayuda de una punta de micropipeta, y se realizaron ciclos de lavados y centrifugaciones con H₂O mili-Q estéril para eliminar los residuos de Alexa Fluor® 555 –NHS.
 4. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en 20 µl de H₂O mili-Q estéril.
- b) Derivatización covalente de MWCNTs-DO, MWCNTs-PEGDA y MWCTNs-PEI con Alexa Fluor® 555 –NHS:
1. Se prepararon soluciones de MWCNTs-DO, MWCNTs-PEGDA o MWCNTS-PEI con 50 µg de cada uno en 10 µl de buffer de marcaje fluorescente, añadiéndoles 1 µl de stock de Alexa Fluor® 555 –NHS en un volumen total de 20 µl con H₂O mili-Q estéril, se sonicaron durante 5 min para romper los cúmulos y agregado, y se incubaron durante 1 h a 25°C en oscuridad.
 4. Las reacciones se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se desechó con ayuda de una pipeta, se realizaron ciclos de lavados y centrifugaciones con H₂O mili-Q estéril para eliminar los residuos de Alexa Fluor® 555 –NHS.
 5. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en 20 µl de H₂O mili-Q estéril.

5.4.3. Prueba de internalización de CNTs en células en suspensión

5.4.3.1. Prueba de internalización para SWCNT-ox funcionalizados con FITC

1. Se realizaron tratamientos en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas, colocando 100 µl de la solución de SWCNTs-ox funcionalizados con FITC (50 µg/µl) en 1 ml de la suspensión celular de NT-X o 1 ml de suspensión de la línea celular NT-1 en placas para ELISA estériles, y se incubaron durante un intervalo de 3–48 h a 25°C en agitación orbital (130 rpm).
2. Posteriormente, las suspensiones celulares fueron trasladadas a tubos Eppendorf y centrifugadas a 300 rpm, se retiró el sobrenadante y se realizaron lavados con medio BY-2 fresco. Las muestras fueron teñidas con Azul de Evans y PI, y se observaron al microscopio confocal.

5.4.3.2. Prueba de internalización para CNT funcionalizados con Alexa Fluor® 555-NHS

1. Se realizaron tratamientos en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas, colocando 20 µl de MWCNTs funcionalizados y derivatizados con Alexa 555®-NHS en 1 ml de la suspensión de la línea celular NT-1 en placas para ELISA estériles, y se incubaron durante un intervalo de 3–48 h a 25°C en agitación orbital.
2. Posteriormente, las suspensiones celulares fueron trasladadas a tubos Eppendorf y centrifugadas a 300 rpm, se retiró el sobrenadante y se realizaron lavados con medio BY-2 fresco. Las muestras se observaron al microscopio confocal.

5.4.3.3. Microscopia confocal

1. Para observar las muestras se utilizó un microscopio invertido Confocal Olympus IX81, realizando cortes en el eje Z, y utilizando los siguientes parámetros de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) para cada fluoróforo: FITC (λ_{ex} 488 nm; λ_{em} 520 nm); PI (λ_{ex} 493 nm; λ_{em} 630 nm); Alexa Fluor® 555-NHS (λ_{ex} 553 nm; λ_{em} 568 nm).
2. Las micrografías de las muestras se procesaron con el software FV10-ASW 1.7 Viewer.

MATERIALES Y MÉTODOS SECCIÓN C

Pruebas de transformación genética y biocompatibilidad con CNTs en células de plantas

5.5. Materiales

1) Plásmido AtnCBP-GFP:

El plásmido AtnCBP-GFP (Figura 5.2) contiene la región codificante del gene que codifica para la proteína nCBP (novel cap-binding protein) de *Arabidopsis thaliana* fusionada en su extremo 3' a la región codificante del gene que codifica para la proteína GFP. La fusión se encuentra regulada transcripcionalmente por el promotor constitutivo CamV 35S de plantas y el terminador transcripcional de la octopina sintasa (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido presenta un gene (KanR) que confiere resistencia a antibiótico kanamicina para bacterias, y un gene (Bar) que confiere resistencia al herbicida BASTA® para plantas.

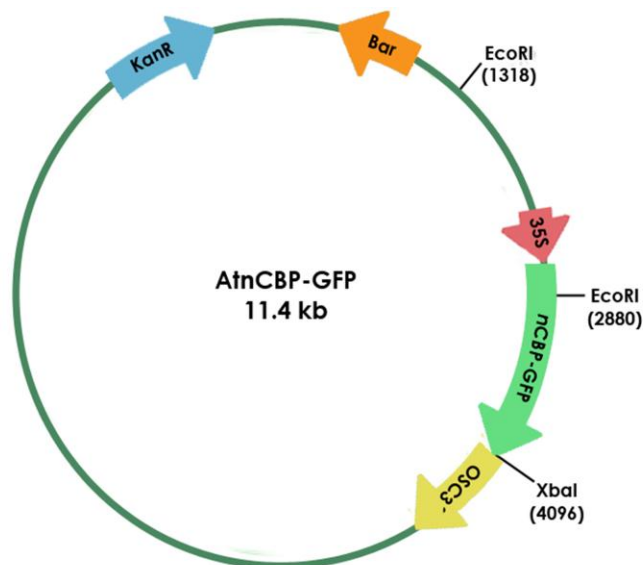


Figura 5.2. Mapa del plásmido AtnCBP-GFP. En el mapa se muestran las regiones que pertenecen los sitios donde cortan las enzimas de restricción EcoRI y XbaI.

2) Medio Luria-Bertani (LB):

- 10 g de Bacto triptona (peptona)
- 10 g de NaCl
- 15 g de agar (únicamente para preparar medio LB sólido).
- 5 g de extracto de levadura
- Aforar a 1L con H₂O destilada y esterilizar por autoclave; y dejar enfriar.
- Adicionar el antibiótico de interés a la concentración adecuada y servir en matraz o caja Petri, respectivamente (realizar en condiciones asépticas frente a un mechero).

3) Antibiótico:

Preparar una solución stock de kanamicina a una concentración de 50 mg/ml con H₂O mili-Q estéril, pasar por filtro de 0.2 µm y guardar a -20°C. Adicionar el volumen necesario de antibiótico al medio LB líquido para obtener una concentración final de 50 µg/ml, y mezclar con agitación suave.

4) Soluciones y Buffers:

a) Buffer de transformación PIPES-CaCl₂

- 10 mM PIPES
- 15 mM CaCl₂
- 250 mM KCl
- Agregar 975 ml de H₂O destilada y disolver ajustando el pH a 6.7 - 6.8.
- Adicionar 10.9 g de MnCl₂, esterilizar y guardar 4°C.

b) Solución de lisis alcalina I

- 50 mM glucosa
- 25 mM Tris-Cl (pH 8.0)
- 10 mM EDTA (pH 8.0)
- Hacer un stock de 100ml, esterilizar por autoclave y mantener a 4°C.

c) Solución de lisis alcalina II

- 0.2 N NaOH (tomar a partir de un stock de 10 N NaOH)
- 1% (w/v) SDS
- Preparar al momento de usar la cantidad necesaria.

d) Solución de lisis alcalina III

- 60 ml de 5 M acetato de potasio
- 11.5 ml de ácido acético glacial
- 28.5 ml de H₂O destilada
- Guardar la solución 4°C y transferir a hielo al momento de usar.

e) Solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (relación 25:24:1):

1. Derretir el fenol congelado a 68°C y agregar el antioxidante hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%.
2. Agregar un volumen igual de 0.5 M Tris-Cl (pH 8.0), agitar durante 15 min y dejar reposar hasta observar dos fases. Aspirar la fase superior acuosa cuidadosamente.
3. Agregar un volumen igual de 0.1 M Tris-Cl (pH 8.0), agitar durante 15 min, y dejar reposar hasta observar dos fases.
4. Aspirar la fase superior acuosa cuidadosamente y repetir el paso anterior hasta que el pH del fenol sea igual a 8.0 (utilizar papel pH o tornasol).
5. Finalmente, agregar 0.1 volúmenes de 100 mM Tris-Cl (pH 8.0) mezclado con 1% de β-mercaptoetanol y mezclar bien con el fenol. Guardar el fenol a 4°C en un frasco de ámbar y evitar el contacto con la luz.
6. Hacer una mezcla de fenol equilibrado pH 8.0, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 en presencia de 100 mM Tris-Cl (pH 8.0), y guardar a 4°C.

f) Buffer TE 10X:

- 100 mM Tris-Cl (pH. 7.4)
- 10 mM EDTA (pH 8.0)
- Esterilizar y mantener a temperatura ambiente.

g) Buffer TBE 10X:

- 53 g de Tris-Cl
- 27.5 g de ácido bórico
- 20 ml de EDTA (pH 8.0)
- Aforar a 1L con H₂O destilada y esterilizar. Diluir con H₂O para obtener un buffer TBE 0.5X.

h) Buffer de carga para electroforesis de DNA:

- 1mM EDTA (pH 8.0)
- 50 % glicerol
- 0.25 % azul de bromofenol
- 0.25 % xilencianol

i) Buffer de marcaje fluorescente:

- Ver materiales y métodos sección B (materiales 3)

5) *Stock de RNasa:*

- Disolver 2 mg de RNasa (GIBCO) en 2 ml buffer TE (pH 7.6) para obtener una concentración final de 1 mg/ml y guardar a -20°C.

6) *Stock de bromuro de etidio:*

- Disolver 10 mg de bromuro de etidio en 1 ml de agua y agitar durante 1 hora con agitador magnético. Guardar a 4°C en tubos color ámbar, etiquetar y cubrir de la luz correctamente.

7) *Kit de PCR convencional :*

- Taq polimerasa (Fermentas)
- 10X Taq Buffer (Fermentas)
- 25 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 10 mM dNTPs (Invitrogen): dATP, dGTP, dCTP, dTTP

8) *Kit para de PCR para marcaje fluorescente:*

- 2 mM 5-(3-aminoallyl)-dUTP (Invitrogen)
- Alexa Fluor® 555- NHS (Invitrogen)

9) Stock de oligos para amplificación de fragmentos por PCR

Fragmentos	Oligos	Secuencia	Fragmento esperado
35S-nCBP	35SFw nCBPRv	5'-AAGCTTCCTAAATCTACGGCGAAACAG-3' 5'-GCCGCTTGATTGAGTCTCTCAAACCCATCAC-3'	929 pb
nCBP	nCBP Fw nCBP Rv	5'-CAGGGACTCGGGAAACATGGACAGC-3' 5'-GCCGCTTGATTGAGTCTCTCAAACCCATCAC-3'	536 pb
GFP	GFP Fw GFP Rv	5'-CTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTT-3' 5'-GTAAAAGGACAGGGCCATCGCC-3'	604 pb

Tabla 5.5. Tabla que muestra la secuencia de los oligos delanteros (Fw) y reversos (Rv) para amplificación de fragmentos por PCR.

5.6. Metodología

5.6.1. Generación del plásmido *AtnCBP-GFP*

El plásmido *AtnCBP-GFP* (Figura 5.2) fue construido por De la Torre-Díaz [277] a partir del vector de clonación *pEarleyGate103* [166] utilizando la tecnología Gateway® de Invitrogen [278]. La tecnología Gateway® es un método universal de clonación que hace uso de la recombinación sitio-específica del bacteriófago λ para transferir una secuencia entre vectores Gateway® de manera rápida y eficiente. El método consta principalmente de tres pasos: 1) la generación de un vector de entrada *pENTR/D-TOPO*® [278]; 2) la recombinación entre el vector entrante y el vector destino (*pEarleyGate 103*); y 3) la inserción de la construcción (plásmido *AtnCBP-GFP*) en el hospedero apropiado (*Escherichia coli DH5 α*) [277].

5.6.2. Obtención de células competentes de *Escherichia coli DH5 α*

1. Se realizó un precultivo bacteriano inoculando 50 ml de medio LB líquido con una cepa no transformada de *Escherichia coli DH5 α* , e incubando durante toda la noche a 37°C con agitación a 250 rpm.
2. Posteriormente, se inocularon 400 ml de LB con 4 ml del precultivo incubándolo bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una absorbancia aproximada de 0.4–0.6 tomada a 600 nm, utilizando un equipo espectrofotómetro Biomate 3 de Thermo Scientific para determinarla.
3. El cultivo se repartió en 4 tubos estériles previamente enfriados, los cuales se colocaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 3000 rpm durante 7 min a 4°C.
4. El sobrenadante se decantó y el precipitado bacteriano fue resuspendido en 10 ml de buffer PIPES-CaCl₂ centrifugándolo a 3000 rpm durante 5 min a 4°C. Este paso anterior se repitió dos veces más, y el precipitado bacteriano se resuspendió en 5 ml de buffer PIPES-CaCl₂.
5. Finalmente, se prepararon alícuotas de 100 μ l en tubos Eppendorf, los cuales se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su uso posterior.

5.6.3. Transformación por choque térmico de *Escherichia coli* DH5α con el plásmido AtnCBP-GFP

1. Se agregó 1 µl del plásmido AtnCBP-GFP (1 µg/µl) a una alícuota de 100 µl de células competentes, y se mezcló adecuadamente.
2. El tubo se colocó en hielo durante 20 min y después se incubó a 42°C durante 90 s en baño termostático utilizando un equipo Thermostat plus; Eppendorf.
3. El tubo se transfirió a hielo durante 1-2 min, y se le añadieron 800 µl de medio LB líquido utilizando una pipeta con punta estéril.
4. El tubo fue incubado a 37°C durante 45 min en baño termostático, denominado bacterias transformadas.
5. Se tomaron 100 µl de las bacterias transformadas y se plaquearon sobre medio LB sólido en un medio LB sólido en presencia de kanamicina (50 µg/ml). Como control negativo, se crecen bacterias competentes no transformadas en medio LB en presencia de antibiótico.
6. Las cajas Petri fueron selladas con parafilm y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

5.6.4. Extracción a gran escala del plásmido AtnCBP-GFP

5.6.4.1. Preparación de cultivos bacterianos para la extracción del plásmido y stock en glicerol

1. Con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una colonia bacteriana transformada mezclándola en 50 ml de medio LB líquido en presencia de kanamicina, y se incubó a 37°C durante toda la noche en agitación a 250 rpm.
2. Posteriormente, se tomaron 400 µl del medio y se colocaron en un tubo Eppendorf con 400 µl de medio LB líquido y glicerol al 15% estéril, el tubo se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70° C. El resto del cultivo bacteriano en medio líquido se utilizó para la posterior extracción de plásmido a gran escala.

5.6.4.2. Extracción de plásmido a gran escala (midi prep) por lisis alcalina

La extracción a gran escala se realizó basado en el protocolo descrito por Sambrook y Rusell [279]:

1. El cultivo bacteriano fue centrifugado en tubos tipo Falcón de 50 ml y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó por decantación suavemente y los residuos de medio LB líquido se aspiraron con una punta de micropipeta para evitar dejar restos de él.
2. El precipitado bacteriano se resuspendió con ayuda de un vórtex en 200 µl de la solución de lisis alcalina I previamente enfriada a 4°C.
3. Se añadieron 400 µl de la solución de lisis alcalina II (preparada al momento), sellando el tubo correctamente e invirtiéndolo cinco veces para mezclar suavemente el material viscoso (es importante no utilizar el vórtex en este paso).
4. El tubo se incubó en hielo durante 20 min, y se le agregaron 300 µl de la solución de lisis alcalina III, sellando el tubo correctamente e invirtiéndolo cinco veces mezclando suavemente.
5. El tubo se incubó durante 5 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante se recuperó con una punta de micropipeta, el cual se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo, evitando tomar parte del lisado bacteriano.
6. Una vez recuperado el sobrenadante se le añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se mezcló vigorosamente con ayuda de un vórtex, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min a 4°C.
7. La fase superior acuosa se recuperó con ayuda de una punta de micropipeta sin tomar la fase blanquecina perteneciente al desecho celular. Este paso se repitió 3 veces más.

8. Al sobrenadante recuperado se le agregó un volumen igual de isopropanol absoluto y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm a 25°C para evitar la precipitación de sales.
9. Cuidadosamente se retiró el sobrenadante por decantación evitando despegar la pastilla blanquecina formada en fondo del tubo, y posteriormente se colocó invertido durante unos minutos sobre un papel absorbente hasta drenar cualquier residuo de isopropanol que haya permanecido al interior del tubo.
10. Consecutivamente se realizó un lavado con 1.5 ml de etanol al 70%, y el tubo se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 25°C. El sobrenadante se decantó al igual que el paso anterior hasta eliminar los residuos cuidadosamente sin remover a pastilla.
11. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 100 μ l de H₂O mili-Q en presencia de RNasa hasta disolverla por completo.

5.6.5. Caracterización del plásmido AtnCBP-GFP

Una vez que el plásmido AtnCBP-GFP se extrajo masivamente, se caracterizó por diferentes métodos espectroscópicos y de biología molecular para determinar su integridad:

5.6.5.1. Cuantificación por espectroscopia

Se colocó 1 μ l del plásmido AtnCBP-GFP junto con 99 μ l de H₂O mili-Q un tubo Eppendorf nuevo (dilución 1 en 100), la mezcla se colocó en una celda de cuarzo y se determinó la absorbancia a 260/280 nm con el espectrofotómetro. El cálculo de la concentración de DNA plasmídico se realizó de acuerdo con la relación entre absorbancia y concentración para ácidos nucleicos, donde una unidad de absorbancia medida a 260 nm equivale a 50 μ g/ml de dsDNA [279].

5.6.5.2. Digestión enzimática

Se colocaron los siguientes componentes de acuerdo con la Tabla 5.6 en un volumen total de 20 μ l dentro de un tubo Eppendorf en el siguiente orden: 1) H₂O mili-Q estéril; 2) Buffer de reacción Ne-2; 3) DNA plasmídico (AtnCBP-GFP); 4) albúmina de suero bovino (BSA); 5) enzima de restricción EcoRI; y 6) enzima de restricción XbaI. Finalmente, la reacción se incubó durante 16 h a 37 °C, posteriormente se realizó la electroforesis.

	Componente	Cantidad
1	H ₂ O mili-Q estéril	13.5 μ l
2	10X Buffer Ne 2	2 μ l
3	DNA plasmídico (1 μ g/ μ l)	1 μ l
4	BSA (1mg/ml)	2 μ l
5	EcoRI	0.5 μ l
6	XbaI	1 μ l
-	Total	20 μ l

Tabla 5.6. Componentes utilizados para la digestión enzimática del plásmido AtnCBP-GFP.

5.6.5.3. Caracterización por reacción de amplificación por PCR

Para llevar a cabo la caracterización por reacción de PCR, se utilizó un equipo Master Cycler Gradient Eppendorf. Los componentes, ciclos de temperatura y tiempo utilizados para la reacción se muestran en la Tabla 5.7, mientras que el juego de oligos utilizados para amplificar los fragmentos 35S-nCBP, nCBP y GFP a partir del plásmido AtnCBP-GFP se muestran en la Tabla 5.5. Finalmente, se realizó la electroforesis de los productos de PCR.

Componentes	Cantidad	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo
10XTaq Buffer	2 µl	1	94	10 min
25 mM MgCl ₂	4 µl	2	94	15 s
10 µM Oligo Fw	0.5 µl	3	60	30 s
10 µM Oligo Rv	0.5 µl	4	72	1 min
10 mM mix dNTPs	0.5 µl	5	Repetición de ciclos 1-4	35 veces
Taq Polimerasa	0.3 µl	6	72	10min
DNA plasmídico (50 ng/µl)	1 µl	7	4	-
H ₂ O mili-Q estéril	11.2 µl			
Total	20 µl			

Tabla 5.7. Componentes y ciclos de PCR para la amplificación de fragmentos a partir del plásmido AtnCBP-GFP.

5.6.6. Síntesis de DNA marcado fluorescentemente con Alexa Fluor® 555 - NHS

5.6.6.1. Marcaje de DNA con 5-(3-aminoalil)-dUTP

- La síntesis de fragmentos de DNA marcados con 5-(3-aminoalil)-dUTP se realizó siguiendo el protocolo descrito por Invitrogen [280], amplificando por PCR el fragmento nCBP-GFP a partir del plásmido AtnCBP-GFP de acuerdo con los parámetros y condiciones mostrados en la Tabla 5.8.

Componentes	Cantidad	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo
10XTaq Buffer	2 µl	1	94	10 min
25 mM MgCl ₂	4 µl	2	94	15 s
10 µM Oligo Fw	0.5 µl	3	60	30 s
10 µM Oligo Rv	0.5 µl	4	72	1 min
10 mM mix dATP+dGTP+dCTP	0.5 µl	5	Repetición de ciclos 1-4	38 veces
10 mM dTTP	0.3 µl	6	72	10min
2 mM 5-(3-aminoalil)-dUTP	3 µl	7	4	-
Taq Polimerasa	0.3 µl			
DNA plasmídico (20 ng/µl)	1 µl			
H ₂ O mili-Q estéril	7.9 µl			
Total	20 µl			

Tabla 5.8. Componentes y ciclos de PCR para la amplificación de fragmentos fluorescentes.

- El fragmento de DNA marcado con 5-(3-aminoalil)-dUTP fue purificado utilizando el kit de QIAquick® para PCR (QIAGEN), con el cual se eliminó el exceso de 5-(3-aminoalil)-dUTP que no se incorporó durante la reacción. La purificación fue realizada siguiendo las modificaciones recomendadas por Invitrogen [280] basadas en el protocolo descrito por QIAGEN [281]:

1. El producto de PCR (20 μ l) se llevó a un volumen final de 100 μ l con H₂O mili-Q y se le adicionaron 5 volúmenes (500 μ l) del Buffer PBI del kit de purificación QIAquick®. La mezcla se colocó en una columna sobre un tubo colector de 2 ml y se centrifugó durante 1 min a 14000 rpm y se retiró el líquido del tubo recolector.
2. Se adicionaron 0.75 ml de etanol al 75% (sustituyendo al buffer PE de lavado del kit de purificación QIAquick®) a la columna dentro del tubo colector y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min. El líquido de la columna se retiró, y se realizó una segunda centrifugación para eliminar los residuos de etanol.
3. Se agregaron 50 μ l de H₂O (sustituyendo al buffer de elusión EB del kit de purificación QIAquick®) a la columna, y ésta se colocó en un tubo colector nuevo, se dejó reposar durante 5 min y se centrifugó a 14 rpm durante 1 min. Este paso se repitió 2 veces. Finalmente, la solución obtenida en el tubo colector se recuperó y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo.
4. Se adicionaron 0.1 volúmenes (10 μ l) de 3M acetato de potasio (pH 5.2) y 2.5 volúmenes (250 μ l) de etanol absoluto a la solución recuperada y se dejó precipitar a -70 °C durante 30 min.
5. El tubo fue centrifugado a 14000 rpm durante 15 min y se decantó el sobre nadante cuidadosamente para evitar que la pastilla blanquecina que se formó en el fondo del tubo se despegara. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm durante 15 min.
6. El sobrenadante se decantó cuidadosamente para recuperar a pastilla blanquecina, la cual se resuspendió en 5 μ l de DNA.

5.6.6.2. Marcaje de DNA con Alexa Fluor® 555 - NHS

Después de la purificación del fragmento de DNA marcado con 5-(3-aminoalil)-dUTP, se realizó una reacción para marcarlo covalentemente con Alexa Fluor® 555 -NHS. La reacción se llevó a cabo por amidación entre el grupo aminoalil y el grupo N-succinilmidil-éster (NHS) de Alexa Fluor® 555 -NHS de acuerdo con el protocolo descrito por Invitrogen [280, 282]:

1. Se mezclaron 5 μ l del fragmento marcado con 5-(3-aminoalil)-dUTP con 3 μ l de buffer de marcaje fluorescente, y 2 μ l de Alexa Fluor® 555 -NHS (30 μ g) disuelto en MSO. La mezcla se agitó vigorosamente con el vórtex y la reacción se incubó a 25°C en oscuridad durante 1 h.
2. Posteriormente, se adicionaron 80 μ l de H₂O mili-Q estéril y 10 μ l de 3M acetato de potasio (pH 5.2) para precipitar el fragmento marcado con Alexa Fluor® 555 -NHS.
3. Para eliminar los restos de Alexa Fluor® 555 -NHS que no reaccionaron se llevó a cabo la purificación del fragmento siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.6.6.1.
4. El fragmento purificado se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se guardó a -20°C en oscuridad para evitar el contacto con la luz.

5.6.7. Funcionalización de MWCNTs con DNA plasmídico

Se realizó una prueba para la funcionalización no covalente de MWCNTs con el plásmido AtnCBP-GFP variando la concentración, el pH y el tiempo de incubación, para determinar los parámetros más adecuados:

1. Se colocaron 50 μ g de MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminos en presencia de diferentes cantidades de plásmido (2, 4 y 8 μ g) en un volumen final de 20 μ l con H₂O mili-Q, y se incubó durante 1 h a 25°C.

2. Se realizaron dos tratamientos colocando 50 μg de MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas en presencia de diferentes cantidades del plásmido (2, 4 y 8 μg) en un volumen final de 20 μl con H_2O mili-Q, el primer tratamiento se incubó durante 1 min, mientras que el segundo se incubó durante 16 h.
3. Se colocaron 4 μg de plásmido en presencia de 50 μg de MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas en un volumen total de 20 μl H_2O mili-Q, variando el pH (3.5, 4.5, 6.5 y 7.5).
4. Posteriormente, cada una de las muestras se centrifugó a 12000 rpm a 4°C, el sobrenadante se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo para ser visualizado a través de un gel de agarosa.

5.6.8. Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos

1. Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en presencia de buffer TBE 5X, utilizando equipo de electroforesis Bio-Rad Mini-sub cell GT cell operado a 80 V.
2. Se utilizaron 3 μl de un marcador de peso molecular para dsDNA de 100 pb (Invitrogen).
3. El gel se visualizó a través de un transiluminador y la imagen digital se obtuvo con un equipo Kodak Image Station 440CF utilizando un filtro de 595 nm y el software Carestream Molecular Imaging.

5.6.9. Prueba de transformación genética de células en suspensión con CNTs

5.6.9.1. Prueba de transformación genética en células en suspensión con MWCNTs funcionalizados con DNA plasmídico

1. Los MWCNTs esterilizaron al vacío durante 24 h antes de ser funcionalizados con DNA plasmídico y los siguientes procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas para evitar la contaminación de los cultivos celulares.
2. Se realizó la funcionalización no covalente por interacción hidrofóbica de MWCNTs prístinos y MWCNTs-ODA (50 μg de cada uno) con el plásmido AtnCBP-GFP (4 μg) en un volumen final de 20 μl en H_2O mili-Q estéril, y la solución se incubó durante 1 h a 25°C.
3. Se realizó la funcionalización no covalente por interacciones electrostáticas de MWCNTs-DO, MWCNTs-PEGDA y MWCNTs-PEI (50 μg de cada uno) con el plásmido AtnCBP-GFP (4 μg) en un volumen final de 20 μl en H_2O mili-Q estéril, y la solución se incubó durante 1 h a 25°C.
4. Posteriormente, se realizó un tratamiento colocando cada solución por separado en 1 ml de suspensión celular de NT-X en placas para ELISA estériles, y se incubaron a 25°C durante 24 y 48 h en agitación orbital (130 rpm).
5. Finalmente, las muestras fueron observadas al microscopio confocal.

5.6.9.2. Prueba de transformación genética en células en suspensión con MWCNTs funcionalizados con DNA marcado con Alexa Fluor® 555 - NHS

1. Se realizó la funcionalización no covalente por interacción hidrofóbica de MWCNTs prístinos y MWCNTs-ODA (50 μg de cada uno) con el fragmento de DNA marcado con Alexa Fluor® 555 -NHS (1 μg) en un volumen final de 20 μl en H_2O mili-Q.

2. Se realizó la funcionalización no covalente por interacciones electrostáticas de MWCNTs-DO, MWCNTs-PEGDA y MWCNTs-PEI (50 μg de cada uno) con Alexa Fluor® 555 –NHS (1 μg) en un volumen final de 20 μl en H_2O mili-Q.
3. Posteriormente, se realizó un tratamiento colocando cada solución por separado en 1 ml de la suspensión de la línea celular NT-1 en placas para ELISA, y se incubaron a 25°C durante 24 y 48 h en agitación orbital (130 rpm).
4. Las muestras fueron observadas al microscopio confocal.

5.6.9.3. Microscopia confocal

1. Para observar las muestras se utilizó un microscopio invertido Confocal Olympus IX81, realizando cortes en el eje Z, y utilizando los siguientes parámetros de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) para cada fluoróforo: GFP (λ_{ex} 498 nm; λ_{em} 509 nm); Alexa Fluor® 555-NHS (λ_{ex} 553 nm; λ_{em} 568 nm).
2. Las micrografías de las muestras se procesaron con el software FV10-ASW 1.7 Viewer.

5.6.10. Prueba de biocompatibilidad

1. Los MWCNTs esterilizaron al vacío durante 24 h y los siguientes procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas para evitar la contaminación de los cultivos celulares.
2. Se preparó una solución de MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas (50 μg de cada uno) en 20 μl en H_2O mili-Q estéril, y se incubaron durante 1 h a 25°C.
3. Posteriormente, las soluciones se colocaron por separado en presencia de 1 ml de suspensión de la línea celular NT-1 en placas para ELISA estériles, incubándolas a 25°C durante 48 h en agitación orbital (130 rpm).
4. Las muestras fueron teñidas con 50 μl azul de Evans al 5% durante 1 h, y se observaron al microscopio óptico.
5. En cada tratamiento, la proporción de células plasmolizadas (teñidas en azul) e intactas (no teñidas) obtenidas a partir de una población de 2000 células se analizó a través del estadístico de prueba χ^2 , y se realizó una tabla de contingencia de 2x2 con grados de libertad =1 y una $\alpha = 0.05$ utilizando el software GraphPad Prism ver. 5.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación de plantas con MWCNTs

6.1. Obtención y caracterización de MWCNTs funcionalizados con aminas alifáticas

El primer procedimiento realizado fue la obtención de MWCNTs funcionalizados con aminas alifáticas por el método de “funcionalización covalente, libre de solventes, para superficies con defectos” (Materiales y métodos sección —5.2.1.), con el propósito de utilizarlos para transportar e introducir ácidos nucleicos al interior de células de plantas en suspensión. Una vez obtenidos, los MWCNTs funcionalizados con aminas alifáticas fueron caracterizados a través de diferentes métodos de espectroscopia, termogravimetría, microscopia electrónica y de fuerza atómica (Materiales y métodos sección A—5.2.3).

6.1.1. Espectroscopia Raman

Para determinar que la muestra de MWCNTs prístinos proporcionada por Nanostructured & Amorphous Materials está compuesta realmente por MWCNTs, se le realizó una prueba por espectroscopia Raman (Materiales y métodos

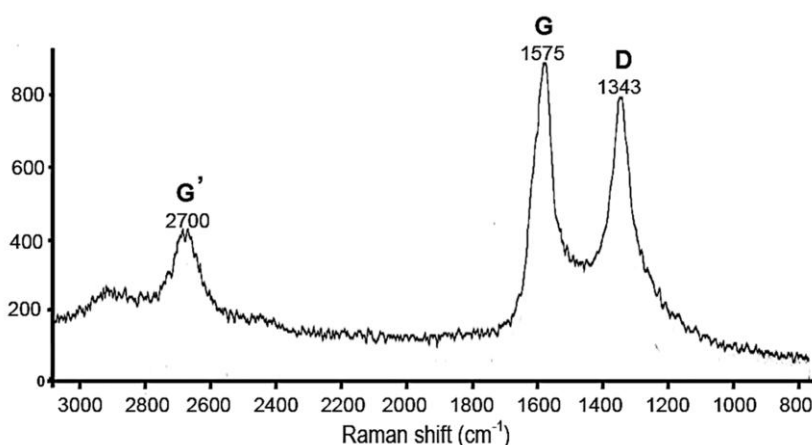


Figura 6.1. Espectro Raman obtenido para MWCNTs prístinos.

sección A—5.2.3.1). El espectro Raman de los MWCNTs prístinos exhibe tres bandas típicas de un MWCNT prístino (Figura 6.1). La primera banda se localiza a 1343 cm^{-1} y corresponde a la “banda D” o “banda de desorden inducido”, la cual está relacionada con el diámetro, la quiliaridad y la presencia de defectos en la pared de los MWCNTs. La segunda banda se localiza a 1575 cm^{-1} y corresponde a la “banda G” o “banda tangencial”, la cual proporciona información acerca del carácter metálico o semiconductor.

Una observación interesante es la relación equiparable entre la “banda D” y “la banda G”, ya que es un reflejo de la gran cantidad de defectos presentes en la pared de los MWCNTs prístino [283, 284]s, lo cual es deseable para que se dé la unión covalente a las aminas alifáticas durante su funcionalización. Una tercera banda bifurcada se observa a 2700 cm^{-1} , y corresponde a la “banda G” o “sobretono D”, la cual también se relaciona con la simetría y con el diámetro de los MWCNTs [283, 284].

6.1.2. Prueba de solubilidad y dispersabilidad

Para determinar si a funcionalización produjo un cambio en la solubilidad de los MWCNTs se realizó una prueba de solubilidad y dispersabilidad en agua e isopropanol (Materiales y métodos sección A—5.2.3.2). En un principio los

MWCNTs prístinos se dispersaron fácilmente tanto en agua como en isopropanol, pero al paso de unas horas se precipitaron rápidamente (Figura 6.2). Es bien sabido los CNTs son poco solubles en agua porque sus paredes son altamente hidrofóbicas, y que su dispersabilidad depende por un lado de la capacidad para formar agregados o cúmulos y por otro lado de las dimensiones que éstos posean; es decir, aquellos CNTs con mayores diámetros y longitudes serán mucho menos dispersables que aquellos que posean menores dimensiones [43, 60-62]. De acuerdo con el proveedor (Nanostructured & Amorphous Materials), los MWCNTs prístinos utilizados en el presente estudio son CNTs cortos con diámetro que oscila entre los 10–20 nm, y con una longitud que varía entre los 0.5 y 2 μm ; es por eso que a pesar de su hidrofobicidad son altamente dispersables.

Un comportamiento muy similar al de los MWCNTs prístinos se observó en la prueba de solubilidad y dispersabilidad para MWCNTs-ODA. En un principio los MWCNTs-ODA presentaron una alta dispersabilidad, y al paso de unas horas se precipitaron rápidamente (Figura 6.2). Debido a que el único grupo amino que posee la amina ODA se encuentra unido covalentemente a la pared del MWCNT, la cadena alifática queda expuesta hacia el exterior y por su carácter hidrofóbico no interactúa con el medio acuoso (Figura 6.3). Por tales motivos, la funcionalización con ODA no produce cambios significativos en la solubilidad de los MWCNTs [71].

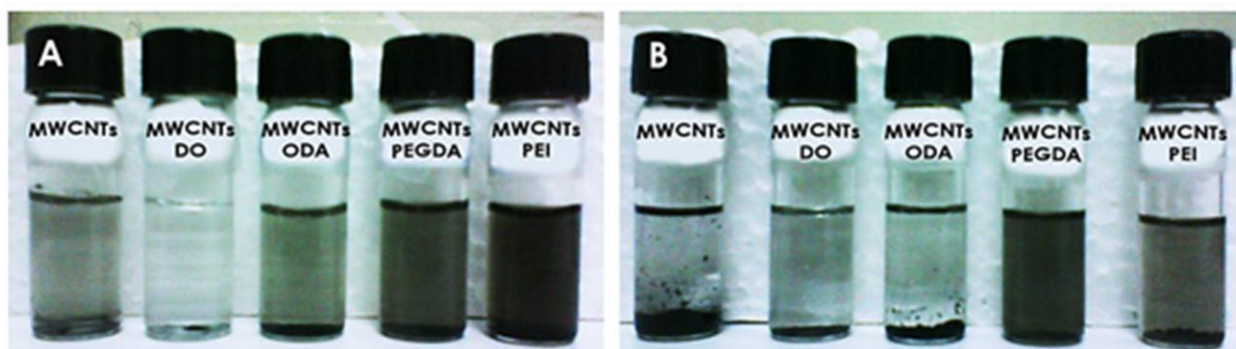


Figura 6.2. Prueba de solubilidad en agua (A) e isopropanol (B) incubados durante 48 h para MWCNTs prístinos (MWCNTs) y MWCNTs funcionalizados con aminas.

Interesantemente, los MWCNTs-DO mostraron la menor solubilidad y dispersabilidad en agua y en isopropanol (Figura 6.2). La amina 1,8-diamooctano es una amina alifática de cadena larga que posee un grupo amino en cada extremo, los cuales son capaces de unirse durante la funcionalización a dos sitios con defectos diferentes localizados en la pared de un mismo MWCNT o a dos diferentes MWCNTs al mismo tiempo, interconectándolos y formando un gran número de agregados que disminuyen considerablemente su dispersabilidad y solubilidad (Figura 6.3). Chiu y colaboradores funcionalizaron covalentemente SWCNTs con la amina tetrapropileno-tetramina, y observaron una drástica disminución en la solubilidad y dispersabilidad tanto en agua como en acetona, lo cual se asoció con el aumento en la formación de cúmulos, por la formación de interconexiones entre SWCNTs individuales a través de la amina tetrapropileno-tetramina [285].

A diferencia de lo observado anteriormente, los MWCNTs funcionalizados con las aminas poliméricas PEGDA y PEI mostraron la mayor dispersabilidad y solubilidad tanto en agua como en isopropanol durante más de 48 h (Figura 6.2), ya que poseen una gran cantidad de grupos amino capaces de interactuar con el medio acuoso (Figura 6.3), aumentando la solubilidad de los MWCNTs. Existen muchos estudios relacionados con la funcionalización de CNTs con aminas poliméricas tales como PEGDA [102, 107, 110, 124, 286-288] y PEI [105, 106, 270, 289, 290], los cuales reportan un incremento considerable en la solubilidad de los CNTs después de la funcionalización.

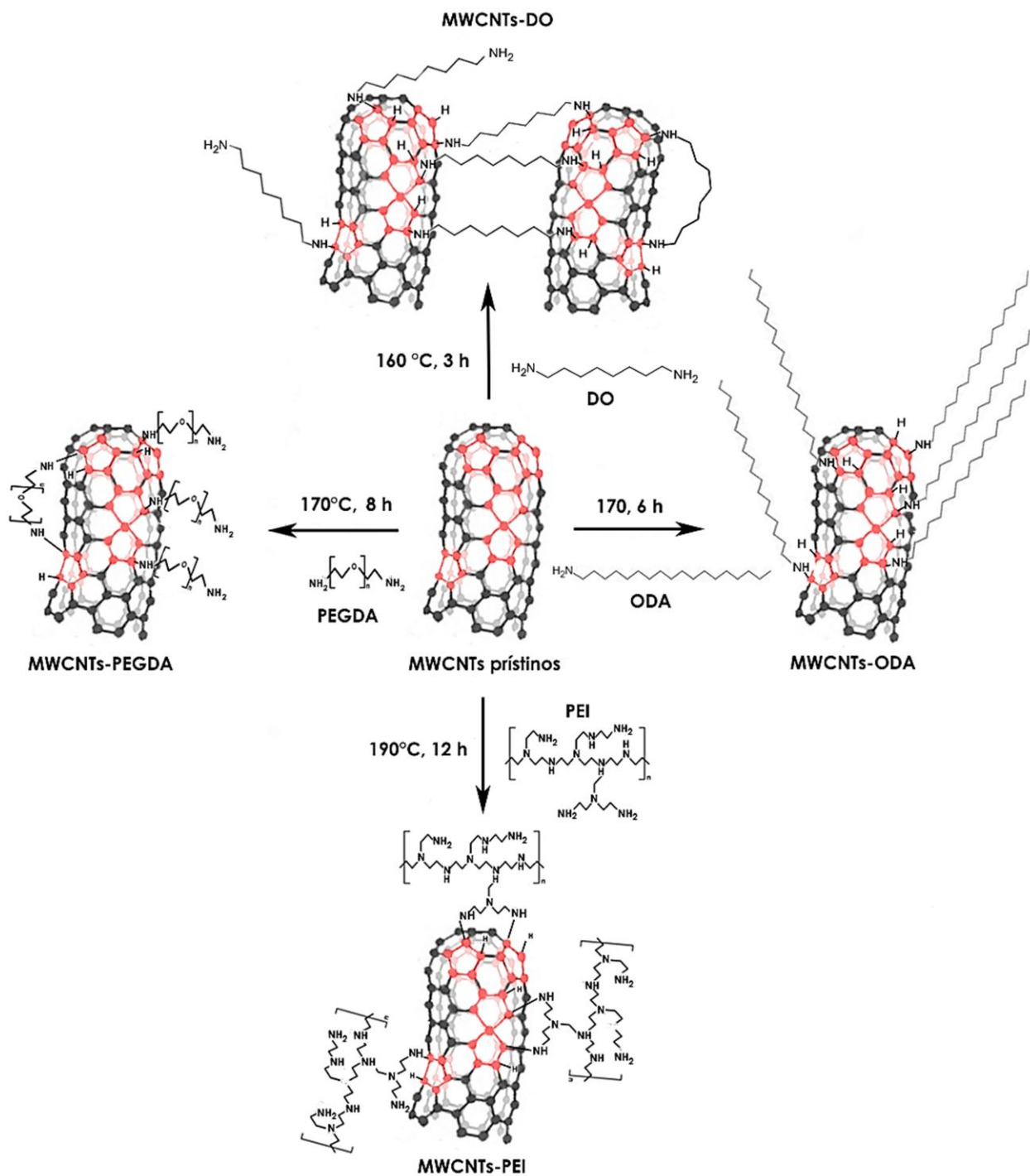


Figura 6.3. Esquema de los MWCNTs funcionalizados por el método de “funcionalización covalente libre de solventes de los defectos de la superficie” en fase de gas con las aminas ODA y DO, y en fase de fusión con las aminas PEGDA y PEI.

6.1.3. Espectroscopia en el Infrarrojo (FT-IR)

Se realizó un análisis por espectroscopia en el Infrarrojo (FT-IR) para corroborar la presencia de las aminas alifáticas en la muestra de que los MWCNTs funcionalizados, a través de la detección de las vibraciones de los enlaces que componen a sus grupos funcionales (Materiales y métodos sección A—5.2.3.3).

Los espectros FT-IR obtenidos para cada una de las muestras de MWCNTs funcionalizados presentan un conjunto de bandas pertenecientes a los grupos funcionales que caracterizan a las aminas alifáticas utilizadas para a funcionalización (Figura 6.4), los cuales concuerdan con los espectros reportados en la literatura y en las bases de datos [85, 105, 289, 291-294]. En el espectro FT-IR perteneciente a la muestra de MWCNTs prístinos estas bandas están ausentes, indicando que no han sufrido ningún tipo de funcionalización o modificación química.

Las bandas pertenecientes a las muestras de MWCNTs funcionalizados con aminas pueden agruparse en cuatro regiones principales: la región localizada en el intervalo de 2820-3000 cm^{-1} que corresponde a vibraciones de estiramientos entre enlaces C-H de las cadenas alifáticas; la región II localizada a 1570-1670 cm^{-1} perteneciente a vibraciones de flexión entre enlaces N-H de los grupos amino; la región III a 1350-1570 cm^{-1} perteneciente a vibraciones de flexión entre enlaces C-H; y la región IV de 1030–1350 cm^{-1} originada por vibraciones de estiramientos de enlaces C-N.

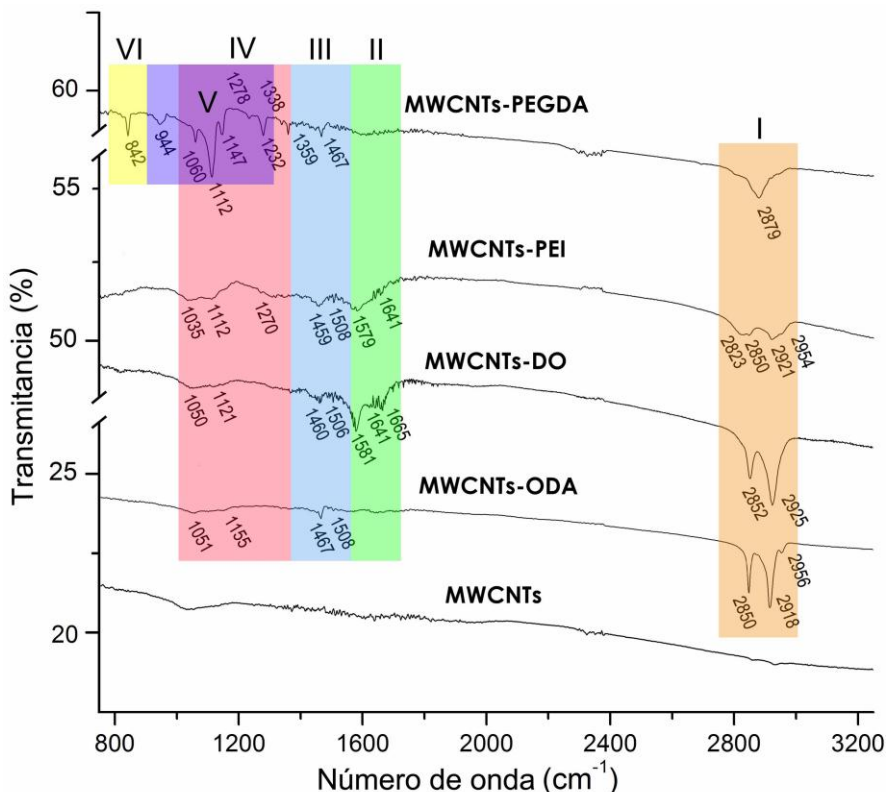


Figura 6.4. Bandas pertenecientes a las vibraciones de los grupos funcionales agrupadas en 6 regiones obtenidas a partir de los espectros FT-IR para MWCNT-prístinos y funcionalizados con aminas alifáticas.

Particularmente en el espectro FT-IR perteneciente a los MWCNTs-PEGDA se puede observar una región V a 940-1280 cm^{-1} que se sobrepone con la región IV, y que se origina a partir de las vibraciones de estiramiento entre los enlaces C-O del puente éter de la unidad etilenglicol. Asimismo, dentro de dicho espectro se puede observar una región VI a 842 cm^{-1} que es típica de las vibraciones de aleteo de los enlaces N-H de los grupos amino.

Estos resultados sugieren que el cambio en la dispersabilidad y solubilidad (Resultados y discusión 6.1.2) puede deberse en parte a la presencia de aminas alifáticas en las muestras de MWCNTs; sin embargo, no proporciona información suficiente para determinar si las aminas se encuentran unidas covalentemente a la superficie de los MWCNTs, ni su proporción total.

6.1.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) de las muestras de MWCNTs funcionalizados se realizó con la finalidad determinar qué porcentaje de las muestras pertenece a las aminas unidas covalentemente a los MWCNTs, y así determinar la eficiencia de la funcionalización. Lo anterior se realizó exponiendo a los MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas a un gradiente de temperatura de 0 a 1000°C, a partir de lo cual se determinó la pérdida de peso

en cada intervalo de temperatura (Materiales y métodos sección A–5.2.3.4), y se obtuvo un termograma (Figura 6.5). El termograma de los MWCNTs prístinos presenta un típico patrón uniforme de pérdida de peso [295], que se observa una drástica disminución en el peso de la muestra en un intervalo de temperatura de 350°C a 650°C; en esta fase

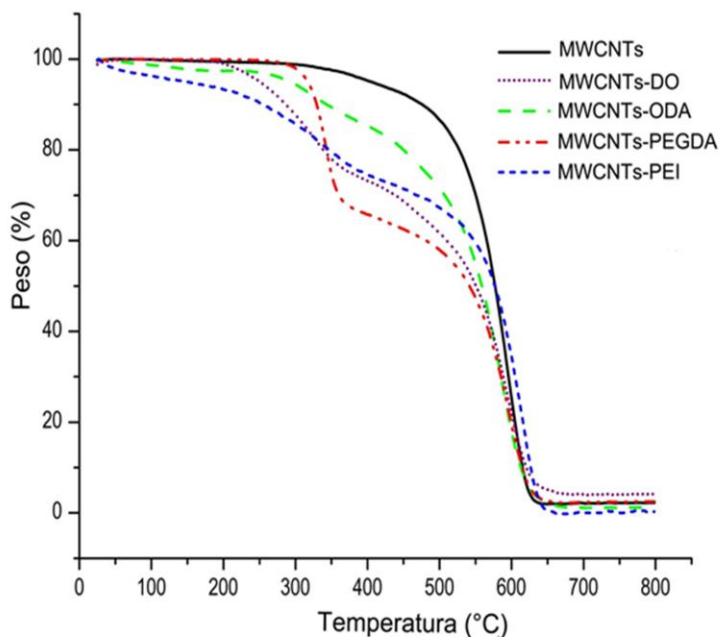


Figura 6.5. Termograma perteneciente a MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas alifáticas.

temperatura de 250- 400 °C encontramos una segunda fase de pérdida de peso que oscila entre el 10 y 20 % del total de la muestra. Esta fase se asocia fuertemente con la pérdida de las aminas alifáticas que se encontraban unidas covalentemente a las paredes de los MWCNTs, debido a que esta fase se encuentra en un intervalo temperatura que excede el punto de ebullición de ambas aminas, ya que se necesita una gran cantidad de energía para romper los enlaces formados entre los grupos amino y los átomos de carbono de las paredes [43, 72, 81].

Por otro lado, en los termogramas pertenecientes a MWCNTs-PEI y MWCNTs-PEGDA, la primera fase de pérdida de peso se localiza antes de los 220°C, y corresponde al 4% del total de la muestra (Figura 6.5); sin embargo, debido a su naturaleza polimérica e higroscópica, esta fase no puede ser asociada a la pérdida de aminas adsorbidas físicamente, ya que carecen de una fase gaseosa, pero sí pueden ser asociadas a la pérdida de humedad. La siguiente fase, muestra una pérdida del 20-30% del total de la muestra que se alcanza en el intervalo de 220-360 °C, en la cual es prácticamente imposible determinar qué cantidad de la muestra corresponde a PEGDA y PEI adsorbidas físicamente y qué cantidad de la muestra corresponde a PEGDA y PEI unidas covalentemente a las paredes de los MWCNTs. Estas observaciones concuerdan con los estudios realizados por Lin [290], y Sano [297], en los cuales se explica que este fenómeno ocurre porque las aminas poliméricas tienden a adherirse fuertemente entre sí durante la funcionalización por su naturaleza pegajosa, y que a pesar de que se realicen intensos lavados para purificar las muestras, siempre quedan residuos adheridos.

Finalmente, en el termograma se puede observar que para todos los tipos de MWCNTs funcionalizados con aminas se presenta una tercera fase en el intervalo de temperatura de 350-650°C (Figura 6.5), la cual que corresponde a la pérdida total del resto de la muestra; es decir a los MWCNTs sin aminas alifáticas.

la muestra de MWCNTs prístinos se pierde por completo debido a la combustión.

Al observar el termograma de los MWCNTs funcionalizados con aminas alifáticas se puede observar un patrón de pérdida de peso muy irregular (Figura 6.5). Por ejemplo, el termograma perteneciente a los MWCNTs funcionalizados con aminas volátiles (ODA y DO), presenta en un principio una fase de pérdida de peso que oscila entre el 2 y 4% antes de los 250°C. Generalmente en esta fase se pierde lo que no se encuentra unido covalentemente, ya sea la humedad o las aminas adsorbidas físicamente. El intervalo de temperatura anterior coincide con los puntos de ebullición del agua (100°C) y los puntos de ebullición de las aminas ODA y DO (230°C y 240°C; respectivamente) [296]. Posteriormente, dentro del rango de

6.1.5. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Una vez determinado el porcentaje que corresponde a las aminas alifáticas de las muestras de MWCNTs funcionalizados, se analizó la topología a escala micrométrica de cada una de las muestras por microscopia electrónica de barrido o SEM (Materiales y métodos sección A—5.2.3.5). Los cúmulos de MWCNTs prístinos (Figura 6.6—A), MWCNTs-ODA (Figura 6.6—B) y MWCNTs-DO (Figura 6.6—C) presentan una topología típica y granular constituida por una masa densa de MWCNTs individuales empaquetados que en algunos casos se pueden apreciar sobresaliendo de las periferias.

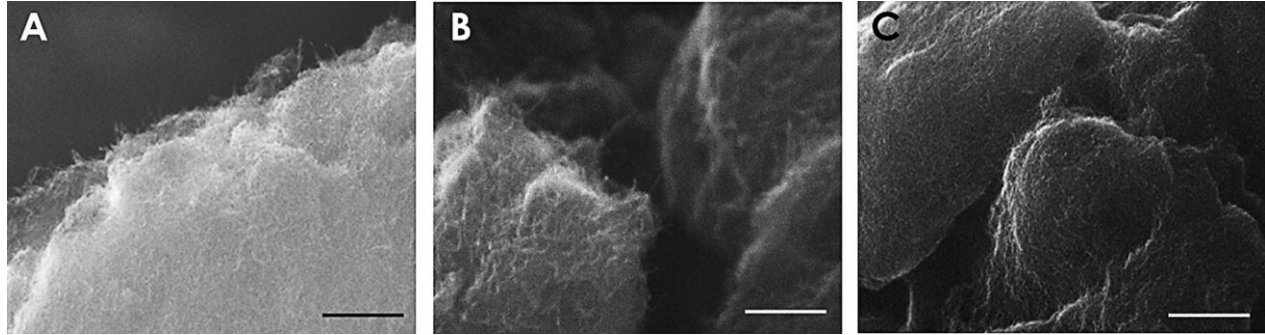


Figura 6.6. Micrografías SEM obtenidas para las muestras de MWCNTs prístinos (A), MWCNTs-ODA (B) y MWCNTs-DO (C). Barra de escala = 1 µm.

En contraste, la topología observada en los cúmulos de MWCNTs funcionalizados con PEGDA (Figura 6.7—A) y PEI (Figura 6.7—B) es la de una superficie lisa y homogénea, en la cual no es posible observar MWCNTs individuales debido a la existencia de una densa capa que los recubre, probablemente formada por las aminas poliméricas PEGDA y PEI.

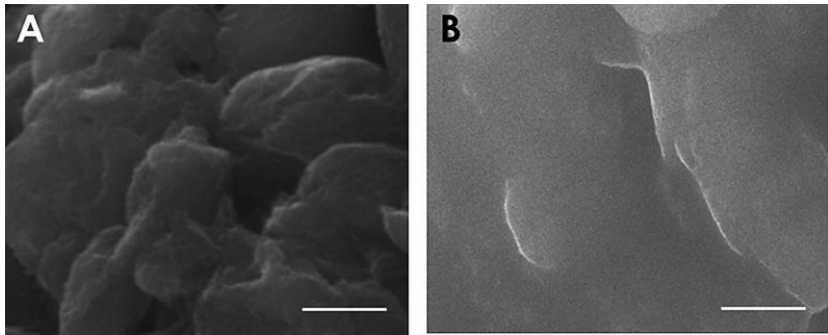


Figura 6.7. Micrografías SEM obtenidas para las muestras de MWCNTs-PEGDA (A) y MWCNTs-PEI (B). Barra de escala = 1 µm.

6.1.6. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

Para obtener más detalle sobre la topología de los MWCNTs con una mayor resolución a escala nanométrica, se realizó un análisis por microscopia de fuerza atómica o AFM (Materiales y métodos sección A—5.2.3.6). En las mi-

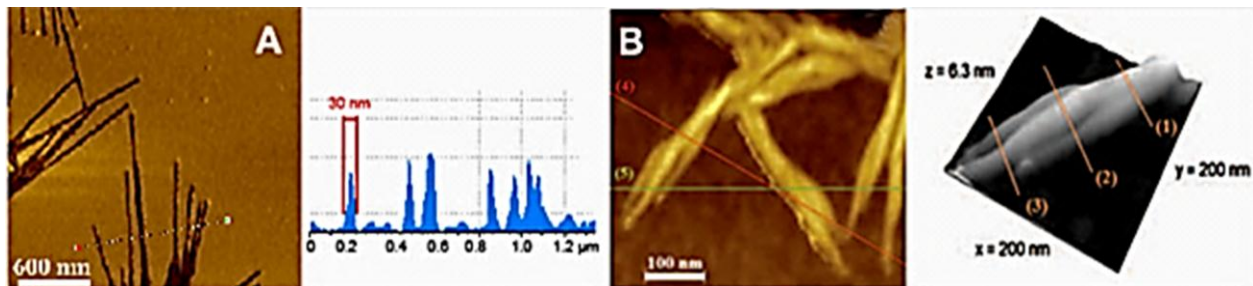


Figura 6.8. Micrografías AFM de los MWCNTs prístinos individuales (A) con su respectivo perfil topográfico bidimensional a la derecha, y de los cúmulos (B) formados por interacciones de tipo Van der Waals con su respectivo perfil topográfico tridimensional a la derecha.

crografías AFM de los MWCNTs prístinos se observan claramente MWCNTs individuales, que de acuerdo con el perfil topográfico presentan diámetros cercanos a los 30 nm y longitudes cercanas a los 400 nm (Figura 6.8—A). Asimismo, se puede observar un conjunto de MWCNTs empaquetados que forman unos cuantos cúmulos a través de interacciones tipo Van der Waals (Figura 6.8—B).

Por otro lado, las micrografías AFM obtenidas para de los MWCNTs-ODA (Figura 6.9—A) muestran algunos MWCNTs individuales que presentan un espeso recubrimiento amorfo localizado principalmente en las paredes. Es muy probable que este recubrimiento esté formado por las cadenas alifáticas de ODA, que se encuentran unidas covalentemente a la pared de los MWCNTs (Figura 6.3). En la micrografía también se observan algunos MWCNTs-ODA unidos entre sí muy probablemente por interacciones hidrofóbicas y no por una unión covalente, ya que la zona de contacto es claramente la espesa capa formada por las cadenas alifáticas (Figura 6.9—A). Lo anterior concuerda perfectamente con las pruebas de solubilidad y dispersabilidad realizadas para MWCNTs-ODA (Figura 6.2), los cuales presentaron una baja solubilidad en agua por su alta hidrofobicidad.

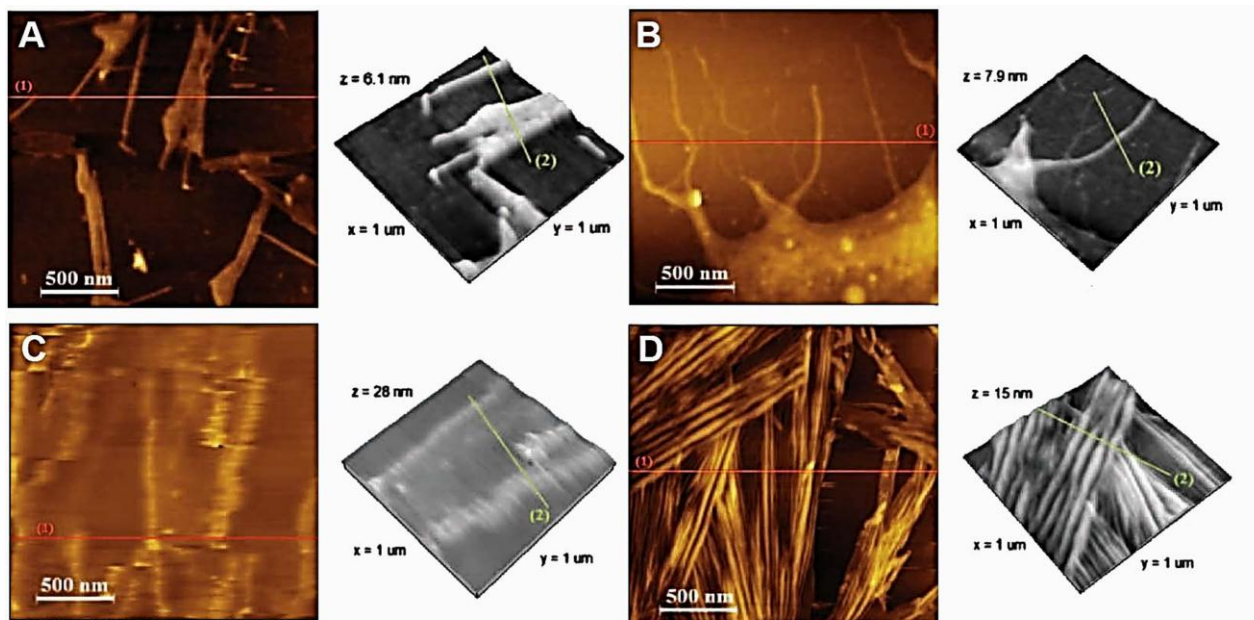


Figura 6.9. Micrografías AFM de MWCNTs funcionalizados con aminas y su respectivo perfil topográfico a su derecha: MWCNTs-ODA (A), MWCNTs-DO (B), MWCNTs-PEGDA (C), MWCNTs-PEI (D).

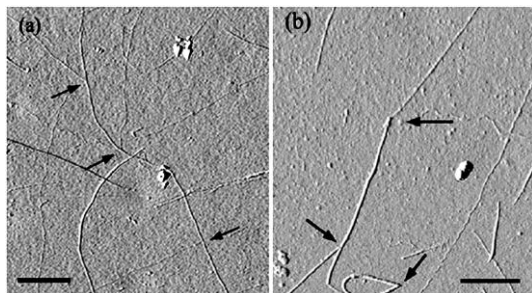


Figura 6.10. Micrografías AFM obtenidas por Chiu y colaboradores (a y b), en donde se muestra la interconexión de SWCNTs a través de la funcionalización covalente con tetrapropileno-tetramina [285].

De acuerdo con las pruebas de solubilidad, los MWCNTs-DO poseen la solubilidad más baja de todos los MWCNTs funcionalizados (Figura 6.2). Por su parte, las micrografías AFM (Figura 6.9-B) revelan que los MWCNTs-DO forman interconexiones entre sí (Figura 6.3), las cuales pueden formarse entre dos o más MWCNTs formando largas cadenas ramificadas que llegan a medir hasta unas cuantas micras de largo (1–1.5 μm). Estos resultados son similares a los estudios realizados por Chiu y colaboradores [285], cuyas observaciones a través de AFM revelan que los SWCNTs funcionalizados con tetrapropileno-tetramina forman largas ramificaciones que llegan a medir hasta 4 μm de longitud (Figura 6.10— a y b).

La micrografía topológica de MWCNTs-PEGDA obtenida a través de AFM muestra una imagen un poco distorsionada (Figura 6.9—C), lo que es muy común cuando la punta de un microscopio AFM hace contacto con una superficie muy suave y espesa. Es probable que esta suave superficie en realidad sea aquel recubrimiento polimérico observado por microscopía SEM (Figura 6.7—A), y debido a su naturaleza pegajosa interfiere con el escaneo de la imagen y la punta para AFM tiende a estancarse reiteradamente. Sin embargo, en la micrografía (Figura 6.9—C) se puede observar un conjunto de MWCNTs-PEGDA unidos entre sí a través de la fase polimérica, cuyas dimensiones no pueden ser determinadas fácilmente debido a la interferencia. Un patrón topológico similar al de MWCNTs-PEGDA se observó para MWCNTs-PEI (Figura 6.9—D), ya que se encuentran recubiertos por una espesa fase polimérica que permite el empaquetamiento de decenas de MWCNTs-PEGDA individuales formando grandes cúmulos.

Sin embargo, existen evidencias para determinar que a diferencia de las interconexiones covalentes formadas entre MWCNTs-DO, las uniones entre MWCNTs funcionalizados con aminas poliméricas no son de tipo covalente, y más bien se adhieren unos con otros por la naturaleza pegajosa de PEGDA y PEI. Una de estas evidencias es que tanto los MWCNTs-PEGDA como los MWCNTs-PEI son altamente solubles y dispersables en agua, manteniéndose estables por más de 48 h (Figura 6.2—A), por lo que las uniones que existen entre MWCNTs individuales son muy débiles permitiendo que los cúmulos se rompan fácilmente en solución. Otra de las evidencias se encuentra en un estudio realizado por Zhang y colaboradores [295], en el cual demuestran que cuando una amina polimérica forma interconexiones entre dos o más MWCNTs, éstos disminuyen drásticamente su solubilidad y dispersabilidad en agua y en medios orgánicos, formando un gran número de cúmulos que se precipitan casi inmediatamente al entrar en contacto con el medio acuoso.

6.1.7. Microscopía Electrónica de Transmisión

Finalmente, para obtener información más detallada acerca de la morfología y de las dimensiones de los MWCNTs funcionalizados con aminas se realizó un análisis por microscopía electrónica de transmisión o TEM (Materiales y métodos sección A—5.2.3.7). Las micrografías TEM mostradas en la Figura 6.11, muestran MWCNTs prístinos individuales con extremos cerrados (señalados con flechas negras) que poseen longitudes cercanas a los 500 nm (Figura 6.11—B). En dicha micrografía se pueden apreciar las paredes múltiples de un MWCNTs individual (círculos negros), el cual presenta una gran cantidad de defectos que ondulan la superficie de las paredes (Figura 6.11—C), lo cual concuerda con lo deducido a partir del espectro Raman (Resultados y discusión 6.1.1).

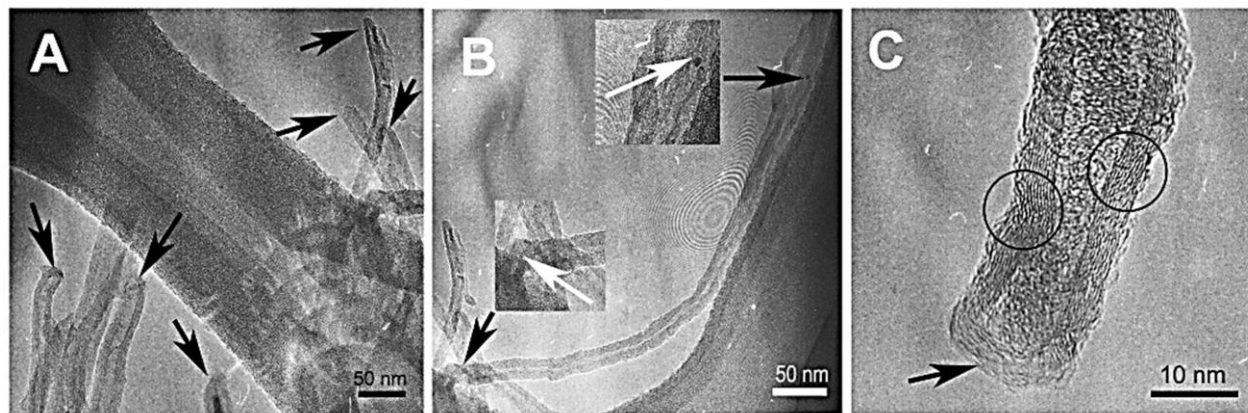


Figura 6.11. Micrografías TEM obtenidas para MWCNTs prístinos: A) MWCNTs individuales con extremos cerrados (flechas negras); B) un MWCNT con una longitud aproximada de 400 nm con sus extremos cerrados visibles (flechas negras) y ampliificados (flechas blancas); C) las paredes múltiples y onduladas de un MWCNTs (círculos negros) con su extremo cerrado (flechas negra).

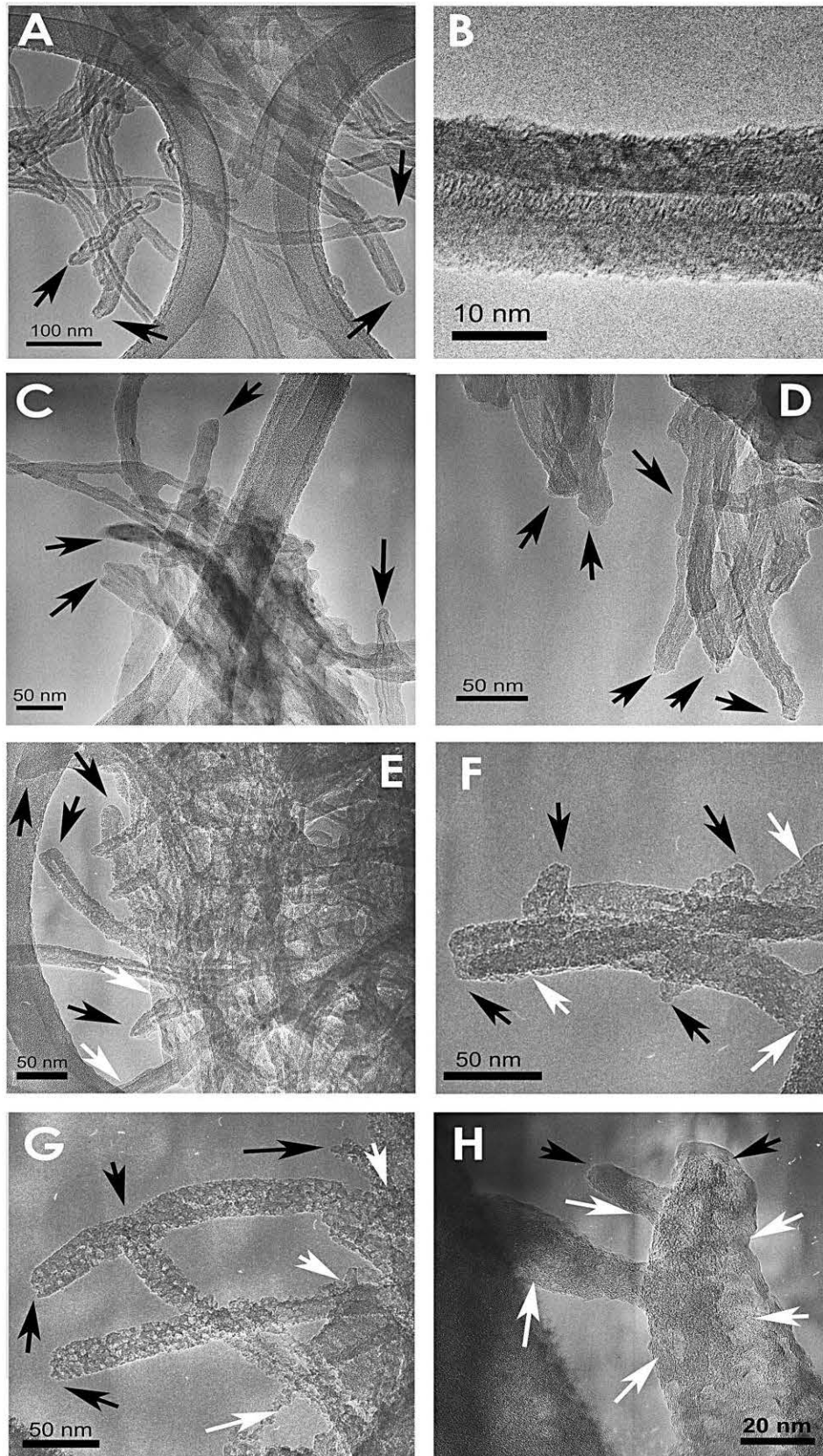


Figura 6.12. Micrografías TEM obtenidas para MWCNTs funcionalizados con aminas alifáticas: MWCNTs-ODA (A y B); MWCNTs-DO (C y D); MWCNTs-PEGDA (E y F); y MWCNTs-PEI (G y H). Las flechas negras señalan los extremos cerrados de los MWCNTs, mientras que la fechas blancas señalan las fases poliméricas.

La morfología de los MWCNTs-ODA (Figura 6.12—A y B) es muy similar a la morfología que presentan los MWCNTs prístinos, luciendo paredes múltiples y extremos cerrados (flechas negras) con una longitud cercana a los 500 nm. En las micrografías TEM para MWCNTs-ODA es difícil apreciar la capa de cadenas alifáticas observada a detalle en la pared exterior por microscopía AFM (Figura 6.9—A), y sólo se observa los restos de un fino recubrimiento opaco sobre la superficie del MWCNT (Figura 6.12—B). A diferencia de la microscopía AFM, la microscopía TEM utiliza un láser de electrones que irradia a la muestra durante la obtención de la imagen, el cual pudo haber quemado o derretido la fina capa de cadenas alifáticas presente en la superficie de los MWCNTs.

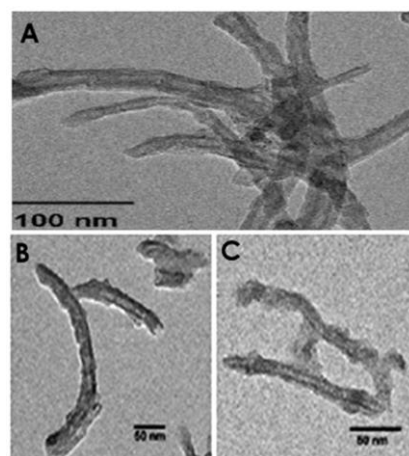


Figura 6.13. Diferentes micrografías (A-D) TEM obtenidas por Zhang que muestran la interconexión covalente de los MWCNTs [295].

Por otro lado, las micrografías AFM sugieren que los MWCNT-DO se encuentran interconectados entre sí covalentemente (Figura 6.9-B); esta interconexión puede apreciarse también en las micrografías TEM (Figura 6.12-C), en la cuales se aprecian un grupo de MWCNTs-DO interconectados entre sí formando una estructura en forma de racimo. Asimismo, en la Figura 6.12-D se observa un conjunto de MWCNTs-DO interconectados formando una ramificada de más de 1 μm de longitud, tal y como se observó por AFM (Figura 6.9-B). Zhang y colaboradores demostraron a través de microscopía TEM la interconexión covalente entre MWCNTs funcionalizados con poliaminas [295]; de hecho sus micrografías (Figura 6.13) muestran una serie de MWCNTs interconectados entre sí formando estructuras ramificadas muy similares a las de la Figura 6.12—C.

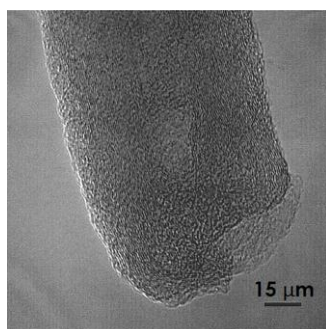


Figura 6.14. Micrografía TEM para MWCNTs funcionalizados con PEI obtenida por Lin y colaboradores, donde se aprecia una fase polimérica sobre la superficie del CNT que aumenta drásticamente su diámetro [290].

Los MWCNTs funcionalizados con aminas poliméricas (PEGDA y PEI) presentan un recubrimiento amorfo y espeso sobre la superficie de sus paredes (Figuras 6.12-E-H), el cual fue observado también por microscopía AFM (Figura 6.9-C y D). Este recubrimiento posee un espesor que oscila entre los 5 – 10 nm (Figuras 6.12—E - H), ya que en algunas zonas es mucho más abundante que en otras (señalado por flechas blancas). Este tipo de recubrimiento polimérico ha sido observado en otros estudios a través de microscopía TEM, utilizando MWCNTs funcionalizados con PEI [290] (Figura 6.14), y MWCNTs funcionalizados con Nylon-6 (Figura 6.15) [85].

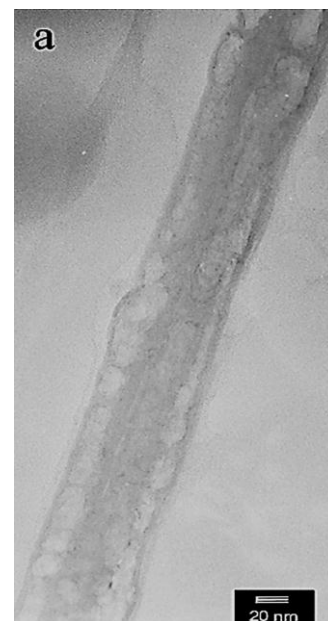


Figura 6.15. Micrografía TEM de un MWCNT recubierto por una fase polimérica constituida por Nylon-6 obtenida por Basiuk y colaboradores [85].

Finalmente, en las micrografías (Figuras 6.12—E-H), se puede observar que muchos de los MWCNTs funcionalizados con PEGDA y PEI se encuentran adheridos unos con otros debido a la naturaleza viscosa del recubrimiento polimérico, y no necesariamente por una unión covalente como en el caso de los MWCNTs-DO. Tal y como se discutió anteriormente (Resultados y discusión 6.1.6), el aumento en la solubilidad es una evidencia que demuestra que las aminas poliméricas (PEGDA y PEI) no forman interconexiones covalentes entre dos o más MWCNTs, de lo contrario formarían grandes cúmulos y agregados que disminuirían su solubilidad considerablemente.

6.2. Transformación genética de plantas mediada por MWCNTs funcionalizados con aminas

De acuerdo con los estudios realizados por Liu [275] y Yuan [276] en células BY-2 y en células del mesófilo, los CNTs tienen la capacidad de atravesar la pared celular y transportar moléculas al interior de la célula. Con base en estos estudios se realizó una prueba para determinar si los MWCNTs prístinos y funcionalizados con aminas son capaces de transportar al plásmido AtnCBP-GFP al interior celular para dar lugar a la transformación genética de células de plantas en suspensión.

6.2.1. Caracterización del plásmido AtnCBP-GFP

Antes de realizar la transformación genética mediada por MWCNTs, el plásmido AtnCBP-GFP se extrajo a gran escala (Materiales y métodos sección C—5.6.4) y se caracterizó para determinar su integridad (Materiales y métodos sección C—6.6.5). Los plásmidos obtenidos a partir de cinco muestras fueron cuantificados por espectroscopia y (Figura 6.16—A) visualizados por electroforesis en gel de agarosa (Figura 6.16—B), observando al plásmido en su conformación circular (OC) y súper enrollada (SC).

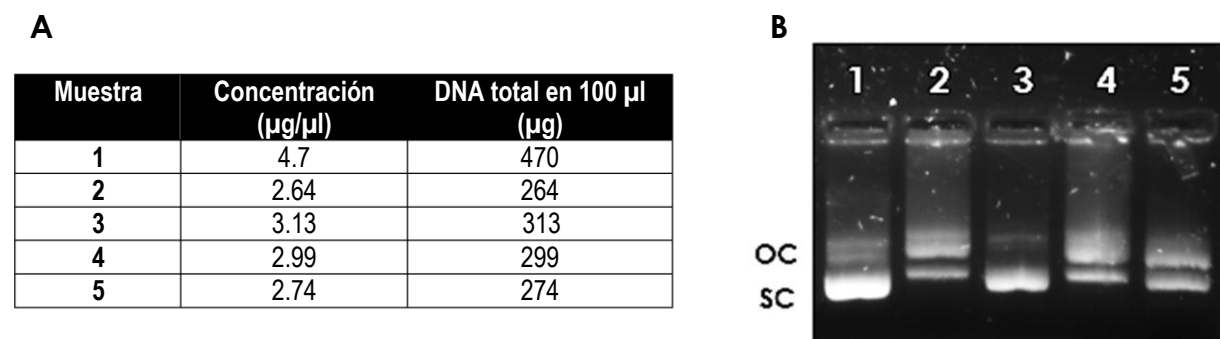


Figura 6.16. A) Cuantificación del plásmido AtnCBP-GFP obtenido a partir de cinco extracciones, y B) visualizados en un gel de agarosa. Conformación circular = OC) y súper enrollada = SC.

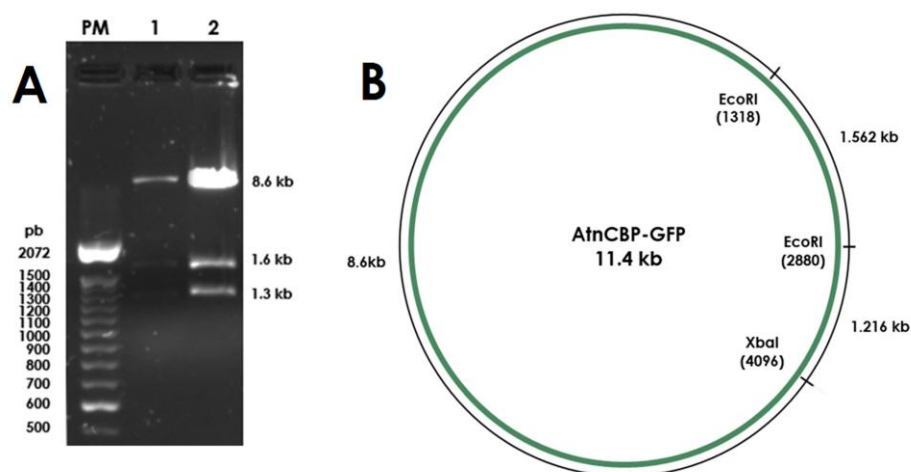


Figura 6.17. Electroforesis en gel de agarosa para la digestión del plásmido AtnCBP-GFP con las enzimas XbaI y EcoRI (A). Mapa de restricción de plásmido AtnCBP-GFP (B). PM= marcado de peso molecular.

Posteriormente, el plásmido AtnCBP-GFP fue digerido con las enzimas EcoRI y XbaI (Materiales y métodos sección C—5.6.5.2), y el producto de la digestión se observó en un gel de agarosa (Figura 6.17—A). Los fragmentos obtenidos a partir de digestión presentan el tamaño esperado que indica el mapa de restricción (Figura 6.17—B) generado a partir de la secuencia del plásmido (no mostrada). Este plásmido

contiene alrededor de 11.4 kb, y al cortarlo con la enzima EcoRI en los sitios 1318 y 2880, y con la enzima XbaI en el sitio 4029, se generan tres fragmentos con un peso molecular de 8.6 y 1.2 kb, respectivamente; indicando que el plásmido el mismo peso molecular que el esperado a partir de su secuencia (11.44 kb).

Finalmente el plásmido AtnCBP-GFP fue caracterizado a través de PCR (Materiales y métodos sección C—5.6.5.3), amplificando los sitios 35S-nCBP, nCBP-GFP y GFP para corroborar su existencia (Figura 6.16). Los pesos moleculares de los fragmentos amplificados concuerdan con los esperados mostrados en la Tabla 5.5 (Materiales y métodos sección C): el fragmento 35S-nCBP presenta un peso molecular de 1000 pb, el fragmento nCBP presenta 530 pb, y el fragmento GFP tiene 600 pb.

6.2.2. Funcionalización no covalente de MWCNTs con DNA plasmídico

Se realizaron diferentes pruebas para determinar qué parámetros son los más adecuados para llevar a cabo la funcionalización de los MWCNTs con el plásmido AtnCBP-GFP y realizar la transformación genética de células de planta en suspensión.

Primero se colocaron diferentes cantidades del plásmido (8, 4 y 2 μg) en presencia de 50 μg de cada tipo de MWCNT prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas (Materiales y métodos sección C—5.2.7). La Figura 6.19 muestra el DNA plasmídico recuperado a partir de los sobrenadantes de las muestras de MWCNTs funcionalizados con el plásmido AtnCBP-GFP. Al comparar el carril del control (pDNA: plásmido en ausencia de MWCNTs), los

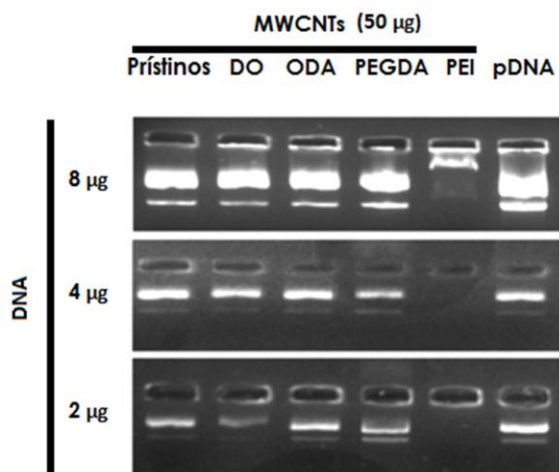


Figura 6.19. Interacción entre MWCNTs y DNA plasmídico (pDNA), variando la concentración en presencia de 50 μg de cada tipo de MWCNTs.

de plásmido que la del control pDNA. En la Figura 3.4 del Capítulo 3, se muestra un gel de electroforesis con un patrón muy similar al colocar MWCNTs funcionalizados con cadenas alifáticas (MWCNTs- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) en presencia de DNA, los cuales son incapaces de interactuar con la molécula de DNA por su alta hidrofobicidad [101]. Algo semejante parece ocurrir con los MWCNT-ODA, ya que lo único que poseen en la superficie es una capa de cadenas alifáticas tal y como se mostró en el esquema de la Figura 6.3; estas cadenas alifáticas son altamente hidrofóbicas e impiden que se establezca una interacción con el plásmido. Por su parte, las evidencias mostradas en la sección 6.1 de este capítulo, sugieren que los MWCNTs-DO se encuentran interconectados entre sí a través de los grupos amino

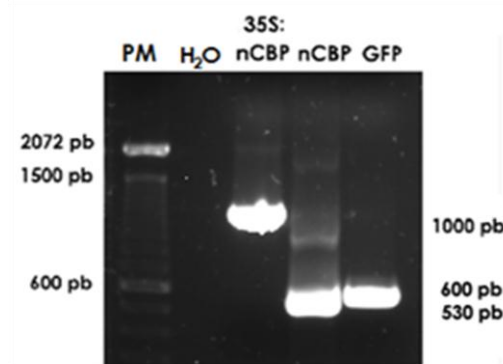


Figura 6.18. Amplificación por PCR de los fragmentos 35S-nCBP, nCBP y GFP. PM= marcador de peso molecular.

presentes en ambos extremos de la amina DO (Figura 6.3), y aunque existan algunos grupos amino libres, la formación de cúmulos y agregados reduce el área de contacto entre los MWCNTs-DO individuales y el DNA plásmidico.

A diferencia de los MWCNTs-PEI, los MWCNTs-PEGDA no fueron capaces de retener con éxito al plásmido AtnCBP-GFP (Figura 6.19). Un comportamiento similar fue observado por Singh y colaboradores en el que funcionalizaron tanto SWCNTs como MWCNTs con oligoetilenglicol diamina (SWCNT-OEGDA y MWCNTs, respectivamente) [102]. En comparación a los MWCNTs-OEGDA, los SWCNT-OEGDA presentaban menores diámetros y longitudes que reducían el número de moléculas de OEGDA unidas en la superficie, y por lo tanto el número de cargas positivas totales no eran las suficientes como para retener a un número considerable de moléculas de DNA [102]. Lo anterior puede extrapolarse también para el caso de los MWCNTs-PEGDA. La estructura de PEGDA está conformada por una larga cadena alifática de unidades etilenglicol repetitivas, con un grupo amino en cada uno de los extremos; por lo que la carga positiva se encuentra repartida únicamente en estas zonas (Figura 6.3). Es probable que por la funcionalización ambos grupos amino se encuentren unidos diferentes sitios con defectos, extendiendo su larga cadena a lo largo de la pared del MWCNT, sobre la cual sobre la cual otras moléculas de PEGDA comienzan a adherirse unas con otras por su naturaleza viscosa, formando el espeso recubrimiento observado por microscopia AFM (Figura 6.9—C) y TEM (Figura 6.12—E y F). Por tales motivos, los grupos amino se encuentran alejados el uno del otro, e incluso pueden encontrarse cubiertos por otras moléculas de PEGDA, disminuyendo el número de cargas positivas, reteniendo a un número muy reducido de moléculas de DNA plasmídico.

Los resultados mostrados en la Figura 6.19 sugieren que los MWCNTs prístinos no son capaces de interactuar con el DNA plasmídico; sin embargo, la mayoría de los estudios que afirman lo contrario se han realizado con DNA lineal [90-93, 116, 117, 121, 122]. El plásmido es una molécula de DNA circular que puede encontrarse en un estado súper enrollado, cuando esto sucede, no se da la interacción hidrofóbica entre el surco mayor y la red hexagonal de la pared del CNT, por lo que muy pocas moléculas de DNA que se encuentren en estado circular y abierto podrían interactuar con los MWCNTs prístinos. De hecho esta es la razón por la cual la mayoría de los estudios para transfectar células de animales utilizan CNTs funcionalizados con aminas para transportar DNA plasmídico [101, 102, 104-110, 124].

Posteriormente, se realizó una prueba para determinar si el tiempo de incubación mejora la afinidad de los MWCNTs funcionalizados con aminas por el plásmido (Materiales y métodos sección C—5.6.7). La Figura 6.20 muestra claramente que sin importar el tiempo de incubación (sin incubación o 24 h) la afinidad que poseen los MWCNTs por el DNA plasmídico siempre es la misma.

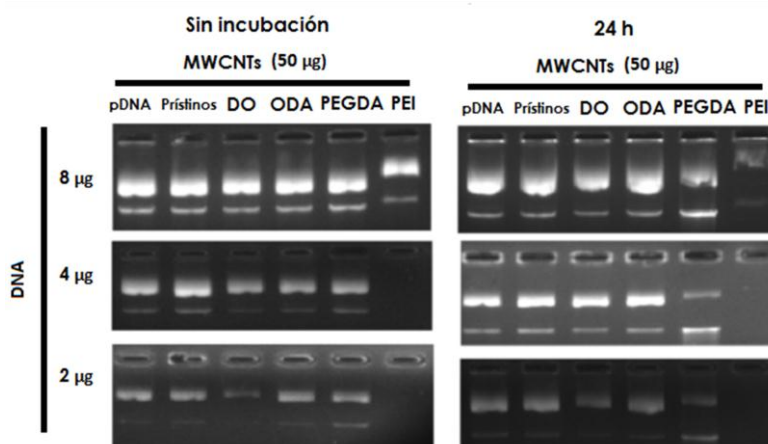


Figura 6.20. Interacción entre MWCNTs/DNA variando el tiempo de incubación en presencia de 50 µg de cada tipo de MWCNTs.

Finalmente, se determinó si el pH puede influir con la interacción electrostática entre los MWCNTs funcionalizados y el plásmido, variando el pH del agua de 3.5 —7.5 con la cual se realizó la funcionalización (Materiales y métodos sección C—5.6.7). Tal y como se aprecia en la figura 6.21, cuando el pH es muy alcalino (pH > 6.5) o muy ácido (pH ≤ 4.5), la interacción electrostática entre los MWCNTs y el plásmido se rompe por completo. Lo anterior sucede por el aumento en la concentración de los iones OH⁻ y H⁺, los cuales interfieren con la interacción electrostática entre

el plásmido cargado negativamente y los grupos amino de los MWCNTs cargados positivamente. Un comportamiento muy similar se puede observar en el gel de electroforesis de la Figura 3.6—B del Capítulo 3, en el cual se incubaron MWCNTs-PEI en presencia de diferentes concentraciones de NaCl; cuando la concentración aumentaba los MWCNTs-PEI pedían afinidad por el plásmido como consecuencia del aumento en la concentración de los iones Na^+ y Cl^- [105]. Por otro lado, cuando se utiliza un intervalo de pH de 5.5—6.5, la mayor interacción se da entre MWCNTs-PEI y DNA. Esta observación es de gran importancia debido a que las suspensiones celulares se encuentran inmersas en un medio de cultivo con un pH cercano a 6.0 (Materiales y métodos sección B—5.3), y es necesario que se mantenga la interacción electrostática entre el plásmido y los MWCNTs hasta que éstos penetren las células. Con base en lo anterior, y partiendo de la mayor interacción observada, es posible determinar que los parámetros óptimos para funcionalizar MWCNTs con DNA plasmídico son aproximadamente: 1 μg de DNA plasmídico por cada 12.5 μg de MWCNTs funcionalizados con aminas, utilizando H_2O mili-Q con un pH de 6.5.

6.2.3. Transformación genética mediada por MWCNTs

A continuación se realizó la transformación de el cultivo de células NT-X en suspensión, las cuales se obtuvieron de callos inducidos a partir de plántulas de *Nicotiana tabacum* variedad xanthi (Materiales y métodos sección B—5.4.1), y por lo tanto no es una línea celular estable. Los cultivos celulares NT-X fueron tratados con MWCNTs-prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas en presencia del plásmido AtnCBP-GFP previamente sonicados para disgregar los cúmulos y agregados, de acuerdo con la metodología descrita en Materiales y métodos sección C—5.6.9.1.

Las micrografías confocales de los cultivos celulares NT-X tratados con MWCNTs-prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas en presencia del plásmido AtnCBP-GFP (Figura 6.22), muestran algunas de las células que presentaron una señal fluorescente en su interior, indicando que éstas fueron transformadas con éxito después de un periodo de incubación de 24 y 48 h. Debido a que la prueba de funcionalización no covalente de MWCNTs con DNA plasmídico (Resultados y discusión-6.2.2) indicó que los MWCNTs-PEI son los que atraen la mayor cantidad de moléculas de DNA, se esperaba que únicamente las células NT-X tratadas con éstos hayan sido transformadas. Sin embargo, las micrografías confocales revelan que de alguna manera el resto de los MWCNTs también internalizaron y transportaron al DNA hacia el interior celular (Figura 6.22). Ya que el plásmido AtnCBP-GFP presenta al gen de la proteína de fusión nCBP-GFP bajo un promotor constitutivo 35S de plantas, teóricamente no hace falta más que una sola molécula de DNA plasmídico dentro del núcleo para su sobreexpresión. Es muy probable que algunos CNTs individuales que poseen grupos aminos libres, hayan sido capaces de interactuar electrostáticamente con una mínima cantidad de DNA plasmídico, la cual fue internalizada en las células dando lugar a la sobreexpresión del gene.

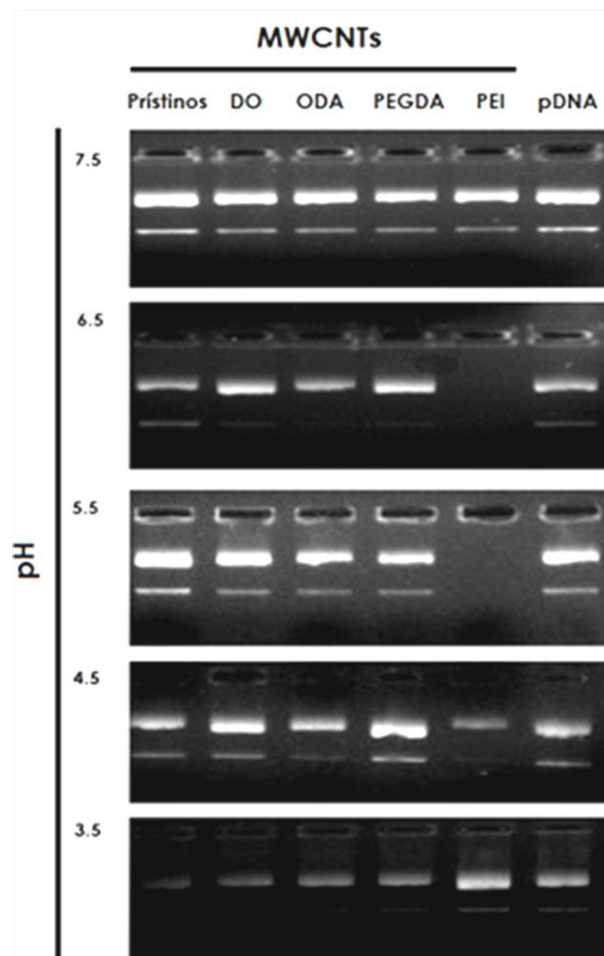


Figura 6.21. Interacción entre MWCNTs/DNA variando el pH en presencia de 50 μg de cada tipo de MWCNTs.

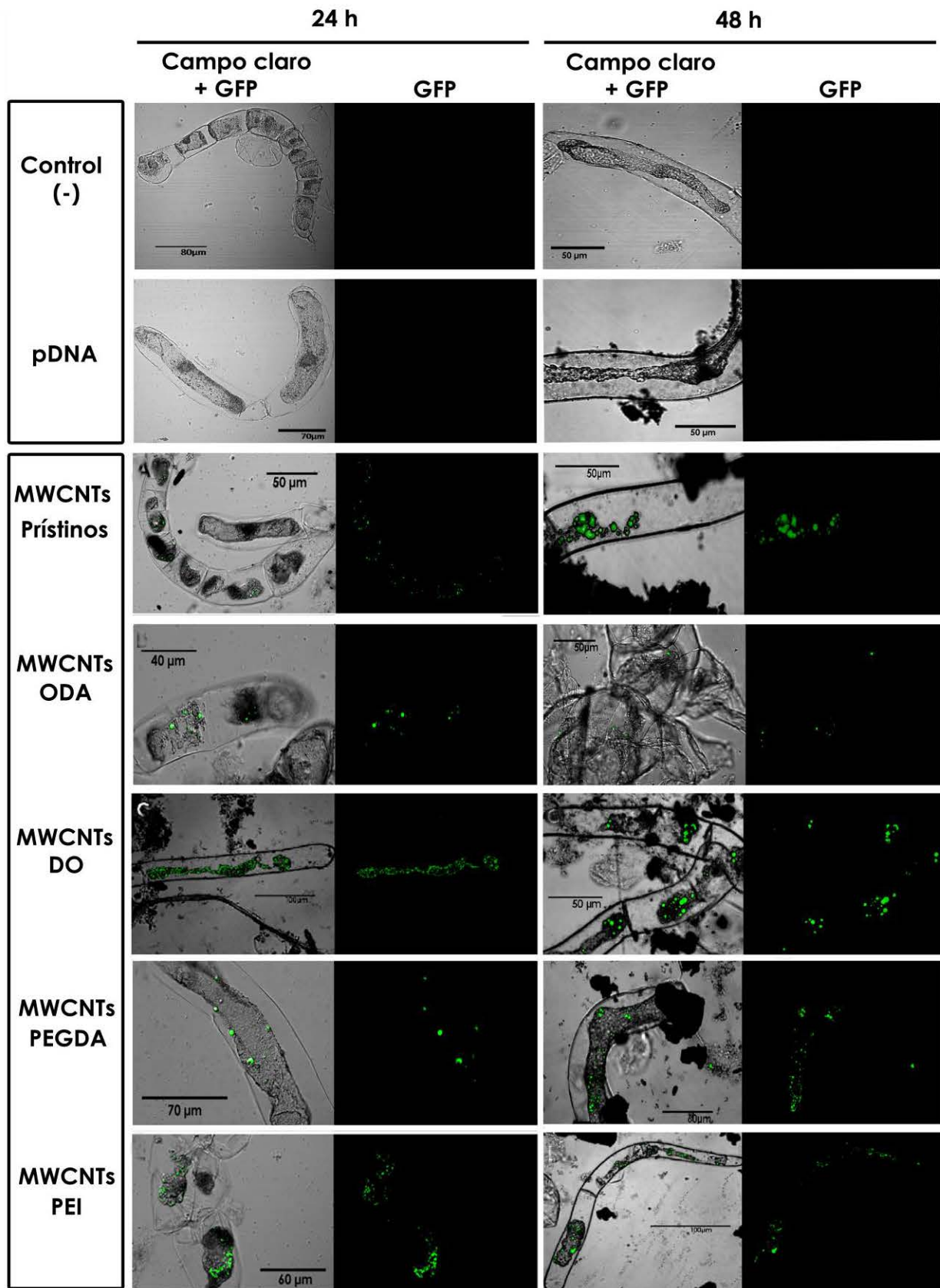


Figura 6.22. Células tratadas con MWCNTs prístinos o MWCNTs funcionalizados con aminas en presencia del plásmido *AtnCBP-GFP*. Se puede observar a la proteína de fusión nCBP-GFP localizada dentro del citoplasma de células plasmodizadas en un patrón granular. En algunos casos se puede observar a los aglomerados en el medio.

La proteína nCBP (novel Cap Binding Protein) fusionada GFP se encontró localizada citoplasmáticamente en el interior de estructuras granulares (Figura 6.22). Este patrón granular fue observado también en el estudio realizado por

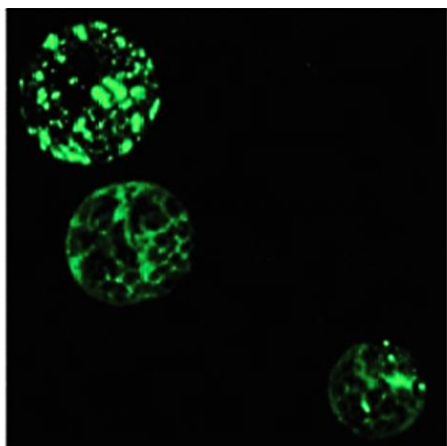


Figura 6.23. Micrografías confocales de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* que expresan a la proteína de fusión nCBP-GFP, localizadas en estructuras granulares dentro del citoplasma. De la Torre Díaz, 2009 [277].

De la Torre Díaz en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* (Figura 6.23), utilizando el mismo plásmido (AtnCBP-GFP) [277]. En dicho estudio se propone que la proteína nCBP está localiza en estructuras conocidas como “gránulos de estrés”, cuya función es la de almacenar y proteger a los mRNAs de la degradación durante condiciones de estrés; y alternativamente que la proteína nCBP también puede encontrarse dentro de otras estructuras granulares conocidas como “cuerpos P”, en las cuales se lleva a cabo la degradación de los mRNAs durante la regulación genética [277]. La proteína nCBP es una proteína citoplasmática que pertenece a la clase II de la familia de proteínas tipo eIF4E capaces de unirse al CAP (γ mGpppG) de los mRNAs, cuyo mensajero se expresa con mayor abundancia en semillas, plántulas y flores; mientras que la proteína es mucho más abundante en botones florales de *Arabidopsis thaliana* [298]. Con base en lo anterior, se sugiere que la proteína nCBP juega un papel muy importante en la regulación de la expresión genética durante el desarrollo de la planta.

La proteína de fusión nCBP-GFP únicamente se encontró al interior de algunas células que presentan una morfología típica de una célula plasmolizada (Capítulo 2, Figura 2.11), mostrando un citoplasma altamente encogido que en algunos casos se ha desprendido por completo de la pared celular (Figura 6.22). Es posible que en respuesta al estrés producido durante a plasmólisis aumenten los niveles la proteína nCBP en los “gránulos estrés” o incluso en los “gránulos P”, por lo que los niveles de la proteína de fusión nCBP-GFP también aumentarían si dichas células han sido transformadas con el plásmido AtnCBP-GFP. Sin embargo, también cabe a posibilidad de que los MWCNTs únicamente sean capaces de penetrar la pared celular de células plasmolizadas, promoviendo así su transformación, siempre y cuando éstas sean aún viables.

6.3. Pruebas de internalización de MWCNTs en células de plantas

Para corroborar si los MWCNTs únicamente pueden penetrar la pared celular de células plasmolizadas, se realizó una serie de pruebas para detectar la entrada de los MWCNTs al interior de las células en suspensión (Materiales y métodos sección B - 5.4.3).

6.3.1. Prueba de internalización utilizando FITC

Se funcionalizaron SWCNTs-oxidados (SWCNTs-ox) no covalentemente por interacciones π - π con el fluoróforo FITC (Materiales y métodos sección B-5.4.2.1) como un control para probar su internalización en células NT-X, de acuerdo la metodología descrita en el estudio realizado por Liu y colaboradores utilizando la línea células BY-2 (Figura 6.24, y Figura 3.12 del Capítulo 3) [275]. Posteriormente el mismo experimento se realizaría para MWCNTs prístinos y funcionalizados con aminas. Los resultados de esta prueba se muestran en la Figura 6.25.

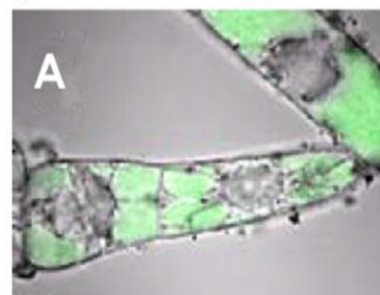


Figura 6.24. Micrografías confocales en de células BY-2 incubadas con FITC en presencia de SWCNTs-ox (A). Liu, 2009 [275].

A diferencia de lo observado por Liu y colaboradores [275], FITC se encontró

en el interior del sistema vacuolar de las células intactas NT-X en ausencia y presencia de SWCNTs-ox (Figura 6.25—A y B), indicando que FITC fue capaz de atravesar la pared celular sin ayuda de los SWCNT-ox. De igual modo, FITC se encontró en el citoplasma de las células plasmolizadas tanto en ausencia como en presencia de los SWCNT-ox (Figura 6.25-C).

De acuerdo con Liu y colaboradores, FITC no es capaz de internalizarse por sí mismo en las células intactas de la línea BY-2, pero en presencia de SWCNTs-ox este logra penetrar la pared celular y llegar hasta el sistema vacuolar (Figura 6.24); concluyendo que los SWCNTs-ox son capaces de atravesar la pared celular y transportar a FITC al interior de las vacuolas [275].

A diferencia de los cultivos celulares

NT-X, la línea celular BY-2 utilizada por Liu y colaboradores [275] es una línea celular estable y homogénea que presenta una tasa de división muy alta comparable a la que posee la línea celular HeLa en mamíferos [299]. Es por eso que se realizó la misma prueba en una línea celular estable; sin embargo, la línea celular BY-2 es realmente difícil de conseguir, y en su lugar se utilizó la línea celular estable NT-1 proporcionada por el Dr. Gerardo Rafael

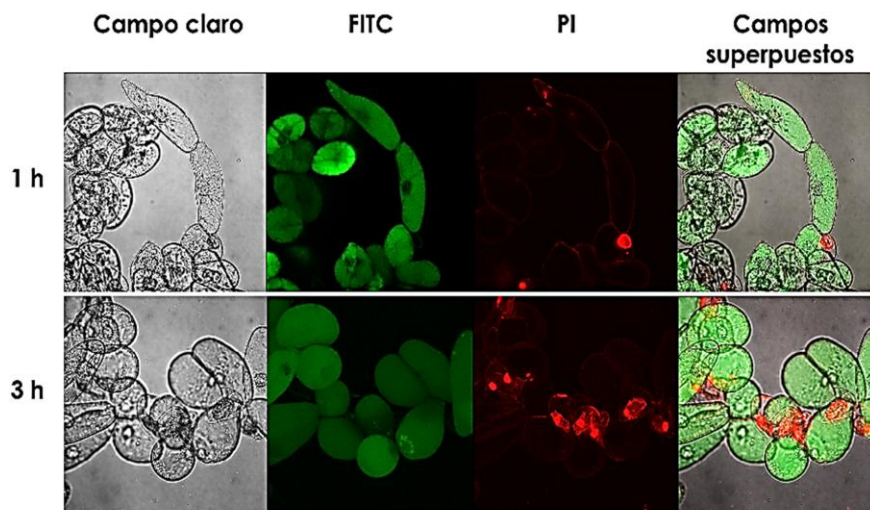


Figura 6.26. Micrografías confocales de células NT-1 incubadas con FITC en ausencia de CNTs, e incubadas durante 1 y 3 h; en las cuales FITC se localiza en el interior de las vacuolas. Las células plasmolizadas han sido teñidas con Azul de Evans para diferenciarlas del resto de las células.

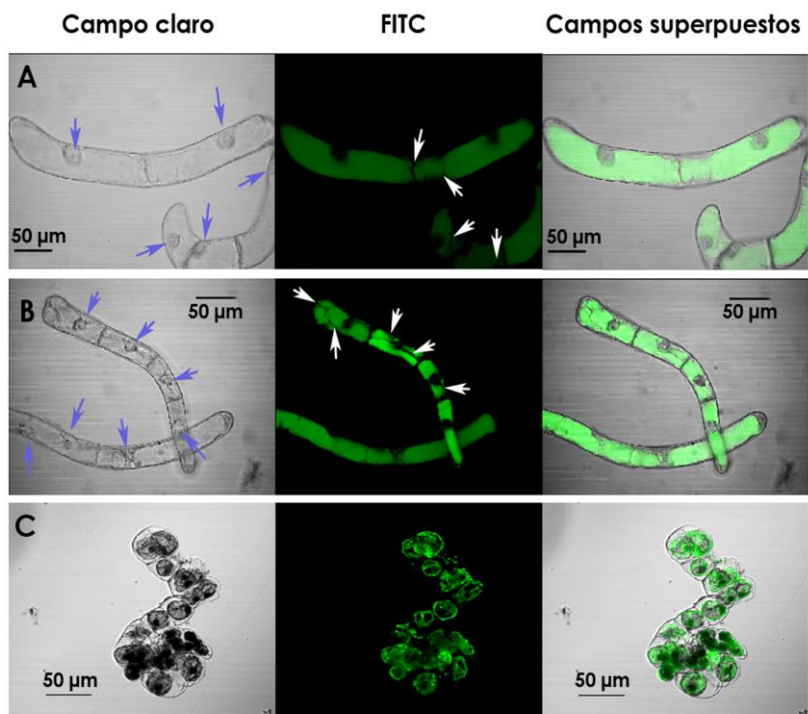


Figura 6.25. Células tratadas con FITC en ausencia (A) y presencia de SWCNTs-ox (B). En ambos tratamientos FITC se encontró en el sistema vacuolar; mientras que en ausencia de SWCNTs-ox FITC se encontró en el citoplasma (C). Las flechas azules indican los núcleos y las flechas blancas indican los citoplasmas de células intactas.

Argüello Astorga del IPICYT (Materiales y métodos sección B—5.3). La línea celular NT-1 es una línea celular estable derivada a partir de la línea celular BY-2, por lo tanto son genéticamente idénticas, si bien la diferencia entre ambas líneas radica en la velocidad de división, ya que las células NT-1 se dividen un poco más lento [300]. No obstante, ambas líneas han sido utilizadas exitosamente para llevar a cabo ensayos de transformación genética [301].

Tal y como se observó en las células NT-X (Figura 6.26), FITC también fue observado en ausencia de CNTs al interior de las vacuolas de células intactas de la línea NT-1 (Figura 6.25 y Figura 6.26). En ambas micrografías se puede observar que las células plasmolizadas han sido teñidas con PI (Figura 6.25) y azul de Evans (Figura 6.27), dos marcadores ampliamente utilizados en pruebas de viabilidad celular [302].

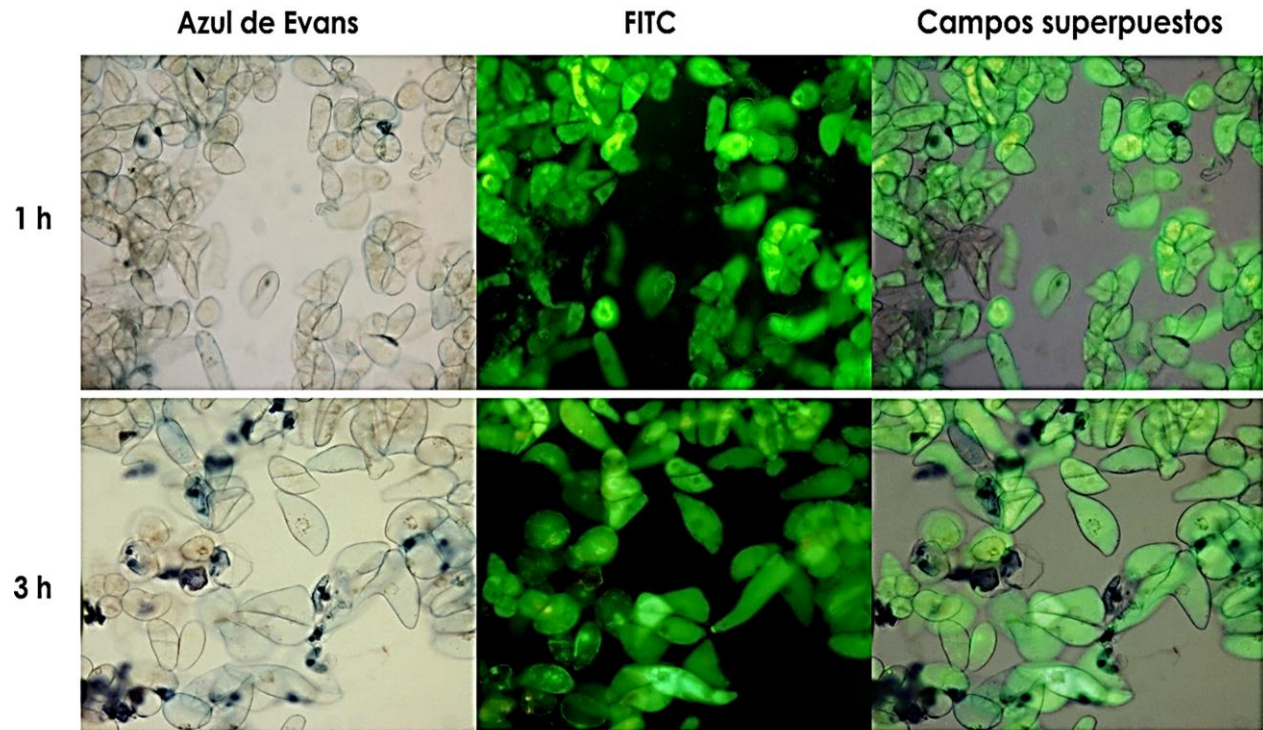


Figura 6.27. Micrografías de fluorescencia de células NT-1 incubadas con FITC en ausencia de CNTs, e incubadas durante 1 y 3 h; en las cuales FITC se localiza en el interior de las vacuolas. Las células plasmolizadas han sido teñidas con azul con Azul de Evans para diferenciarlas del resto de las células.

Algunos estudios han evidenciado la capacidad de FITC para atravesar libremente la pared y membrana celular sin necesidad de ser transportado por algún vector [303-310]. Por ejemplo, Makarow [306, 307] observando la incorporación de dextranas (polisacáridos complejos) marcadas covalentemente con FITC en levaduras, concluyó que éstas se acumulaban en el sistema vacuolar internalizadas vía de endocitosis de fase fluida o pinocitosis. Poco después Cole y colaboradores utilizando suspensiones celulares de zanahoria y demostraron que las muestras comerciales de dextranas marcadas con FITC (D-FITC) comúnmente se encontraban contaminadas con FITC libre, capaz de atravesar la pared celular y acumularse en las vacuolas; confundiendo así con las D-FITC, por lo que fueron purificadas [309]. Posteriormente, los cultivos celulares de zanahoria fueron tratados por separado con D-FITC purificadas y con FITC (Figura 6.28); sin embargo, esta vez sólo se encontró a FITC en el interior celular [309]. Asimismo, FITC ha sido encontrado en otras células con pared tales como la levadura y la seta *Pisolithus tinctorius* [308, 310]

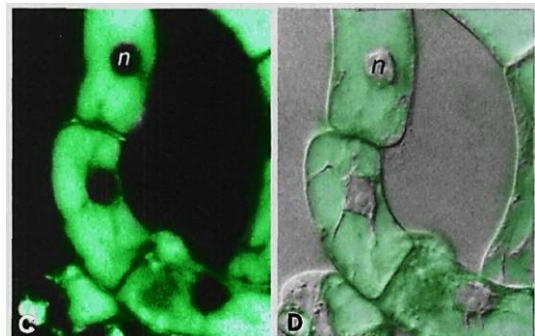


Figura 6.28. Cultivos de células de zanahoria en suspensión incubadas en presencia de FITC: Fluorescencia (C) y campo claro (D). FITC se acumula en el sistema vacuolar pero no se localiza en el núcleo ni en el citoplasma alargado. Cole, 1990 [309].

De acuerdo con lo anterior y con las pruebas realizadas en los cultivos de células NT-X y NT-1 (Figura 6.25— Figura 6.27), la funcionalización no covalente de CNTs con FITC no es apropiada para estudiar la entrada de los MWCNTs en células de plantas, debido a que FITC puede atravesar la pared celular por sí misma.

6.3.2. Prueba de internalización utilizando Alexa® Fluor 555-NHS

Los fluoróforos pertenecientes a la serie Alexa® Fluor son mucho más brillantes, fotoestables y resistentes al cambio de pH que otras moléculas como la rodamina, la fluoresceína, y sus derivados (FITC, TRITC, Cy3, etc.) [311]. De hecho, los fluoróforos de la serie Alexa® Fluor son moléculas hidrofílicas capaces de atravesar los poros de la pared celular pero son incapaces de atravesar la membrana celular debido su carga negativa [312]. Con base en lo anterior, se optó por utilizar al fluoróforo Alexa® Fluor 555-NHS para funcionalizar a los MWCNTs en lugar de FITC (Materiales y métodos 5.4.2.2).

Tal y como se observa en la Figura 6.29 (control positivo), Alexa® Fluor 555-NHS se encontró únicamente en el interior de las células plasmolizadas las cuales han perdido la integridad de sus pared y membranas celulares. Lo anterior sugiere que a diferencia de FITC, Alexa® Fluor 555-NHS es incapaz de atravesar la membrana de células intactas muy probablemente por su carácter hidrofílico y su carga negativa, por lo tanto necesita de un vehículo que la transporte a través de la membrana, por tal motivo es un marcador fluorescente apropiado para estudiar la internalización de los MWCNTs.

A continuación, para estudiar la entrada de los CNTs las células NT-1 (Materiales y método sección B-5.4.3.2), los cultivos

celulares NT-1 se incubaron en presencia de los SWCNTs-ox, MWCNTs prístinos y MWCNTs-ODA funcionalizados no covalentemente por apilamiento π - π con Alexa® Fluor 555-NHS (Materiales y métodos sección B-5.4.2.2); es importante señalar que los MWCNTs-ODA no pueden ser derivatizados con Alexa® Fluor 555-NHS porque no poseen grupos amino libres (Figura 6.3). Asimismo, los cultivos celulares se incubaron con el resto de los MWCNTs funcionalizados con aminas (DO, PEI y PEGDA) derivatizados con Alexa® Fluor 555-NHS; dicha derivatización fue realizada a través de la formación de un enlace amida entre los grupos amino libres y el grupo succinimidil éster (NHS) de Alexa® Fluor 555-NHS (Materiales y métodos sección B-5.4.2.2).

A diferencia lo que se ha reportado hasta el momento [275, 276], las micrografías confocales de la Figura 6.30 demuestran que los CNTs sólo son capaces de penetrar la pared de las células plasmolizada, encontrándolos en el interior celular. Por lo tanto, es probable los CNTs sean retenidos en la superficie de la pared de las células intactas debido a que no pueden atravesar por los poros de la matriz de celulosa, o que sean retenidos directamente por los grupos aromáticos de las glicoproteínas y carbohidratos de la pared celular. Asimismo, en el caso de los MWCNTs funcionalizados con aminas, el bloqueo podría deberse a la interacción generada entre los componentes de la superficie de la pared celular que poseen una carga neta negativa y los grupos amino de los MWCNTs.

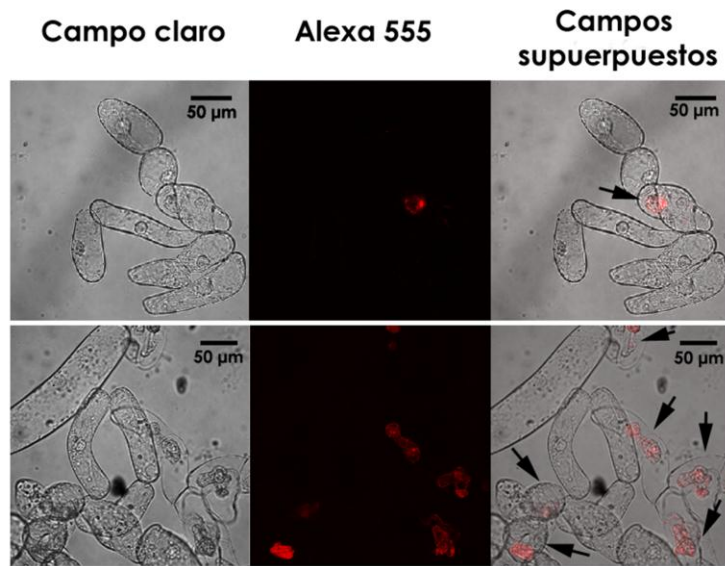


Figura 6.29. Micrografías confocales que muestran algunas células de la línea NT-1 incubadas durante 48 h en presencia de Alexa® Fluor 555-NHS (control positivo), el cual se observa en el interior de las células plasmolizadas (indicadas con flechas) pero no en el interior de células intactas.

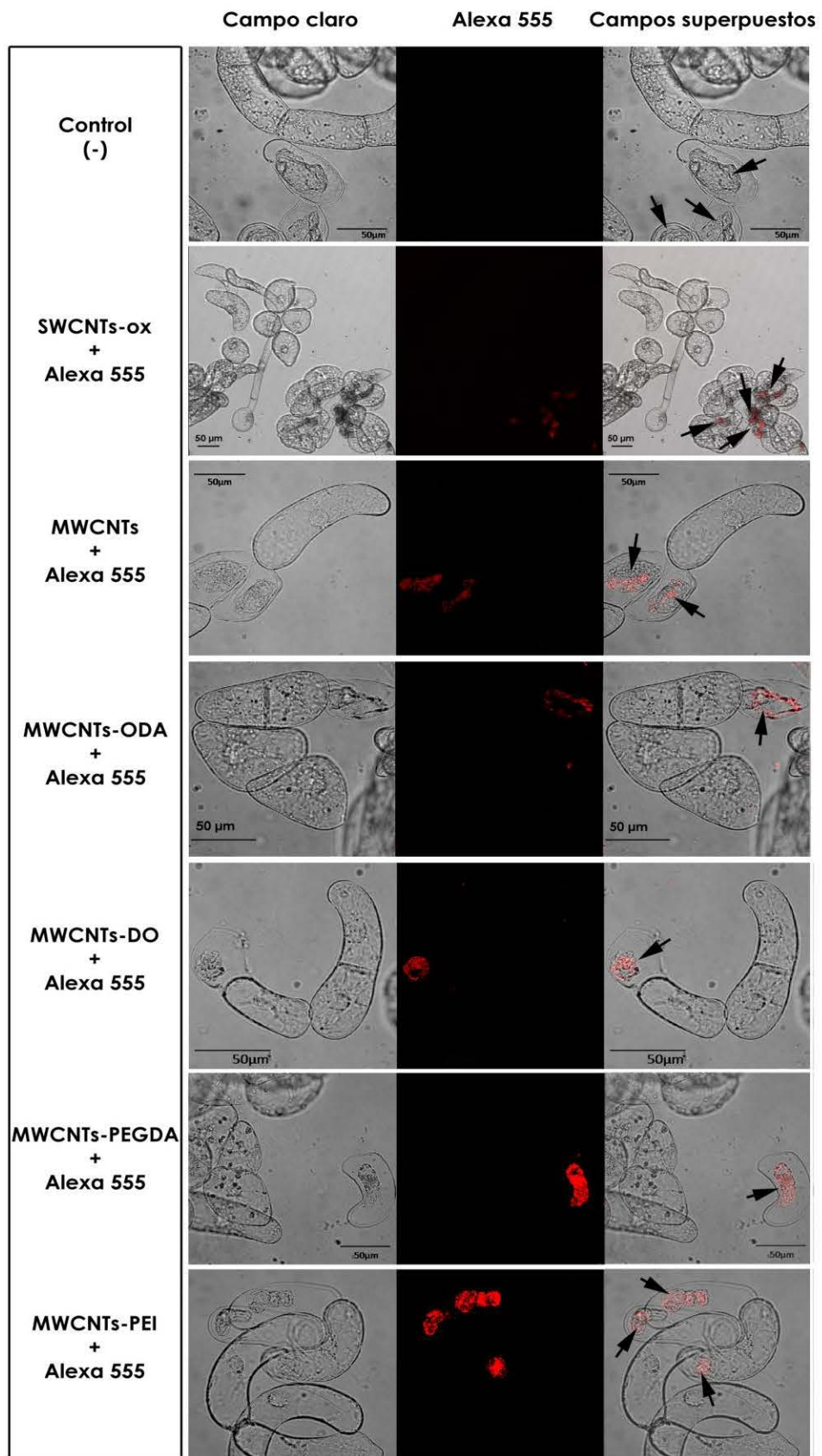


Figura 6.30. Células NT-1 incubadas durante 48 h con CNTs funcionalizados no covalentemente con vía interacción π - π , y con CNTs derivatizados con Alexa® Fluor 555-NHS. Las células plasmolizadas se indican con flechas.

Existen evidencias que apoyan las ideas anteriores. Tan y colaboradores incubaron cultivos de células de arroz en presencia de MWCNTs durante 48 h, al observar las células por microscopía TEM, no detectaron a los MWCNTs en el interior de las células intactas, pero sí sobre la superficie de las paredes celulares (Figura 6.31) [313]. Además, en los estudios realizados por Serag y colaboradores con cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* se inmovilizaron *celulasas* en la superficie de SWCNTs para degradar la pared celular en sitios específicos para formar agujeros por los cuales pudieran atravesar. Una vez que penetraban la pared, hacían contacto con la membrana celular y la atravesaban fácilmente acumulándose en el interior celular (Capítulo 3, Figura 3.9) [273]. Esto último ha sido corroborado utilizando protoplastos, donde los CNTs son capaces de difundir a través de la membrana celular fácilmente (Capítulo 3, Figura 3.10) [274, 276].

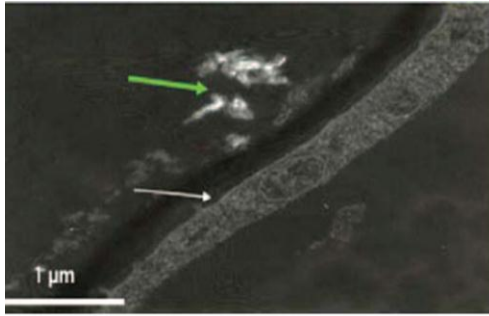


Figura 6.31. Micrografías TEM de las células de arroz incubadas durante 48 h en presencia de MWCNTs. Los MWCNTs (flecha verde) fueron encontrados sobre la superficie de la pared celular (flecha blanca), pero no al interior de la célula. Tan, 2009 [313].

Estos argumentos concuerdan con los resultados obtenidos en la prueba de transformación genética mediada por MWCNTs funcionalizados con el plásmido AtnCBP-GFP (Resultados y discusión 6.2.3), en la cual se observó que la proteína de fusión nCBP-GFP

sólo se expresaba en las células plasmolizadas (Figura 6.22), por lo que indudablemente los MWCNTs no pueden atravesar la pared celular de las células intactas. A pesar de que se detectó la presencia de los CNTs en el interior de las células plasmolizadas, es importante corroborar su capacidad para transportar consigo a los ácidos nucleicos durante la transformación genética de las células plasmolizadas.

6.3.3. Prueba de internalización utilizando DNA marcado con Alexa® Fluor 555-NHS

Por consiguiente, para confirmar que los CNTs pueden mediar la transformación genética durante la plasmólisis, se realizó una prueba (Materiales y métodos sección C— 5.6.9.2) para detectar físicamente a los ácidos nucleicos transportados en el interior celular, incubando células de la línea NT-1 con SWCNTs prístinos, MWCNTs prístinos, y MWCNTs funcionalizados con aminas en presencia de un fragmento de DNA marcado con Alexa® Fluor 555-NHS (referido como DNA-alexa555) de aproximadamente 1.3 kb (Materiales y métodos sección C— 5.6.6.2).

En las micrografías confocales mostradas en la Figura 6.32 se observa claramente que el fragmento de DNA-alexa555 ha sido transportado por los CNTs hacia el interior de las células NT-1 (señal en color rojo). Sin embargo, en ausencia de CNTs, no se detectó al fragmento de DNA-alexa555 en el interior de las células NT-1. Lo anterior confirma el gran inconveniente que se enfrenta al introducir ácidos nucleicos sin ayuda de vehículo transportador a través de una membrana cargada negativamente o una pared celular que actúa como una auténtica barrera física [129, 142, 143].

Varios estudios han demostrado que a diferencia de lo que sucede en las células intactas, en las células plasmolizadas existe la posibilidad de que el DNA pueda atravesar la pared y la membrana celular a través de poros o heridas formados por la pérdida de la integridad durante el proceso de plasmólisis, los cuales son lo suficientemente grandes como para permitir el paso de diversas macromoléculas hacia el espacio periplasmático [206, 209-211]. Asimismo, se ha reportado que durante la plasmólisis las células se vuelven mucho más permisibles a la transformación genética por algunos métodos como la electroporación [161, 209, 210]. Es probable que algo semejante suceda con los CNTs durante la plasmólisis, y al igual que sucede con la electroporación, mejoren la incorporación de los ácidos nucleicos a través de la pared y membrana de las células.

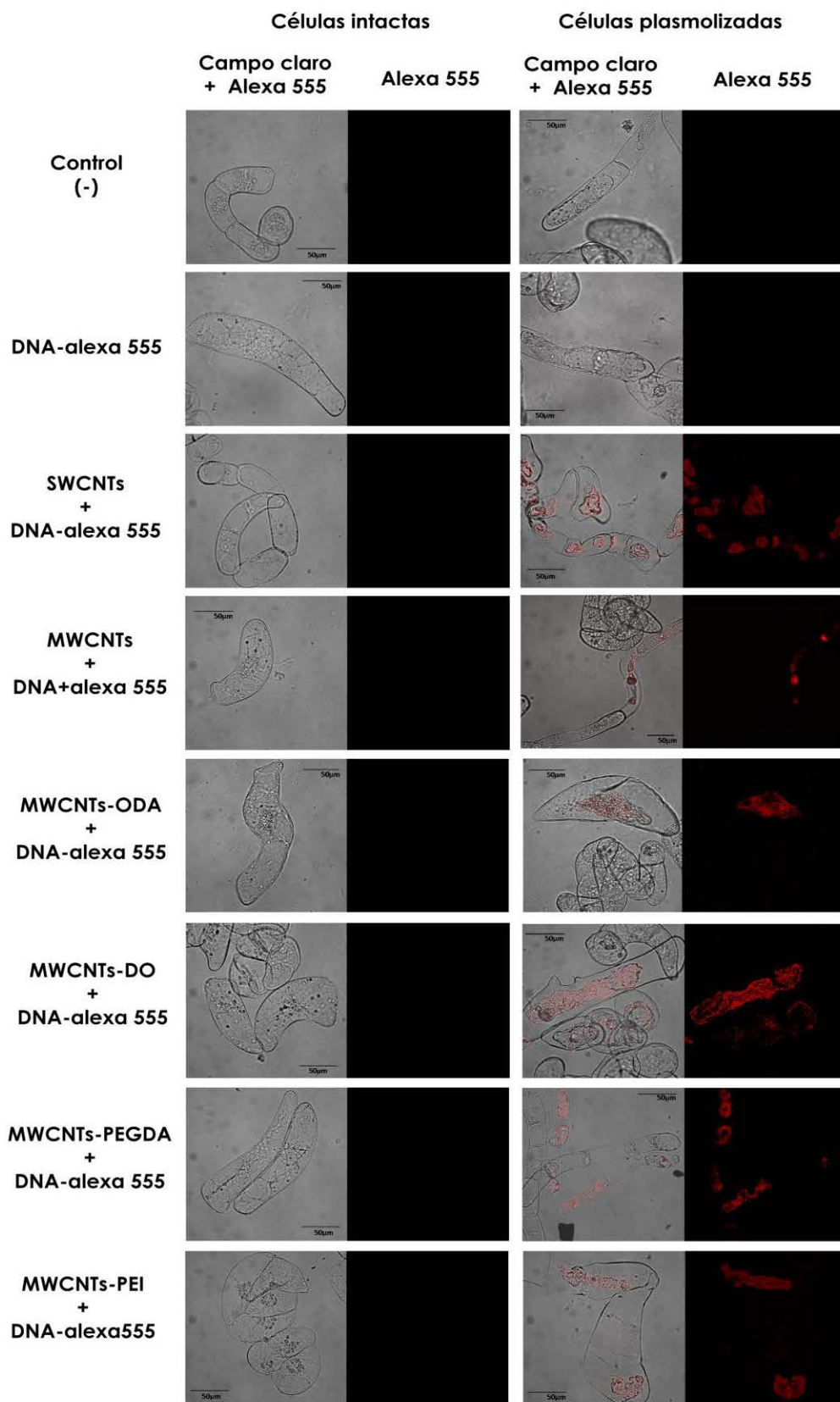


Figura 6.32. Micrografías confocales de células NT-1 tratadas durante 48 h con el fragmento de DNA-alexa555 en ausencia y presencia de CNTs. La señal del fragmento DNA-alexa555 (señal en rojo) sólo se observa en las células plasmolizadas en presencia de CNTs.

Es necesario destacar la importancia que posee el tamaño de las partículas de CNTs para poder atravesar la pared y membrana celular. De acuerdo con los estudios realizados por Serag y colaboradores en protoplastos de *Arabidopsis thaliana*, se determinó que cuando los MWCNTs forman grandes cúmulos y agregados son incapaces de atravesar la membrana celular por las vías de difusión y de endocitosis, observándolos al exterior de la célula [274]. Esto implica que los CNTs forzosamente deben atravesar la pared y la membrana celular en forma individual o formando cúmulos lo suficientemente pequeños como para cruzar a través de los poros y heridas de la pared de las células plasmolizadas, y a continuación poder difundir a través de la membrana celular (Figura 6.33).

De acuerdo con la caracterización realizada para los MWCNTs prístinos y funcionalizados con aminas (Resultados y discusión —6.1), a pesar de que los MWCNTs pueden formar cúmulos, la mayoría de los MWCNTs prístinos y funcionalizados con aminas como DO, PEI y PEI poseen longitudes alrededor de los 500 nm y diámetros entre los 20 y 50 nm. Particularmente, los MWCNTs-DO pueden formar estructuras ramificadas muy abundantes que pueden llegar a mediar hasta 1 μm de largo, ya que éstos se encuentran interconectados unos con otros. Sin embargo, tanto los MWCNTs prístinos como los MWCNTs funcionalizados con aminas fueron capaces de internalizarse, transportar ácidos nucleicos, y mediar la transformación genética en las células plasmolizadas. Por ejemplo, Zhang y colaboradores utilizaron SWCNTs funcionalizados con 1,6 diaminohexano, los cuales teóricamente pueden formar interconexiones al igual que los MWCNTs funcionalizados con DO (1,8 diaminoctano). No obstante, lograron introducir siRNAs en células de cultivos y de tumores de ratón [108].

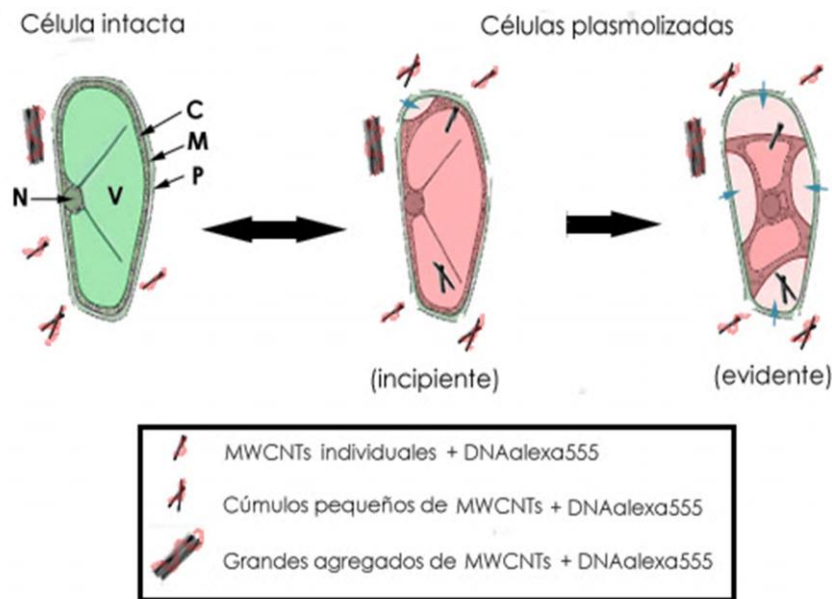


Figura 6.33. Esquema que resume los resultados obtenidos a partir de las pruebas de internalización de MWCNTs funcionalizados no covalentemente con DNA-alexa555. Los MWCNTs (prístinos y funcionalizados con aminas) logran penetrar por los poros y heridas formados en la pared de las células plasmolizadas y transportar el DNA-alexa555 a través del espacio periplasmático (flechas azules) hasta el interior celular (tinción rojiza). N = núcleo; C= citoplasma; V= vacuola; M= membrana celular; P= pared celular.

Lo anterior sugiere que una porción de MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminas se encuentra compuesta por MWCNTs individuales capaces de atravesar la pared y la membrana celular durante la plasmólisis, y no necesariamente se encuentran formando cúmulos o interconexiones con otros MWCNTs, y por ende, los poros o heridas por los cuales los MWCNTs atraviesan la pared celular durante la plasmólisis deben poseer un diámetro

cercano a los 20–50 nm de diámetro, capaz de permitir el paso de MWCNTs individuales y cúmulos de menor tamaño, bloqueando únicamente el paso de los aglomerados de mayor tamaño (Figura 6.33).

De igual manera, a pesar de que los geles de agarosa con los que se determinó la funcionalización no covalente de los MWCNTs con el plásmido nCBP-GFP (Resultados y discusión — 6.2.2) sugirieron que sólo los MWCNTs-PEI son capaces de retener DNA plasmídico, las pruebas de transformación e internalización del fragmento de DNA-alexa 555 confirman que el resto de los MWCNTs también pueden hacerlo pero en menor proporción. Es decir que en comparación a la cantidad de DNA que es acarreada por los MWCNTs-PEI, existe una pequeña cantidad de moléculas de DNA que son acarreadas por el resto de los MWCNTs, y en el momento en el que son transportadas al interior celular, se acumulan de tal manera que pueden ser visualizadas en el citoplasma de las células plasmolizadas a través de microscopía confocal (Figura 6.32).

Actualmente, los estudios relacionados con el uso de CNTs para mediar la transformación genética en cultivos celulares de plantas, son escasos y contradictorios, por lo tanto no han podido esclarecer si los CNTs son capaces o no de atravesar la pared de células intactas y al mismo tiempo transportar ácidos nucleicos. Por un lado, Liu y Yuan aseguran que los SWCNTs son capaces de transportar y entregar ácidos nucleicos al interior de células BY-2 [275] y células del mesófilo de hojas de *Arabidopsis thaliana* [276]; por otro lado, Serag y colaboradores aseguran que lo anterior es imposible porque la pared celular actúa como una verdadera barrera física y es necesario degradarla para que los CNTs puedan atravesarla [272, 273]. En contraste, todos los estudios realizados en protoplastos están de acuerdo al demostrar que los CNTs son capaces de atravesar la membrana celular por difusión, penetrando fácilmente a los protoplastos [274, 276].

Por último, vale la pena realizar algunas observaciones a los trabajos de Yuan y Liu. Yuan y colaboradores utilizaron células del mesófilo de hojas obtenidas a partir del corte de la epidermis utilizando una navaja [276], esta metodología pudo causar daños irreparables en algunas células, sin mencionar que en dicho tejido siempre existe una fracción de células muertas y plasmolizadas de manera natural; sin embargo, no se utilizó ningún marcador para diferenciar las células intactas de las células dañadas, por lo que es posible que los SWCNTs utilizados en este estudio hayan penetrado las células con paredes celulares deterioradas. Por otro lado, Liu y colaboradores determinaron que los SWCNTs funcionalizados no covalentemente con FITC pueden atravesar la pared celular y posteriormente acumularse en el sistema vacuolar [275]; sin embargo, las pruebas de internalización presentadas en este estudio demostraron que no es conveniente utilizar a FITC para estudiar la internalización de los CNTs puesto que es capaz de atravesar la pared celular de las células intactas en ausencia de CNTs (Figuras 6.26 y 6.27).

6.3.4. Prueba de biocompatibilidad para MWCNTs

Hasta el momento se ha probado que los CNTs sólo pueden mediar la transformación genética en las células plasmolizadas. No obstante, es importante analizar las implicaciones biológicas y biotecnológicas que surgen a partir de dicha observación. Diversos estudios han afirmado que dependiendo el grado de plasmólisis de una célula, ésta puede ser revertida a través de un cambio en la osmolaridad del medio de cultivo (Capítulo 3 — Figura 2.11) [206, 209-216]. Los cultivos celulares utilizados para la transformación genética y para las pruebas de internalización se encuentran en un medio hipotónico (Materiales y métodos sección B—5.3) el cual permite que las células se plasmolizen de manera natural. Con base en lo anterior, si las células plasmolizadas son transformadas utilizando CNTs, teóricamente es posible revertir la plasmólisis ligera e incipiente, trasladándolas a un medio altamente hipotónico, y así obtener células transgénicas viables. Sin embargo, existe la posibilidad de que los MWCNTs además de promover la entrada de los ácidos nucleicos también eleven la frecuencia de células plasmolizadas y muertas, presentando una actividad tóxica indeseable y un nivel de biocompatibilidad muy bajo. Esto representaría una amenaza tanto para

las células intactas como para aquellas células con una plasmólisis ligera, provocando así la muerte de ambas células. Por consiguiente, para determinar si los MWCNTs presentan una actividad tóxica se realizó una prueba de biocompatibilidad incubando células NT-1 en presencia de MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminos durante 48 h, determinando la viabilidad celular a partir del porcentaje de células plasmolizadas e intactas a partir de una población de 2000 células, utilizando la tinción de exclusión con Azul de Evans (Materiales y métodos sección C–5.6.10).

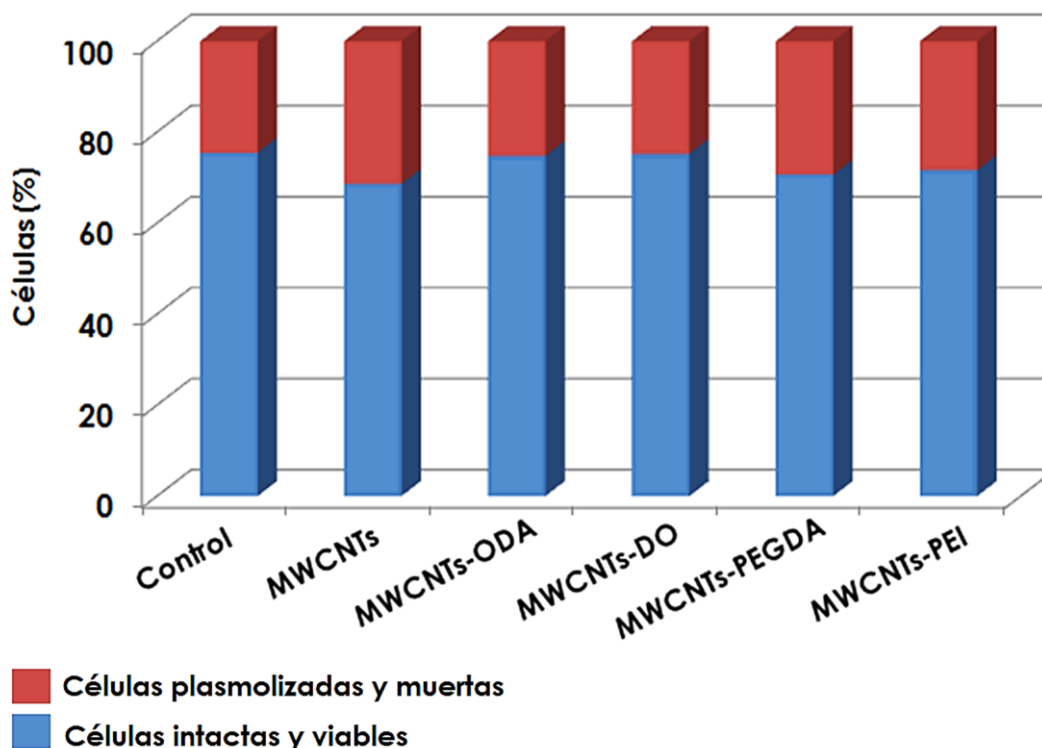


Figura 6.34. Prueba de biocompatibilidad para células NT-1 tratadas durante 48 h con de MWCNTs prístinos y funcionalizados con aminos utilizando una concentración de 50µg/µl.

Tratamientos (50 µg/l)	Células intactas (%)	Células plasmolizadas (%)	χ^2 (G.L.=1; $\alpha=0.05$)	χ^2 (calculada)	Diferencias significativas
Sin tratamiento	75.46485261	24.53514739	-	-	-
MWCNTs prístinos	68.62971517	31.37028483	3.841	1.15990623	No
MWCNTs-ODA	74.78344562	25.21655438	3.841	0.012422977	No
MWCNTs-DO	75.25681108	24.74318892	3.841	0.001165462	No
MWCNTs-PEGDA	70.65897066	29.34102934	3.841	0.586757149	No
MWCNTs-PEI	71.65991903	28.34008097	3.841	0.372208343	No

Tabla 6.1. Tabla que resume los datos estadísticos obtenidos con el software estadístico GraphPad prism 5.04. Se realizó una prueba de χ^2 para determinar si existen diferencias significativas entre la viabilidad celular del tratamiento control y los tratamientos realizados con MWCNTs prístinos y MWCNTs funcionalizados con aminos.

Al observar la gráfica de la Figura 6.34, se puede apreciar que el tratamiento realizado con MWCNTs prístinos presentó la mayor proporción de células plasmolizadas y muertas; sin embargo, el análisis estadístico indica que dicho aumento no es estadísticamente significativo ($p \geq 0.05$). Por su parte, los MWCNTs funcionalizados con aminas, tampoco presentaron un aumento significativo en la proporción de las células plasmolizadas (Figura 6.34 y Tabla 6.1), lo cual es un reflejo del alto nivel de biocompatibilidad que se obtiene tras el proceso de funcionalización, y descartando la posibilidad de que estén involucrados con el proceso de plasmólisis. Por lo tanto la prueba sugiere que dentro de un periodo de incubación de 48 h, un tratamiento de MWCNTs funcionalizados con aminas a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, presenta un alto nivel de biocompatibilidad con las células NT-1, y es recomendable su uso de manera segura para la transformación genética de células plasmolizadas de cultivos celulares en suspensión.

Es importante mencionar que debido a que los MWCNTs prístinos muestran una ligera tendencia al aumento del número de células plasmolizadas en comparación a los MWCNTs funcionalizados con aminas (Figura 6.34 y Tabla 6.1), por lo que es muy probable que si se aumenta su concentración y su periodo de exposición, los efectos tóxicos sobre las células NT-1 sean a la larga notorios y significativos en comparación al resto de los MWCNTs. La mayoría de los estudios realizados en células de mamífero han demostrado que en periodos de exposición cortos de 24 y 48 h, los CNTs prístinos presentan una notable actividad genotóxica y citotóxica [7, 257, 314-329], sobre todo cuando éstos han sido oxidados a través de tratamientos ácidos, porque aumentan considerablemente los niveles de ROS en solución [74-78]. Además, los CNTs prístinos han sido señalados como agentes clastogénicos interactuando con los cromosomas y rompiéndolos, y como agentes aneuploidogénicos interactuando con las proteínas de la maquinaria de segregación dando lugar a un reparto desigual de los cromosomas durante la mitosis [7, 106-110, 113, 114, 257-261, 330]. En contraste, existen estudios que han demostrado que la funcionalización es un método que disminuye considerablemente las propiedades tóxicas de los CNTs [7, 11, 86, 331], particularmente la funcionalización covalente libre de solventes utilizada en el presente estudio ha demostrado aumentar el nivel de biocompatibilidad de los MWCNTs en cultivos de linfocitos humanos, ya que la adición de aminas alifáticas en la superficie de los CNTs los provee de una capa protectora que evita que sus paredes interactúen directamente con la maquinaria celular y otros elementos encontrados dentro y fuera de la célula tales como la cromatina [7].

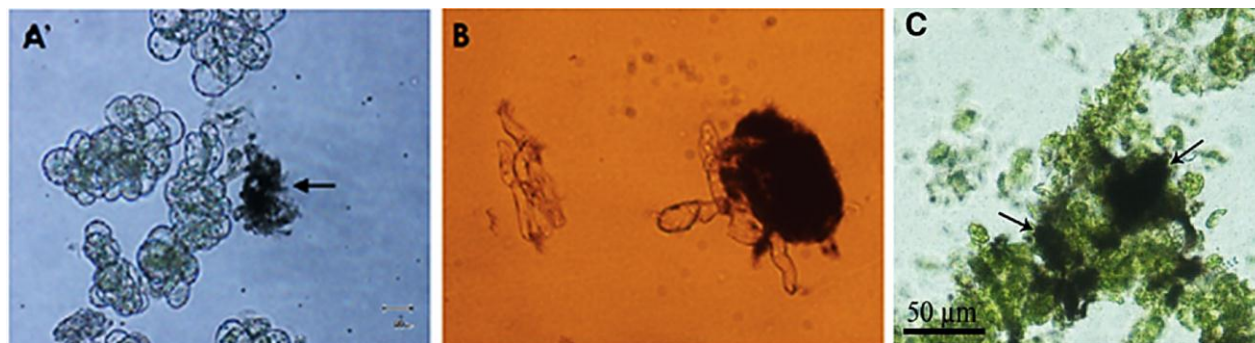


Figura 6.35. Cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* (A) y arroz (B), y de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* (C) rodeando a los aglomerados de CNTs para “sacrificarse” como un posible mecanismo de “respuesta de autodefensa”. Lin, 2009, Tan, 2007, Yuan, 2001[276, 332, 336].

A diferencia de los estudios realizados en células de mamífero, los estudios relacionados con la actividad tóxica de los CNTs en plantas son escasos [8, 275, 276, 313, 329, 332-335]; sin embargo, la mayoría de los estudios coinciden en que son mucho más los efectos positivos que los negativos. Por ejemplo, Khodakovskaya [333] y Tripathi [334] observaron que al incubar semillas de tomate y garbanzo en presencia de MWCNTs, éstas germinaban mucho más rápido que las del control, incluso el crecimiento de las plántulas mostró una tasa de crecimiento mucho mayor. Sin embargo, en cultivos de células [332] y de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* [276], así como en células de arroz

[336] (Figura 6.35) se han hallado evidencias de un mecanismo de “autodefensa”, en el cual algunas células optan por “sacrificarse” y comienzan a rodear los aglomerados de CNTs, evitando así que el resto de la población celular entre en contacto ellos.

Las micrografías confocales (Figura 6.36) revelan que la mayoría de los aglomerados de MWCNTs prístinos se encuentran rodeados principalmente por células plasmolizadas. Sin embargo, ya que la prueba de toxicidad ha indicado que no existe un aumento significativo en el número de células plasmolizadas en presencia de MWCNTs funcionalizados con aminas, no existen evidencias suficientes de un mecanismo de “autodefensa” en las células de NT-1.

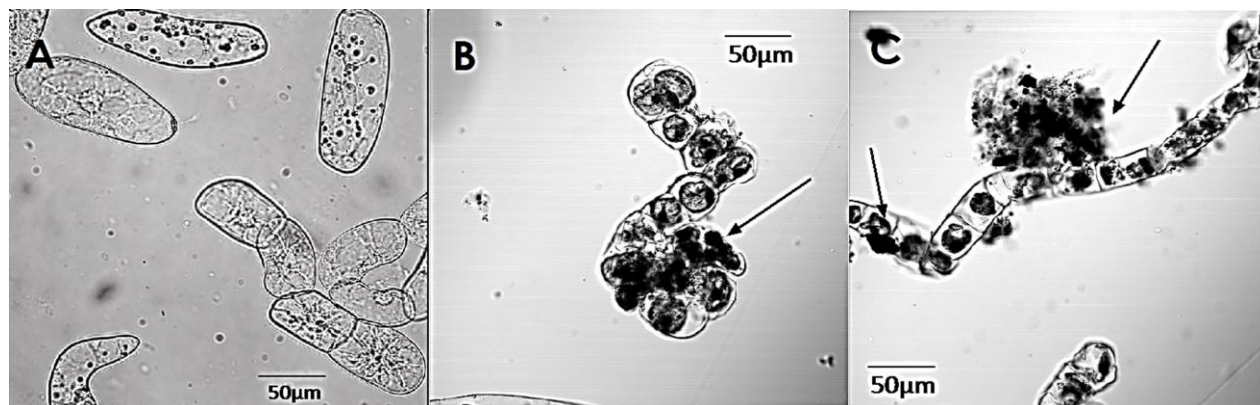


Figura 6.36. Grandes aglomerados de MWCNTs prístinos rodeados por las células NT-1 plasmolizadas (B y C) evitando que las células intactas entren en contacto con ellos (A).

Por último, existe una pregunta que vale la pena intentar responder: ¿Qué sucede con los CNTs una vez que ingresan a las células plasmolizadas? La respuesta a esta pregunta podría encontrarse en los resultados de algunos estudios recientes, los cuales han evidenciado *in vitro* [337] e *in vivo* [338] la degradación enzimática de CNTs con peroxidasas. En plantas las peroxidasas se encuentran ampliamente distribuidas en el interior celular [339], por lo que los CNTs podrían ser biodegradados en los diferentes compartimentos celulares tales como las vacuolas o los peroxisomas, y a largo plazo dejar de ser una amenaza para la célula.

6.4. Perspectivas del uso de CNTs en la transformación genética de plantas

A pesar de que en el presente estudio se determinó que los CNTs no pueden ser utilizados para la transformación genética de las células intactas, realizarla en células plasmolizadas no representa un resultado negativo. Anteriormente, se mencionaron algunos estudios en los que se ha hecho uso de células plasmolizadas para ensayos de transformación genética estable y transitoria [206, 209-216]. Estos estudios sugieren que si las células son transformadas por electroporación en un estado de plasmólisis reversible, es posible obtener células transgénicas viables a través de un cambio en osmolaridad del medio.

El uso de células plasmolizadas presenta ciertas ventajas en comparación con otros métodos que hacen uso de células en suspensión tales como los protoplastos, ya que la plasmólisis es un proceso natural que no requiere de tratamientos enzimáticos para degradar la pared celular. La obtención de células viables a partir de células plasmolizadas requiere únicamente de un cambio en la osmolaridad del medio, mientras que en protoplastos la regeneración completa de la pared celular es proceso laborioso, complicado y muchas veces poco efectivo. Por tal motivo, sería

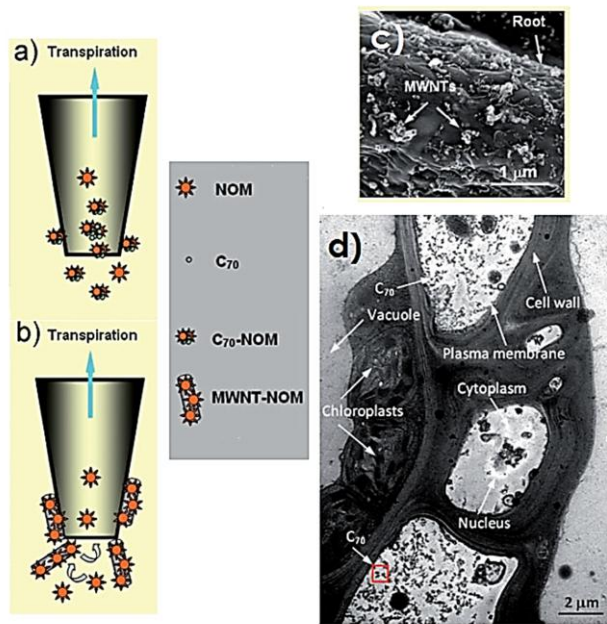


Figura 6.37. Esquema de absorción a través del sistema vascular por el cual se transportan los C₇₀ (a), mientras que los MWCNTs se mantienen atorados en el sistema radicular (b) también detectados por microscopia SEM (c). Micrografía TEM de células vecinas al sistema vascular cuyo interior contiene partículas C₇₀. Lin, 2009 [335].

En un estudio realizado por Lin y colaboradores, se germinaron semillas de arroz en presencia de MWCNTs y fullerenos de 70 carbonos (C₇₀) disueltos en solución de materia natural orgánica (NOM). Cuando las plantas llegaron a un estado adulto se observó por microscopia que únicamente las nanopartículas con menores dimensiones (en su mayoría C₇₀) eran absorbidos por la planta y transmitidos a la siguiente generación de semillas a través del sistema vascular (Figura 6.37) [335]. Smimova y colaboradores, realizaron hallazgos similares al observar la presencia de MWCNTs en el interior de células del sistema vascular de raíces y hojas de *Onobrychis arenaria* (Figura 6.38) [329], cuyas semillas había sido desde un principio germinadas en presencia de MWCNTs. Recientemente, Khodakovskaya [333] y Tripathi [334] demostraron que los MWCNTs son capaces de atravesar la teca de semillas de tomate (Figura 6.39) y garbanzos (Figura 40-A) durante la germinación. En estos estudios también se observó la presencia de MWCNTs en el interior de los elementos traqueales del xilema de la raíz formando largos conductos o canales (Figura 6.40-B) por donde el agua y otros nutrientes se transportaban con mayor eficiencia que en condiciones naturales.

Estos estudios son de particular interés porque a diferencia de otros estadios del desarrollo o en células en suspensión, durante la germinación tanto las tecas de la semilla como las paredes celulares de las células embrionarias se vuelven mucho más permeables por el aumento en la síntesis de enzimas degradadoras. El aumento en la permeabilidad promueve la entrada de agua y otros nutrientes que aumentan el metabolismo de la semilla durante la latencia [340], lo cual es de gran importancia para asegurar la germinación y la supervivencia del embrión. Durante este

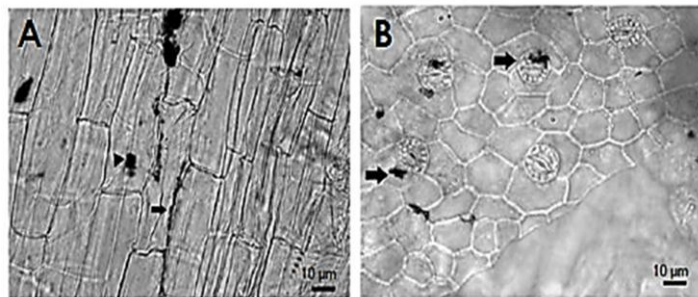


Figura 6.38. MWCNTs localizados al interior de las células del sistema vascular de raíces (A), y hojas de *Onobrychis arenaria* [329].

conveniente realizar las pruebas necesarias para determinar si es posible obtener células viables transgénicas a partir de células plasmolizadas transformadas utilizando CNTs.

No obstante, existe la posibilidad de realizar la transformación genética mediada por CNTs directamente en células intactas, sin hacer uso de cultivos celulares en suspensión, con base en los siguientes argumentos. En un estudio realizado por Lin y colaboradores, se germinaron semillas de arroz en presencia de MWCNTs y fullerenos de 70 carbonos (C₇₀) disueltos en solución de materia natural orgánica (NOM). Cuando las plantas llegaron a un estado adulto se observó por microscopia que únicamente las nanopartículas con menores dimensiones (en su mayoría C₇₀) eran absorbidos por la planta y transmitidos a la siguiente generación de semillas a través del sistema vascular (Figura 6.37) [335]. Smimova y colaboradores, realizaron hallazgos similares al observar la presencia de MWCNTs en el interior de células del sistema vascular de raíces y hojas de *Onobrychis arenaria* (Figura 6.38) [329], cuyas semillas había sido desde un principio germinadas en presencia de MWCNTs. Recientemente, Khodakovskaya [333] y Tripathi [334] demostraron que los MWCNTs son capaces de atravesar la teca de semillas de tomate (Figura 6.39) y garbanzos (Figura 40-A) durante la germinación. En estos estudios también se observó la presencia de MWCNTs en el interior de los elementos traqueales del xilema de la raíz formando largos conductos o canales (Figura 6.40-B) por donde el agua y otros nutrientes se transportaban con mayor eficiencia que en condiciones naturales.

Este periodo, algunas partículas suspendidas en solución como los CNTs, podrían penetrar con mayor facilidad la teca de la semilla y las paredes de las células embrionarias, particularmente las del sistema vascular.

Por lo tanto, si lo anterior es factible, y a diferencia de lo que sucede en cultivos celulares en suspensión, hipotéticamente la germinación podría ser un periodo ideal donde la pared celular no sea un impedimento para que los CNTs puedan mediar la transformación genética de

células intactas. Por lo tanto, es recomendable realizar los experimentos necesarios utilizando semillas de diferentes especies de plantas durante la germinación con el objetivo validar esta hipótesis, ya que hasta la fecha no existe ningún reporte que la pueda evidenciar.

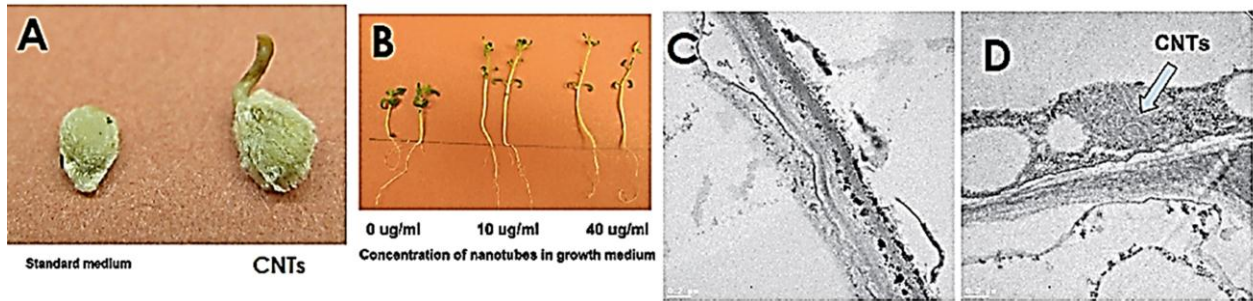


Figura 6.39. Comparación entre dos semillas de tomate germinadas en ausencia y presencia de MWCNTs (A). Plántulas tratadas con diferentes concentraciones de MWCNTs (B). Micrografías TEM del sistema vascular de embriones incubados en ausencia (C) y presencia de MWCNTs (D). Khodakovskaya, 2009 [333].

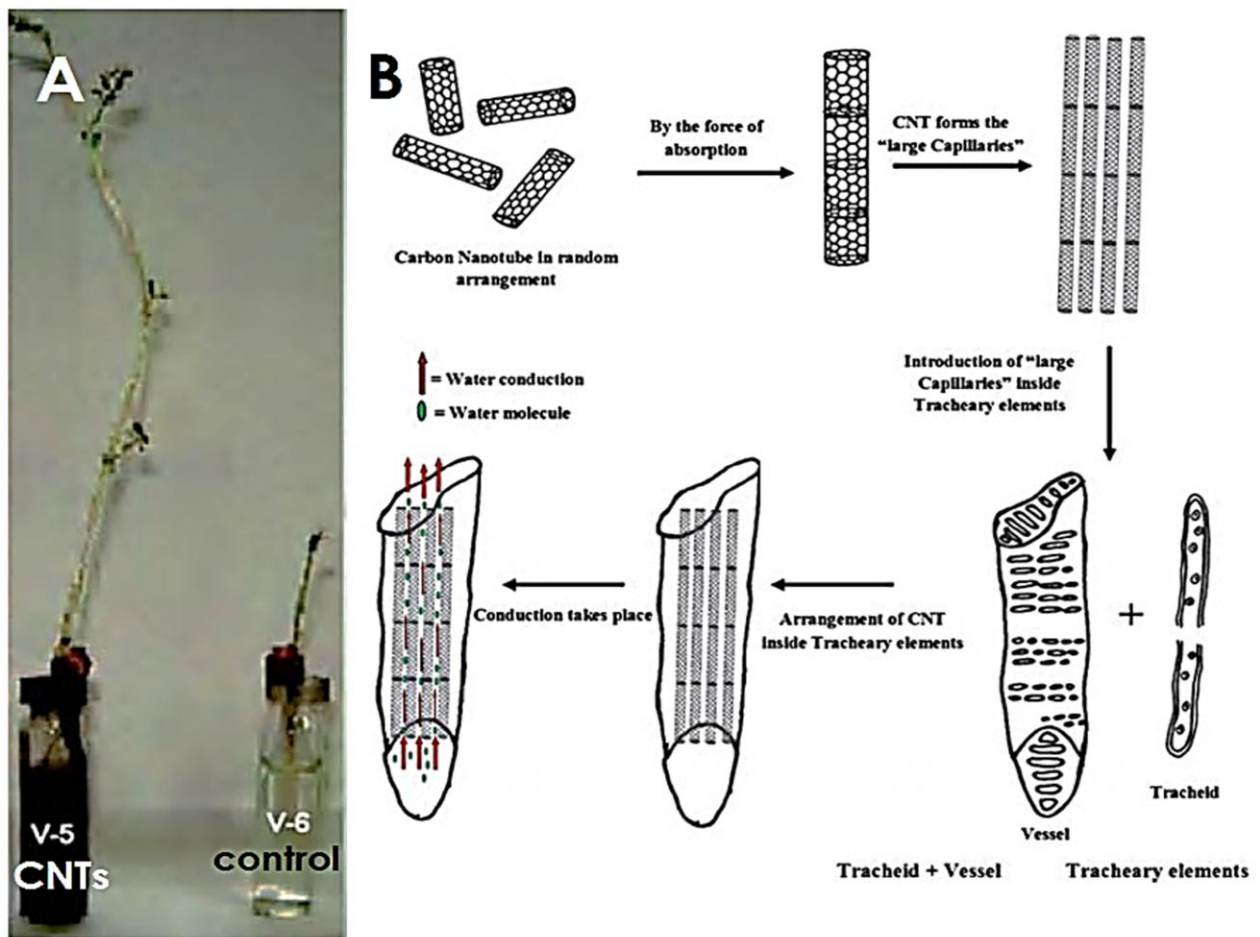


Figura 6.40. Comparación entre dos plantas de garbanzos crecidas en presencia y ausencia de MWCNTs (A). Representación esquemática de la formación de “canales” por MWCNTs dentro de los elementos traqueales (B). Tripathi, 2011 [334].

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de la presente investigación y de acuerdo con los objetivos planteados son las siguientes:

- Se determinó que la funcionalización realizada a los MWCNTs prístinos con aminas alifáticas resultó exitosamente en la unión covalente de los grupos amino y los defectos localizados en la superficie de los mismos.
- Los MWCNTs prístinos y funcionalizados con aminas no son capaces de promover la transformación genética en las células intactas de *Nicotiana tabacum* en suspensión, pero sí son capaces de promoverla en las células en proceso de plasmólisis, las cuales expresaron exitosamente a la proteína de fusión nCBP-GFP en el citoplasma.
- Los MWCNTs prístinos y funcionalizados con aminas no pueden penetrar a través de la pared celular de las células intactas, pero sí atraviesan la pared de las células plasmolizadas.
- Los MWCNTs prístinos y funcionalizados con aminas presentaron un alto nivel de biocompatibilidad debido a que no aumentan la frecuencia de los eventos de plasmólisis ni de los eventos de muerte celular.

Con base en lo anterior y analizando la hipótesis del presente estudio, se concluye que los CNTs no son una opción para transformar células intactas en suspensión, pero sí son una opción para llevar a cabo ensayos de transformación genética transitoria en las células en proceso de plasmólisis. Por lo tanto, este método es una alternativa atractiva para los métodos de transformación genética existentes en plantas, debido a las implicaciones biotecnológicas que trae consigo.

ABREVIATURAS

A

AFM: Microscopia de fuerza atómica
AIA: Ácido indolacético
AtnCBP-GFP: Plásmido que codifica para la proteína de fusión nCBP-GFP bajo un promotor constitutivo 35S de plantas
ATP: Adenosín trifosfato

B

BAP: bencilaminopurina
BAR: Gene que confiere resistencia a BASTA
BASTA: Glufosinato de amonio
BY-2: Línea celular de *Nicotiana tabacum* variedad Bright-Yellow-2
Bs: Cromosomas B
BSA: Albuminosa de suero bovino

C

CaMV: Virus del mosaico de la coliflor
CMV: Virus del mosaico del pepino
CNTs: Nanotubos de carbono
CTV: Cultivo de tejidos vegetales
CTX-B: Tóxina B del cólera
CXCR4: Receptores de quimiocinas tipo 4
CY-3: Cianina-3
C₆₀: Fullerenos de 60 átomos de carbono
C₇₀: Fullerenos de 70 átomos de carbono

D

DCC: N, N'-díciclo hexil carbodiimida
DIBOA: 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazolin-3-one
DIMBOA: 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazolin-3-one
DMF: Dimetilformamida
DNA-alexa555: DNA marcado con Alexa® Fluor 555-NHS
DO: 1,8-diamino octano
dsDNA: DNA de doble cadena
dsRed: Proteína roja fluorescente
D-FITC: Dextranas marcadas con FITC

E

EDC: 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) – carbodimida
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

F

FITC: fluorescein isotiocianato
FT-IR: Espectroscopia en el Infrarrojo

G

GFP: Proteína verde fluorescente
GUS: β-glucuronidasa

H

HeLa: Células epiteliales humanas de carcinoma cervical
HRTEM: Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución
HUVEC: Células endoteliales de venas de cordón umbilical humano
H1299: Células de cáncer pulmonar de mamífero

K

Kin: Kinetina
KmR: Gene que confiere resistencia a kanamicina

L

LAEMA
LTRs: Repeticiones terminales largas

M

MBOA: 6-Metoxi-benzoxazolin-2-one
mRNA: RNA mensajero
MS: Medio Murashige Skoog
mTERT: Subunidad catalítica de la telomerasa de ratón
MUG: 4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido
MuLV: virus de la leucemia murina **MWCNTs:** Nanotubos de carbono de paredes múltiples
MWCNTs-NH₂: MWCNTs que presentan grupos aminos
MWCNTs-COOH: MWCNTs que presentan grupos carboxilo
MWCNTs-CH₂-CH₂-CH₃: MWCNTs que presentan grupos alquilo
MWCNTs-PEGDA: MWCNTs funcionalizados covalentemente con PEGDA
MWCNTs-PEI: MWCNTs funcionalizados covalentemente con PEI
MWCNTs-DO: MWCNTs funcionalizados covalentemente con DO
MWCNTs-ODA: MWCNTs funcionalizados covalentemente con ODA

N

nCBP: Proteína novedosa de unión a CAP
NHS: N-hidroxi succinimidil éster

NOM: Materia orgánica suspendida en solución
NT-1: Línea celular de *Nicotiana tabacum* variedad Bright-Yellow
NT-X: Línea celular de *Nicotiana tabacum* variedad Xanthi

O

ODA: 1,-octadecil amina
OECD: Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo
OEG-DA: Oligoetilenglicol diamina
OMGs: Organismos genéticamente modificados

P

PAA: polialilamina
PACs: Minicromosomas artificiales de plantas
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PEGDA: Polietilenglicol diamina
PEI: Polietileneimina
PI: Ioduro de propidium
PIPES: Ácido 1,4-piperazine dietano-N, N-bis2 sulfónico
PL: Fosfolípidos
PSS: Poliestireno-sulfonato
PVA: Alcohol polivinílico
PVP: Polivinilpirrolidona
PVX: Virus del mosaico de la papa

R

RFP: Proteína roja fluorescente
ROS: Especies reactivas de oxígeno

S

SDS: Dodecil sulfato de sodio
SEM: Microscopia electrónica de barrido
siRNA: RNA interferente
ssDNA: DNA de cadena sencilla
STM: Microscopio de tunelaje
SWCNTs: Nanotubos de carbono de pared sencilla
SWCNTs-ox: SWCNTs oxidados
SWCNTs-FITC: SWCNTs oxidados funcionalizados no covalentemente con FITC por apilamiento π - π

T

TC: Medio de inducción y mantenimiento para callo
TEM: Microscopio electrónico de transmisión
TGA: Termogravimetría
THF: Tetrahidrofurano
TMV: Virus del mosaico del tabaco
Tris-CI: Tris (hidroximetil)aminometano
TRITC: Tetrametil rodamina

TRPC3: Canal de potencial receptor transitorio 3
TS: Medio de inducción y mantenimiento para suspensión celular
T-DNA: Fragmento de DNA transferido por *Agrobacterium tumefaciens*

X

X-Gluc: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico

#

2iP: 2-indolaminopurina
2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético

REFERENCIAS

1. Schalkhammer, T., *Bionanodevices*, in *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, A.S. Publishers, Editor. 2004: U.S.A. p. 339.
2. Mark, D., *Nanomaterials a risk to health at work?*, in *First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials.*, D. Mark, Editor. 2004: Palace Hotel, Buxton, Derbyshire, U.K.
3. Hunt, W.H., *Nanomaterials: Nomenclature, Novelty, and Necessity*. Journal of Metals, 2004. **56**: p. 13-18.
4. Wickramasinghe, N., S. Choudhary, and E. Geisler, *Bionanotechnology: its applications and relevance to healthcare*. International Journal of Biomedical Engineering and Technology, 2007. **1**: p. 41-58.
5. Cass, T., *Bionanotechnology II: from biomolecular assembly to applications*. IDrugs, 2009. **12**(3): p. 163-4.
6. Colvin, V.L., *The potential environmental impact of engineered nanomaterials*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(10): p. 1166-70.
7. Ochoa-Olmos, O.E., et al., *Genotoxic properties of nylon-6/MWNTs nanohybrid*. J Nanosci Nanotechnol, 2009. **9**(8): p. 4727-34.
8. Basiuk, E.V., O.E. Ochoa-Olmos, and L.F. De la Mora-Estrada, *Ecotoxicological effects of carbon nanomaterials on algae, fungi and plants*. J Nanosci Nanotechnol, 2011. **11**(4): p. 3016-38.
9. Saito, N., et al., *Carbon nanotubes: biomaterial applications*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(7): p. 1897-903.
10. Tian, F., et al., *Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts*. Toxicol In Vitro, 2006. **20**(7): p. 1202-12.
11. Bianco, A., et al., *Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes*. Chem Commun (Camb), 2005(5): p. 571-7.
12. Contreras-Torres, F.F., O.E. Ochoa-Olmos, and E.V. Basiuk, *Amine-Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes An Atomic Force Microscopy Study*. Journal of Scanning Probe Microscopy, 2009. **4**: p. 1-7.
13. Kroto, H.W., et al., *Buckminsterfullerene*. Nature, 1985. **318**: p. 162-163.
14. Dresselhaus, G., M.S. Dresselhaus, and P. Avouris, *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Applications*. . Topics in Applied Physics. Vol. 80. 2001, Berlin; : Springer Berlin-Heidelberg 42.
15. Daenen, M.J.M., et al. *Multi Disciplinair Project: Wondrous World of Carbon Nanotubes*. . 2003 [cited 2010; Available from: <http://students.chem.tue.nl/ifp03>].
16. Hersam, M.C., *Progress towards monodisperse single-walled carbon nanotubes*. Nat Nanotechnol, 2008. **3**(7): p. 387-94.
17. Monthieux, M. and M. Monthieux, *Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes?* Carbon, 2006. **44**: p. 1621.
18. Iijima, S. and T. Ichihashi, *Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter*. . Nature, 1993 **363**(603-605.).
19. Bethune, D., et al., *Cobalt catalyzed growth of carbon nanotubes with singleatomic-layer walls*. . Nature 1993. **363**: p. 605 - 607.
20. Hughes, T. and C. Chambers. 1889: US
21. Schützenberger, P. and L. Schützenberger, *Sur quelques faits relatifs à l'histoire du carbone*. C R Acad Sci Paris, 1890. **111**: p. 774-778.
22. Pélabon, C. and H. Pélabon, *Sur une variété de carbone filamenteux*. C R Acad Sci Paris, 1903. **137**: p. 706-708.
23. Radushkevich, L. and V. Lukyanovich, *O strukture ugljeroda, obrazujucegosja pri termiceskom razlozenii okisi ugljeroda na zeleznom kontakte*. Zurn Fisic Chim, 1952. **26**: p. 88-95.
24. Hillert, M. and N. Lange, *The structure of graphite filaments*. Z Kristallogr, 1958. **111**: p. 24-34.
25. Oberlin, A., M. Endo, and T. Koyama, *Filamentous growth of carbon through benzene decomposition*. J Cryst Growth, 1976. **32**: p. 335-349.
26. Boehm, H., *Carbon from carbon monoxide disproportionation on nickel and iron catalysts: morphological studies and possible growth mechanisms*. Carbon, 1973. **11**(583-590).
27. Iijima, S., *Helical microtubules of graphite carbon*. Nature, 1991. **354**: p. 56-58.
28. Ball, P. *Focus on carbon nanotubes*. 1999 [cited 2011; Available from: <http://www.nature.com/news/1999/991126/full/news991202-1.html>].
29. Zhu, H.W., et al., *Direct synthesis of Long Singled-Walled Carbon Nanotube Strands*. Science, 2002 **296**: p. 884-886.
30. Balasubramanian, K. and M. Burghardm, *Chemically Functionalized Carbon Nanotubes*. Small, 2005. **1**: p. 180-192.
31. Dai, H., *Carbon nanotubes: Opportunities and challenges*. Surface Science, 2002. **500**: p. 218-241.
32. Houllister, P., H.T. E., and C. Vas Román (2003) *Nanotubes White paper*.
33. Dresselhaus, M.S., G. Dresselhaus, and P.C. Eklund, *Science of fullerenes and carbon nanotubes*. Vol. 1. 1996, USA;: Academic Press.
34. Thess, A., et al., *Crystalline ropes of metallic nanotubes* Science, 1996. **273**: p. 483-487.

35. Alcaa-Quispe, F., *Estructura y síntesis de nanotubos de carbono*, in *Facultad de Ciencia Físicas*. 2005, Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Lima. p. 37.
36. Dresselhaus, M.S., G. Dresselhaus, and R. Saito, *Physical properties of carbon nanotubes*. . Vol. 1. 1998, U.K.: Imperial College Press.
37. Tanaka, K., Y. Yamabe, and K. Fukui, *The science and technology of carbon nanotubes*. Vol. 1. 1999: Elsevier. 191.
38. Zhao, X., et al., *Preparation of highgrade carbon nanotubes by hydrogen arc discharge*. *Carbon* 1997 **35**: p. 775-781.
39. Hamada, N., S. Sawada, and A. Oshiyama, *New one-dimensional conductors: Graphitic microtubules*. *Physical Review Letters*, 1992. **68**: p. 1579-1581.
40. Kageyama, T., *カーボンナノチューブのマニピュレーション (Manipulating carbon nanotubes)*. 2007, Kochi University of Technology p. 17.
41. Liu, X., *Synthesis, Devices and Applications of Carbon Nanotubes*, in *Faculty of the Graduate School*. 2006 University of Souther California. p. 130.
42. Feng, Q.-P., et al., *Length sorting of multi-walled carbon nanotubes by highspeed centrifugation*. *Carbon* 2007 **45**: p. 2311-2313.
43. Basiuk, E.V., et al., *Direct Solvent-Free Amination of Closed-Cap Carbon Nanotubes: A Link to Fullerene Chemistry*. *Nano Letters*, 2004. **4**: p. 863-866.
44. Charlier, J.-C., *Defects in Carbon Nanotubes*. *Accounts of Chemical Research* 2002. **35**: p. 1063-1069.
45. Hirsch, A., *Functionalization of single-walled carbon nanotubes*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002. **41**(11): p. 1853-9.
46. Basiuk, E.V., et al., *Gas-phase functionalization of carbon nanotubes*. *Materials Letters*, 2006 **60**: p. 3741-3746.
47. Kwon, Y.-K. and D. Toma'nek, *Electronic and structural properties of multiwall carbon nanotubes*. *Physycal Review B*, 1998. **58**: p. R1600/1-R1600/4.
48. Charlier, J.C., *Defects in carbon nanotubes*. *Acc Chem Res*, 2002. **35**(12): p. 1063-9.
49. Rodney, S.R., D. Q., and W.K. L., *Mechanical properties of carbon nanotubes theoretical predictions*. *Le Centre de Ressources Physique*, 2008. **4**: p. 993-1008.
50. Smith, L.O.C., S.J. , *Química Orgánica*. 1970 Mexico: Retrerté Mexicana.
51. Llaguno, M.C., et al., *Thermal Conductivity of Single Wall Carbon Nanotubes: Diameter and Annealing Dependence*. *Chemical Physics Letters*, 2001. **331**: p. 21-25.
52. Ziegler, K.J., *Developing implantable optical biosensors*. *Trends in Biotechnology*, 2005. **23**: p. 440-444.
53. Kataura, H., et al., *Optical Properties of Single-Walled Nanotubes*. *Synthetic Metals*, 1999. **103**(2555-2558).
54. Schönenberger, C. (2000) *Multiwall Carbon Nanotubes Physics World*.
55. Cherian, R. and P. Mahadevan, *Elastic Properties of Carbon Nanotubes: An atomistic approach*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2006. **7** p. 1779-1782.
56. Hornbaker, D.J., *Electronic Structure of Carbon Nanotube Systems Measured with scanning Tunneling Microscopy*, in *Graduate College of the University of Illinois*. 2003, University of Illinois: Illinois. p. 103.
57. Bernholc, J., et al., *Mechanical and Electrical properties of Nanotubes*. *Annual Review of Materials Research*, 2002. **32**: p. 247-375.
58. Tombler, T., et al., *Reversible electromechanical characteristics of carbon nanotubes under local-probe manipulation*. . *Nature* . 2000. **405**: p. 769-772.
59. Maiti, A., *Mechanical deformation in carbon nanotubes - bent tubes vs. tubes pushed by atomically sharp tips*. *Chemical Physics Letters* 2000. **331**(1): p. 21-25.
60. Ménard, C., et al., *Building blocks for the nanoworld*, in *Functionalizing carbon nanotubes for nanobiotechnology*, B. Bouquin, Editor. 2005, Clefs CEA: France. p. 75-82.
61. Duque, J., et al., *Diameter-Dependent Solubility of Single-Walled Carbon Nanotubes*. *ACS Nano*, 2010. **4** (6): p. 3063-3072.
62. Koshio, A., et al., *A Simple Way to Chemically React Single-Wall Crabon Nanotubes with Organic Materials Using Ultrasonication*; in *Nano Letters Nano Letters*, 2001. **1**(7): p. 361-363.
63. Chen, H., et al., *Dispersion of carbon nanotubes and polymer nanocomposite fabrication using trifluoroacetic acid as a co-solvent* *Nanotechnology*, 2007(41): p. 415606
64. Basiuk, E.V., et al., *"Green" functionalization of pristine multi-walled carbon nanotubes with long-chain aliphatic amines*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2011. **11**(6): p. 5546-54.
65. Bianco, A., et al., *Carbon nanotube-based vectors for delivering immunotherapeutics and drugs*, in *Nanotechnologies for the Life Sciences*. 2007, Wiley.
66. Sun, Y., et al., *Functionalized Carbon Nanotubes: Properties and Applications*. *Acc. Chem. Res.* , 2002. **35**: p. 1096-1104.
67. Murakami, H., et al., *Noncovalent porphyrin-functionalized single-walled carbon nanotubes: solubilization and spectral behaviors*. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2007. **11**(6): p. 418-427.
68. Hernandez, E., et al., *Fullerenes coalescence in nanopeapods: a path to novel tubular carbon*. . *Nano Letters*, 2003. **3**: p. 1037-1042.

69. Hadidi, N., et al., *Optimization of single-walled carbon nanotube solubility by noncovalent PEGylation using experimental design methods*. Int J Nanomedicine, 2011. **6**: p. 737-46.
70. Basiuk, V.A. and B.E. V., *Solvent-Free Techniques for Carbon Nanotube Derivatization*, in *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. 2008, American Scientific Publishers: USA.
71. Chen, J., et al., *Solution properties of single-walled carbon nanotubes*. Science, 1998. **282**(5386): p. 95-8.
72. Basiuk, V.A., et al., "Green" derivatization of carbon nanotubes with Nylon 6 and L-alanine. Journal of Materials Chemistry, 2006. **16**: p. 4420-4426.
73. Saito, Y., et al., *Conical beams from open nanotubes*. Nature 1997. **389**: p. 554-555
74. Pietroiusti, A., et al., *Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development*. ACS Nano, 2011. **5**(6): p. 4624-33.
75. Ren, L. and W. Zhong, *Oxidation Reactions Mediated by Single-Walled Carbon Nanotubes in Aqueous Solution*. Environ. Sci. Technol. , 2010. **44**: p. 6954-6958.
76. Vittorio, O., V. Raffa, and A. Cuschieri, *Influence of purity and surface oxidation on cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes with human neuroblastoma cells*. Nanomedicine, 2009. **5**(4): p. 424-31.
77. Bottini, M., et al., *Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis*. Toxicol Lett, 2006. **160**(2): p. 121-6.
78. Patlolla, A., B. Knighten, and P. Tchounwou, *Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells*. Ethn Dis, 2010. **20**(1 Suppl 1): p. S1-65-72.
79. Niyogi, S., et al., *Chemistry of single-walled carbon nanotubes*. Acc Chem Res, 2002. **35**(12): p. 1105-13.
80. Haddon, R.C., *Pyramidalization: Geometrical interpretation of the π -orbital axis vector in three dimensions*. J Phys Chem 1987. **91**: p. 3719-3720.
81. Basiuk, E.V., et al., *Solvent-free derivatization of pristine multiwalled carbon nanotubes with amines*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2005. **5** (6): p. 984-990.
82. Li, X., et al., *C60 modified single - walled carbon nanotubes*. Chemical Physics Letters, 2003. **377**: p. 32-36.
83. Dyke, C.A. and J.M. Tour, *Solvent-free functionalization of carbon nanotubes*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(5): p. 1156-7.
84. Basiuk, E.V., et al., *Interaction of Oxidized Single - Walled Carbon Nanotubes with Vaporous Aliphatic Amines*. Journal of Physical Chemistry B 2002. **106**: p. 1588-1597.
85. Basiuk, E.V., et al., *Nanohybrids of nylon 6 with multi-walled carbon nanotubes: solvent-free polymerization of epsilon-caprolactam under variable experimental conditions*. J Nanosci Nanotechnol, 2009. **9**(5): p. 3313-9.
86. Salvador-Morales, C., et al., *Effects of covalent functionalization on the biocompatibility characteristics of multi-walled carbon nanotubes*. J Nanosci Nanotechnol, 2008. **8**(5): p. 2347-56.
87. Sobhi, D., et al., *A review of DNA functionalized/grafted carbon nanotubes*. Sensors and Actuators B, 2007. **122** (672-682).
88. Li, S., et al., *DNA-directed self-assembling of carbon nanotubes*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(1): p. 14-5.
89. Zhao, X. and J.K. Johnson, *Simulation of adsorption of DNA on carbon nanotubes*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(34): p. 10438-45.
90. Zheng, M., et al., *DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes*. Nat Mater, 2003. **2**(5): p. 338-42.
91. Martin, W., W. Zhu, and G. Krilov, *Simulation study of noncovalent hybridization of carbon nanotubes by single-stranded DNA in water*. J Phys Chem B, 2008. **112**(50): p. 16076-89.
92. Gao, H. and Y. Kong, *Simulation of DNA-Nanotubes Interactions*. Annu. Rev. Mater. Res., 2004. **34**: p. 123-50.
93. Dovbeshko, G.I., et al., *Study of DNA interaction with carbon nanotubes*. Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics, 2003. **6**: p. 105-108.
94. Tu, X., et al., *DNA sequence motifs for structure-specific recognition and separation of carbon nanotubes*. Nature, 2009. **460**(7252): p. 250-3.
95. Rege, K., et al., *In vitro transcription and protein translation from carbon nanotube-DNA assemblies*. Small, 2006. **2**(6): p. 718-22.
96. Liang, Z., et al., *Solubilization of Single-walled Carbon Nanotubes with Singlestranded DNA Generated from Asymmetric PCR*. Int. J. Mol. Sci., 2007. **8**: p. 705-713.
97. Wang, S.G., et al., *DNA biosensors based on self-assembled carbon nanotubes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(4): p. 1433-7.
98. Martinez, M.T., et al., *Label-free DNA biosensors based on functionalized carbon nanotube field effect transistors*. Nano Lett, 2009. **9**(2): p. 530-536.
99. Zhu, N., et al., *Sensitive impedimetric DNA biosensor with poly(amidoamine) dendrimer covalently attached onto carbon nanotube electronic transducers as the tether for surface confinement of probe DNA*. Biosens Bioelectron, 2010. **25**(6): p. 1498-14503.
100. Tang, X., et al., *Carbon Nanotube DNA Sensor and Sensing Mechanism*. Nano Letters, 2006. **6**(8): p. 1632-1636.
101. Gao, L., et al., *Carbon Nanotube Delivery of the GFP Gene into Mammalian Cells*. ChemBioChem, 2006. **7**: p. 239-242.
102. Singh, R., et al., *Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(12): p. 4388-96.

103. Cai, D., et al., *Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing*. Nature Methods 2005. **2**: p. 449-454
104. Liu, Y., et al., *Polyethylenimine-Grafted Multiwalled Carbon Nanotubes for Secure Noncovalent Immobilization and Efficient Delivery of DNA*. Angew. Chem. Int. Ed. , 2005. **44**: p. 4782 -4785.
105. Yu, B.-Z., J.-F. Ma, and W.X. Li, *Polyethylenimine-Modified Multiwalled Carbon Nanotubes for Plasmid DNA Gene Delivery*. Nature Precedings 2009. <<http://hdl.handle.net/10101/npre.2009.2753.1>>.
106. Nunes, A., et al., *Hybrid polymer-grafted multiwalled carbon nanotubes for in vitro gene delivery*. Small, 2010. **6**(20): p. 2281-91.
107. Kam, N.W., Z. Liu, and H. Dai, *Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(36): p. 12492-3.
108. Zhang, Z., et al., *Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(16): p. 4933-9.
109. Yang, R., et al., *Single-walled carbon nanotubes-mediated in vivo and in vitro delivery of siRNA into antigen-presenting cells*. Gene therapy, 2006. **13**: p. 1714–1723.
110. Lanner, J.T., et al., *Knockdown of TRPC3 with siRNA coupled to carbon nanotubes results in decreased insulin-mediated glucose uptake in adult skeletal muscle cells*. FASEB J, 2009. **23**(6): p. 1728-38.
111. Liu, Z., et al., *siRNA Delivery into Human T Cells and Primary Cells with Carbon-Nanotube Transporters*. Angew. Chem. Int. Ed. , 2007. **46**: p. 2023 -2027.
112. Wang, X., J. Ren, and X. Qu, *Targeted RNA interference of cyclin A2 mediated by functionalized single-walled carbon nanotubes induces proliferation arrest and apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells*. ChemMedChem, 2008. **3**(6): p. 940-5.
113. Ahmed, M., et al., *Cationic glyco-functionalized single-walled carbon nanotubes as efficient gene delivery vehicles*. Bioconjug Chem, 2009. **20**(11): p. 2017-22.
114. Kam, N.W., Z. Liu, and H. Dai, *Carbon Nanotubes as Intracellular Transporters for Proteins and DNA: An Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway*. Angew. Chem. Int. Ed., 2006 **45**: p. 577 -581.
115. Pantarotto, D., et al., *Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery*. Angew Chem Int Ed Engl, 2004. **43**(39): p. 5242-6.
116. Takahashi, H., et al., *AFM imaging of wrapped multiwall carbon nanotube in DNA*. Chemical Physics Letters, 2005. **418**: p. 535-539.
117. Li, X., Y. Peng, and X. Qu, *Carbon nanotubes selective destabilization of duplex and triplex DNA and inducing B-A transition in solution*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(13): p. 3670-6.
118. Cui, D., et al., *Encapsulation of pt-labelled DNA molecules inside carbon nanotubes*. Mech Chem Biosyst, 2004. **1**(2): p. 113-21.
119. Gao, H. and Y. Kong, *Simulation of DNA-nanotube interactions*. Annual Review of Materials Research 2004. **34**: p. 123-150.
120. Contreras-Torres, F. and E. Martínez-Lorán, *DNA insertion in and wrapping around carbon nanotubes*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, 2011. doi: **10.1002/wcms.60**.
121. Johnson, R.R., A.T. Johnson, and M.L. Klein, *Probing the structure of DNA-carbon nanotube hybrids with molecular dynamics*. Nano Lett, 2008. **8**(1): p. 69-75.
122. Johnson, R.R., A.T. Johnson, and M.L. Klein, *The nature of DNA-base-carbon-nanotube interactions*. Small, 2010. **6**(1): p. 31-4.
123. Meng, S., et al., *DNA nucleoside interaction and identification with carbon nanotubes*. Nano Lett, 2007. **7**(1): p. 45-50.
124. Kam, N.W.S. and H. Dai, *Single walled carbon nanotubes for transport and delivery of biological cargos*. phys. stat. sol. (b) 2006. **243**(13): p. 3561-3566
125. Bull, A., G. Holt, and M. Lilly, *Biotechnology. International Trends And Perspectives*. 1982, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): Paris, France. p. 78.
126. Hadjantonakis, A.K. and A. Nagy, *The color of mice: in the light of GFP-variant reporters*. Histochem Cell Biol, 2001. **115**(1): p. 49-58.
127. Wieczorek, A., *Use of Biotechnology in Agriculture-Benefits and Risks*, in BIO-3. 2003, College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR): Hawaii. p. 1-6.
128. Christou, P. and T. Capell, *Genetically modified plants in Encyclopedia of life sciences*, L. John Wiley & Sons, Editor. 2007. p. 10.
129. Crouzet, P. and B. Hohn, *Transgenic plants*, in *Encyclopedia of Life Sciences*, J.W. Sons, Editor. 2002. p. 7.
130. Khush, G.S., *Green revolution: the way forward*. Nature Reviews 2001. **22**: p. 815-822.
131. Calva-Calva, G. and J. Pérez-Vargas, *Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro*, in *Revista Digital Universitaria*. 2005, Coordinación de Publicaciones Digitales. DGSCA-UNAM: México, D.F. p. 2-16.
132. Clough, S.J. and A.F. Bent, *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. Plant J, 1998. **16**(6): p. 735-43.

133. Street, H.E., *Cell (suspension) cultures techniques*, in *Plant tissue and cell culture*, H.E. Street, Editor. 1977, Blackwell Scientific Publishing: Oxford, England. p. pp. 61-102.
134. Krikorian, A.D. and D.L. Berquam, *Plant cell and tissue culture: The role of Haberlandt*. Bot. Rev. , 1969. **35**(1): p. 59-88.
135. Ferl, R. and A.L. Paul, *Genome organization and expression*. , in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W.G. W. and R. Jones, Editors. 2000, American Society of Plant Physiologists: USA. p. 312-357. .
136. Sugimoto, K., Y. Jiao, and E.M. Meyerowitz, *Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway*. Dev Cell, 2010. **18**(3): p. 463-71.
137. Sondahl, M.R. and W.R. Sharp, *High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of Coffea arabica L.* Z. Pflanzenphysiol. , 1977. **81**: p. 395-408.
138. Murashige, T. and F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. , 1962. **15**(3): p. 473-497.
139. Crozier, A., et al., *Biosynthesis of hormones and elicitors molecules in Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B.B. B, W. Gruissem, and R. Jones, Editors. 2000, American Society of Plant Physiologists p. 850-929.
140. Aitchison, P.A., A.J. Macleod, and M.M. Yeoman, *Growth patterns in tissue (callus) cultures*, in *Plant tissue and cell culture*, H.E. Street, Editor. 1977, Blackwell Sci. Publ.: Oxford, England. p. 267-306.
141. Chalberg, T.W., J.E. Phillips, and M.P. Calos, *Transfection of DNA into mammalian cells in culture*, in *Encyclopedia of Life Sciences*, J.W. Sons, Editor. 2005. p. 6.
142. Groskreutz, D. and E.T. Schenborn, *Reporter systems*. Methods Mol Biol, 1997. **63**: p. 11-30.
143. Klein, T.M., et al., *Stable genetic transformation of intact Nicotiana cells by the particle bombardment process*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(22): p. 8502-5.
144. Jung, S., et al., *Gene silencing efficiency of siRNA-PEG conjugates: effect of PEGylation site and PEG molecular weight*. J Control Release, 2010. **144**(3): p. 306-13.
145. Malek, A., F. Czubyko, and A. Aigner, *PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-induced gene targeting efficacy*. J Drug Target, 2008. **16**(2): p. 124-39.
146. Knight, M., et al., *Polyethylenimine (PEI) mediated siRNA gene silencing in the Schistosoma mansoni snail host, Biomphalaria glabrata*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(7): p. e1212.
147. Lee, Y., et al., *Controlled synthesis of PEI-coated gold nanoparticles using reductive catechol chemistry for siRNA delivery*. J Control Release, 2011. **155**(1): p. 3-10.
148. Kraus, A., et al., *Non-viral genetic transfection of rat Schwann cells with FuGENE HD(c) lipofection and AMAXA(c) nucleofection is feasible but impairs cell viability*. Neuron Glia Biol, 2011: p. 1-6.
149. Churchil, R.R., et al., *Exogenous DNA internalisation by sperm cells is improved by combining lipofection and restriction enzyme mediated integration*. Br Poult Sci, 2011. **52**(3): p. 287-91.
150. Barker, G.A. and S.L. Diamond, *RNA interference screen to identify pathways that enhance or reduce nonviral gene transfer during lipofection*. Mol Ther, 2008. **16**(9): p. 1602-8.
151. Koynova, R., L. Wang, and R.C. MacDonald, *Synergy in lipofection by cationic lipid mixtures: superior activity at the gel-liquid crystalline phase transition*. J Phys Chem B, 2007. **111**(27): p. 7786-95.
152. Okita, A., et al., *Efficiency of lipofection combined with hyperthermia in Lewis lung carcinoma cells and a rodent pleural dissemination model of lung carcinoma*. Oncol Rep, 2004. **11**(6): p. 1313-8.
153. Muramatsu, T., A. Nakamura, and H.M. Park, *In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review)*. Int J Mol Med, 1998. **1**(1): p. 55-62.
154. Capecchi, M.R., *High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells*. Cell, 1980. **22**(2): p. 479-88.
155. O'Meara, C.M., et al., *Gene silencing in bovine zygotes: siRNA transfection versus microinjection*. Reprod Fertil Dev, 2011. **23**(4): p. 534-43.
156. Klein, R.M., et al., *High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells*. 1987. Biotechnology, 1992. **24**: p. 384-6.
157. Jones, E. and D.L. Hartl, *Genetics: principles and analysis*. 4th edition ed. 1998, Boston: Jones and Bartlett.
158. Copeland, N.G. and G.M. Cooper, *Transfection by exogenous and endogenous murine retrovirus DNAs*. Cell, 1979. **16**(2): p. 347-56.
159. Goff, S.P., et al., *Transfection of fibroblasts by cloned Abelson murine leukemia virus DNA and recovery of transmissible virus by recombination with helper virus*. J Virol. , 1982. **41**(1): p. 271-85.
160. Fry, S.C., *Plant cell walls*, in *Encyclopedia of life sciences*, J.W. Sons, Editor. 2001. p. 11.
161. Koscianska, E. and K. Wypijewski, *Electroporated intact BY-2 tobacco culture cells as a model of transient expression study*. Acta Biochim Pol, 2001. **48**(3): p. 657-61.
162. Ruiqin, Z. and Y. Zheng-Hua, *Secondary cell walls*, in *Encyclopedia of life sciences*, J.W. Sons, Editor. 2009.
163. Griffiths, B. and F. Wurm, *Mammalian Cell Culture*, in *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, E.S. Ltd., Editor. 2001. p. 31-47.

164. Calos, M.P., *The potential of extrachromosomal replicating vectors for gene therapy*. Trends Genet, 1996. **12**(11): p. 463-6.
165. Hooykaas, P.J., *Plant transformation*, in *Encyclopedia of Life Sciences*, L. John Wiley & Sons, Editor. 2001. p. 6.
166. Earley, K.W., et al., *Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics*. Plant J, 2006. **45**(4): p. 616-29.
167. Lawler, J.F., E.M. Hyland, and J.D. Boeke, *Genetic engineering: reporter genes*, in *Encyclopedia of life sciences*, L. John Wiley & Sons, Editor. 2008. p. 8.
168. Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan, *GUS fusions: bglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. EMBO, 1987. **Journal**(6): p. 3901-3907.
169. Ow, D.W., et al., *Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants*. Science 1986. **234**: p. 856-859.
170. Viviani, V.R., *Luciferasas: las enzimas de la luz*. Ciencia hoy en línea, 2006. **15**(90): p. 40.
171. Chiu, W.-I., et al., *Engineered GFP as a vital reporter in plants*. Current Biology, 1996. **6**(3): p. 325-330.
172. Peckham, G.D., R.C. Bugos, and W.W. Su, *Purification of GFP fusion proteins from transgenic plant cell cultures*. Protein Expr Purif, 2006. **49**(2): p. 183-9.
173. Millwood, R.J., et al., *Instrumentation and methodology for quantifying GFP fluorescence in intact plant organs*. Biotechniques, 2003. **34**(3): p. 638-43.
174. Hink, M.A., J.W. Borst, and A.J. Visser, *Fluorescence correlation spectroscopy of GFP fusion proteins in living plant cells*. Methods Enzymol, 2003. **361**: p. 93-112.
175. Scott, A., et al., *Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells*. Biotechniques, 1999. **26**(6): p. 1125, 1128-32.
176. Dietrich, C. and E. Maiss, *Red fluorescent protein DsRed from Discosoma sp. as a reporter protein in higher plants*. Biotechniques, 2002. **32**(2): p. 286, 288-90, 292-3.
177. Jach, G., et al., *Use of red fluorescent protein from Discosoma sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression*. Plant J, 2001. **28**(4): p. 483-91.
178. Gross, L.A., et al., *The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 11990-5.
179. Baird, G.S., D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien, *Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 11984-9.
180. Haseloff, J., et al., *Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1997. **94**: p. 122-2127.
181. Berg, R.H. and R.N. Beachy, *Fluorescent protein applications in plants*. Methods Cell Biol, 2008. **85**: p. 153-77.
182. Leffel, S.M., S.A. Mabon, and C.N. Stewart, Jr., *Applications of green fluorescent protein in plants*. Biotechniques, 1997. **23**(5): p. 912-8.
183. Binns, A. and A. Campbell, *Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of plant cells*, in *Encyclopedia of Life Sciences*, L. John Wiley & Sons, Editor. 2001. p. 6.
184. Otten, L., *Ti plasmids*, in *Encyclopedia of Life Science*, J.W. Sons, Editor. 2001. p. 5.
185. Binns, A.N. and V.R. Howitz, *The genetic and chemical basis of host recognition by Agrobacterium tumefaciens*. Current Topics in Microbiology and Immunology 1994. **192**: p. 119-138.
186. Zupan, J. and P. Zambryski, *The Agrobacterium DNA transfer complex*. Critical Reviews in Plant Science 1997. **16**: p. 279-295.
187. Hernalsteens, J.-P., et al., *The Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant* Nature 1980. **287**: p. 654-656.
188. Zambryski, P., et al., *Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity*. EMBO Journal, 1983. **2**(12): p. 2143-50.
189. Hoekema, A., et al., *A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid*. Nature 1983. **303**: : p. 179-180.
190. Hasezawa, S., T. Nagata, and K. Syono, *Cytological study of the introduction of Agrobacterium tumefaciens spheroplast into Vinca rosea protoplasts*. Can. J. Bot., 1983. **61**: p. 1052-1057.
191. Hasezawa, S., T. Nagata, and K. Syono, *Transformation of Vinca protoplasts by Agrobacterium spheroplasts*. Mol. Gen. Genet., 1981. **182**: p. 206-210.
192. Nocarova, E. and L. Fischer, *Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression*. BMC Plant Biol, 2009. **9**: p. 44.
193. Bechtold, N., J. Ellis, and G. Pelletier, *In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants*. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences, 1993 **316**: p. 1194-1199.
194. Zhang, X., et al., *Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 641-6.

195. Desfeux, C., S.J. Clough, and A.F. Bent, *Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method*. *Plant Physiol*, 2000. **123**(3): p. 895-904.
196. Mohamalawari, D., et al., *Transformation of maize by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one resistant Agrobacterium strains* *Biotechnology Letters* 2002. **24**(3): p. 197-203.
197. Yoo, S.D., Y.H. Cho, and J. Sheen, *Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(7): p. 1565-72.
198. Cocking, E.C., *A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles*. *Nature*, 1960. **187**: p. 927-929.
199. Fromm, M.E., L.P. Taylor, and V. Walbot, *Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1985. **80**: p. 4803-4807.
200. Klein, A.S., D. Montezinos, and D.P. Delmer, *Cellulose and 1,3-glucan synthesis during the early steps of wall regeneration in soybean protoplasts*. *Planta*, 1981. **152**: p. 105-114.
201. Kado, C.I. and A. Klirinofs, *Genetic modification of plant cells through uptake of foreign DNA*. *International Review of Cytology - Supplement*, 1980. **11B**.
202. Ohyama, K., O.L. Gamborg, and R.A. Miller, *Uptake of exogenous DNA by plant protoplast*. *Can. J. Bot.*, 1972. **50**: p. 2077-2080.
203. Lurquin, P.F. and C.I. Kado, *Escherichia coli plasmid pBR313 insertion into plant protoplast and into their nuclei*. *Molecular & general genetics*, 1977. **154**: p. 113-121.
204. Mathur, J. and C. Koncz, *PEG-mediated protoplast transformation with naked DNA*, in *Methods in Molecular Biology: Arabidopsis Protocols*, J. Martinez-Zapater and J. Salinas, Editors. 2001, Humana Press Inc.: Totowa, NJ. p. 267-276.
205. Paszkowski, J., et al., *Direct gene transfer to plants* *EMBO Journal* 1985. **3**: p. 2717-2722.
206. Lurquin, P.F., *Gene transfer by electroporation*. *Mol Biotechnol*, 1997. **7**(1): p. 5-35.
207. Szoka, F. and D. Papahadjopoulos, *Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. **74**: p. 194-198.
208. Fukunaga, J., et al., *An ultrastructural study of interaction of liposomes with plant protoplasts*. *Exp Cell Res*, 1983. **144**: p. 181-189.
209. Wu, F.S. and A.B. Cahoon, *Plasmolysis facilitates the accumulation of protein and DNA into extra-plasmalemma spaces of intact plant cells*. *Plant Science*, 1995. **104**: p. 201-214.
210. Wu, F.S. and T.Y. Feng, *Delivery of plasmid DNA into intact plant cells by electroporation of plasmolyzed cells*. *Plant cell reports*, 1999. **18**(5): p. 381-386.
211. Potrykus, I., *Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results*. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.*, 1991. **42**: p. 205-225.
212. Reise, D., F. Marty, and N. Leborgne-Castel, *New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress*. *BMC Plant Biology* 2005., **5**: p. 1-13.
213. Wilkinson, M.J. and D.H. Northcote, *Plasma membrane ultrastructure during plant protoplast plasmolysis, isolation and wall regeneration: a freeze-fracture study*. *J Cell Sci*, 1980. **42**: p. 401-15.
214. Bitsikas, V., et al., *Hypertonic conditions trigger transient plasmolysis, growth arrest and blockage of transporter endocytosis in Aspergillus nidulans and Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Membr Biol*, 2011. **28**(1): p. 54-68.
215. Lang-Pauluzzi, I., *The behaviour of the plasma membrane during plasmolysis: a study by UV microscopy*. *J Microsc*, 2000. **198**(Pt 3): p. 188-98.
216. Oparka, K.J., *Plasmolysis: new insights into an old process*. *New Phytologist*, 1994. **126**: p. 571-591.
217. Kikkert, J.R., *Microprojectile bombardment*, in *Encyclopedia of life sciences*, L. John Wiley & Sons, Editor. 2001. p. 3.
218. Sivamani, E., R.K. DeLong, and R. Qu, *Protamine-mediated DNA coating remarkably improves bombardment transformation efficiency in plant cells*. *Plant Cell Rep*, 2009. **28**(2): p. 213-21.
219. Hagio, T., *Optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation*. *Japan Agricultural Research Quarterly* 1998. **32** p. 239-247.
220. Gray, D.J. and J.J. Finer, *Development and operation of five particle guns for introduction of DNA into plant cells*. *Plant Cell Tissue and organ culture* 1993. **33**: p. 219-257.
221. Iida, A., et al., *Efficiency of particle-bombardment-mediated transformation is influenced by cell cycle stage in synchronized cultured cells of tobacco*. *Plant Physiol*, 1991. **97**(4): p. 1585-7.
222. Vongpaseuth, K., et al., *Development of a particle bombardment-mediated transient transformation system for Taxus spp. cells in culture*. *Biotechnol Prog*, 2007. **23**(5): p. 1180-5.
223. Romano, A., et al., *Transgene organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-)transformation using plasmids and gene cassettes*. *Transgenic Res*, 2003. **12**(4): p. 461-73.
224. Kikkert, J.R., J.R. Vidal, and B.I. Reisch, *Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biistics*. *Methods Mol Biol*, 2005. **286**: p. 61-78.
225. Zeef, L.A., P. Christou, and M.J. Leech, *Transformation of the tropane alkaloid-producing medicinal plant Hyoscyamus muticus by particle bombardment*. *Transgenic Res*, 2000. **9**(3): p. 163-8.

226. Maenpaa, P., et al., *Transformation of nuclear and plastomic plant genomes by biolistic particle bombardment*. Mol Biotechnol, 1999. **13**(1): p. 67-72.
227. Takeuchi, Y., M. Dotson, and N.T. Keen, *Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing helium*. Plant Mol Biol, 1992. **18**(4): p. 835-9.
228. Bidney, D., et al., *Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol Biol, 1992. **18**(2): p. 301-13.
229. Chasan, R., *Transforming maize transformation*. The plant cell, 1992. **4**: p. 1463-1464.
230. Wang, K., et al., *Whisker-mediated plant transformation: an alternative technology*. In Vitro Cell and Developmental Biology, 1995. **31**(101-104).
231. Dunwell, J.M., *Transformation of maize using silicon carbide whiskers*. Methods Mol Biol, 1999. **111**: p. 375-82.
232. Miki, B., et al., *A procedure for the microinjection of plant cells and protoplasts*. Methods in Cell Science, 1989. **12**(4): p. 139-144.
233. Griesbach, R.J., *Protoplast microinjection*. Plant Mol. Biol. Reporter, 1983. **1**: p. 32-37.
234. Horvath, G., et al., *Functional characteristics of intact chloroplasts isolated from mesophyll protoplast and bundle sheath cells of maize*. Planta, 1978. **141**: p. 239-244.
235. Rathman, C.K.M. and G.E. Edwards, *Protoplast as tool for isolating functional chloroplasts from leaves*. Plant Cell Physiol, 1976. **17**: p. 177-186.
236. Nishimura, M.D., D. Graham, and T. Akasama, *Isolation of intact chloroplasts and other cell organelles from spinach leaf chloroplasts*. Plant Physiol, 1976. **58**: p. 309-314.
237. Hadlaczky, G., et al., *DNA synthesis and division in interkingdom heterokaryons*. In Vitro, 1980. **16**: p. 647-650.
238. Ohyama, K., L.E. Pelcher, and D. Horn, *A rapid simple method for nuclei isolation from protoplasts*. Plant Physiol, 1977. **60**: p. 179-181.
239. Szabados, L. and D. Dudits, *Fusion between interphase and mitotic plant protoplasts: Induction of premature chromosome condensation*. Exp Cell Res, 1980. **127**: p. 442-446.
240. Ueda, K., et al., *Phagocytosis in plant protoplasts*. Cell Struct Funct, 1978. **3**: p. 25-30.
241. Langbecker, C.L., et al., *High-frequency transformation of undeveloped plastids in tobacco suspension cells*. Plant Physiol, 2004. **135**(1): p. 39-46.
242. Boynton, J.E., et al., *Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles*. Science 1988. **240**: p. 1534-38.
243. Maliga, P., *Plastid transformation in higher plants*. Annu Rev Plant Biol, 2004. **55**: p. 289-313.
244. Houben, A., et al., *Engineered plant minichromosomes: a bottom-up success?* Plant Cell, 2008. **20**(1): p. 8-10.
245. Alfenito, M.R. and J.A. Birchler, *Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence*. Genetics 1993. **135** p. 589-597.
246. Camacho, J.P., T.F. Sharbel, and L.W. Beukeboom, *B-chromosome evolution*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2000. **355**(1394): p. 163-78.
247. Jones, N. and A. Houben, *B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome?* Trends Plant Sci, 2003. **8**(9): p. 417-23.
248. Jones, R.N., W. Viegas, and A. Houben, *A century of B chromosomes in plants: so what?* Ann Bot, 2008. **101**(6): p. 767-75.
249. Yu, W., et al., *Construction and behavior of engineered minichromosomes in maize*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 8924-9.
250. Preuss, D. and G. Copenhaver, *Plant artificial chromosome compositions and methods*, in United States Patent. 2006, University of Chicago (Chicago, IL, US) United States.
251. Toth, R.L., et al., *A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors*. FEBS Lett, 2001. **489**(2-3): p. 215-9.
252. Mochizuki, T. and S.T. Ohki, *Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants*. Mol Plant Pathol, 2011.
253. Lim, J.H., *Construction of a Transformation Vector Containing Cucumber Mosaic Virus (CMV) Coat Protein (CP) Gene and Development of an Agrobacterium transformation Procedure for Chilli*, in Faculty of Environmental Studies. 2003, Putra University-Malaysia: Serdang. p. 25.
254. Matsuo, K., et al., *Development of Cucumber mosaic virus as a vector modifiable for different host species to produce therapeutic proteins*. Planta, 2007. **225**(2): p. 277-286.
255. Jang, j., S. Ko, and Y. Kim, *Dual-Functionalized Polymer Nanotubes as Substrates for Molecular-Probe and DNA-Carrier Applications*. Adv. Funct. Mater. , 2006. **16**: p. 754-759.
256. Pantarotto, D., et al., *Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes*. Chem Commun (Camb), 2004(1): p. 16-7.
257. Monteiro-Riviere, N.A., et al., *Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes*. Toxicology Letters 2005. **155** p. 377-384.

258. Pastorin, G., et al., *Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery*. Chem. Commun., 2006: p. 1182-1184.
259. Kostarelos, K., et al., *Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type*. Nat Nanotechnol, 2007. **2**(2): p. 108-13.
260. Kam, N.W., et al., *Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into Mammalian cells*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(22): p. 6850-1.
261. Kam, N.W. and H. Dai, *Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality*. J Am Chem Soc, 2005. **27**(16): p. 6021-6026.
262. Kam, N.W.S., et al., *Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction*. PNAS, 2005. **102**(33): p. 11600-11605.
263. Bottini, M., et al., *Full-length single-walled carbon nanotubes decorated with streptavidin-conjugated quantum dots as multivalent intracellular fluorescent nanoprobe*. Biomacromolecules, 2006. **7**(8): p. 2259-63.
264. Klumpp, C., et al., *Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors*. Biochem Biophys Acta, 2006. **1758**(3): p. 404-4112.
265. Ali-Boucetta, H. and K. Kostarelos, *Carbon nanotube cell biology: not just a simple interaction*. European Journal of Nanomedicine, 2008. **1**: p. 29-32.
266. Hone, J. and L. Kam, *Nanobiotechnology: looking inside cell walls*. Nat Nanotechnol, 2007. **2**(3): p. 140-1.
267. Jin, H., et al., *Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles*. ACS Nano, 2009. **3**(1): p. 149-58.
268. Foillard, S., G. Zuber, and E. Doris, *Polyethylenimine-carbon nanotube nanohybrids for siRNA-mediated gene silencing at cellular level*. Nanoscale, 2011. **3**(4): p. 1461-4.
269. Aigner, A., *Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs*. J Biotechnol, 2006. **124**(1): p. 12-25.
270. Varkouhi, A.K., et al., *SiRNA delivery with functionalized carbon nanotubes*. Int J Pharm, 2011. **416**(2): p. 419-25.
271. Rojas-Chapana, J., et al., *Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into Escherichia coli cells* Lab Chip, 2005. **5**(5): p. 536-539.
272. Serag, M., et al., *Nanotechnology meets plant biotechnology: carbon nanotubes deliver DNA and incorporate into plant cell structure*, in *Twelfth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. 2008, The Chemical and Biological Microsystems Society San Diego, California, USA. p. 227-229.
273. Serag, M.F., et al., *Introducing carbon nanotubes into living walled plant cells through cellulase-induced nanoholes*. RSC Adv., 2012. **2**: p. 398-400.
274. Serag, M., et al., *Trafficking and Subcellular Localization of Multiwalled Carbon Nanotubes in Plant Cells*. ACS Nano, 2011. **5**(1): p. 493-9.
275. Liu, Q., et al., *Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells*. Nano Letters, 2009. **9**(3): p. 1007-1010.
276. Yuan, H., et al., *Single Walled Carbon Nanotubes Exhibit Dual-Phase Regulation to Exposed Arabidopsis Mesophyll Cells*. Nano Scale Research Letters, 2011. **6**(44): p. 1-9.
277. De la Torre Díaz, S., *Papel de la proteína de unión a Cap, nCBP, en la floración de Arabidopsis thaliana*, in *Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM*. 2009, Universidad Nacional Autónoma de México: México. p. 78.
278. Invitrogen, *Gateway® Technology*. 2010.
279. Sambrook, J. and D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition ed, ed. J. Argentine. Vol. 2. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2344.
280. Invitrogen. *Aminoallyl dUTP*. 2004 [cited 2011; Available from: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp21664.pdf>].
281. QIAGEN. *QIAquick® Spin Handbook*. 2002 [cited 2010; Available from: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAquickSpin_EN.pdf].
282. Invitrogen. *Alexa Fluor® Succinimidyl Esters*. 2009 [cited 2011; Available from: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp10168.pdf>].
283. Costa, S., et al., *Characterization of carbon nanotubes by Raman spectroscopy*. Materials Science-Poland, 2008. **26**(2): p. 433-441.
284. Keszler, A.M., et al., *Characterisation of Carbon Nanotube Materials by RAMAN Spectroscopy and Microscopy- A Case Study of Multiwalled and Single Walled Samples* Journal of Optoelectronics and Advanced Materials 2004. **6**(4): p. 1269 - 1274.
285. Chiu, P.W., et al., *Interconnection of carbon nanotubes by chemical functionalization*. Applied Physics Letters, 2002. **80**(20): p. 3811-3813.
286. Wang, Y., et al., *Synthesis of poly(ethylene glycol) functionalized MWNTs and their inclusion complexes with α -cyclodextrin*. J Mater Sci 2008. **43**: p. 5609-5617.

287. Panchakarla, L.S. and A. Govindaraj, *AFM imaging of functionalized double-walled carbon nanotubes*. J. Chem. Sci., 2009. **120**(6): p. 607-611.
288. Georgakilas, V., et al., *Amino acid functionalisation of water soluble carbon nanotubes*. Chem Commun (Camb), 2002(24): p. 3050-1.
289. Hu, H., et al., *Polyethyleneimine Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes as a Substrate for Neuronal Growth*. J. Phys. Chem. B, 2005. **109**(10): p. 4285-4289.
290. Lin, Y., et al., *Functionalizing Multiple-Walled Carbon Nanotubes with Aminopolymers*. J. Phys. Chem. B 2002. **106**: p. 1294-1298.
291. Data, N.S.R., *NIST Chemistry WebBook*. 2011, Secretary of Commerce on behalf of the United States of America.
292. Silverstein, R.M., G.C. Bassler, and T.C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 4th ed ed, ed. J.W.a. Sons. 1981, New York.
293. Tomašovičová, N., et al., *Infrared study of biocompatible magnetic nanoparticles*. Measurement Science Review 2006. **6**(2): p. 32-35.
294. *Spectroscopic Evaluation of the Length of Poly(ethylene glycol) Covalently Attached to Multiwalled Carbon Nanotubes*. Chemistry Letters 2009. **38**(9): p. 890-891.
295. Zhang, Y., et al., *Cross-Linking of Multiwalled Carbon Nanotubes with Polymeric Amines*. Macromolecules 2008. **41**: p. 6141-6146.
296. Aldrich, S. 2012; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com>.
297. Sano, M., et al., *Noncovalent Self-Assembly of Carbon Nanotubes for Construction of "Cages"*. Nano Letters 2002. **2**: p. 531-533.
298. Martínez Silva, A., S. De la Torre Díaz, and T. D. Dinkova, *Los Factores de Traducción Tipo eIF4E en Plantas: Redundancia y Diversidad Funcional*. Mensaje Bioquímico 2009. **XXXIII**: p. 117-129.
299. Nagata, T., Y. Nemoto, and S. Hasezawa, *Tobacco BY-2 cell-line as the HeLa-cell in the cell biology of higher plants*. International Review of cytology, 1992. **132**: p. 1-30.
300. Ruiz, L., A. Higareda, and M. Pardo, *Sincronización de Células de Tabaco (Nicotiana tabacum) NT-1*. Información Tecnológica, 2010. **21**(2): p. 3-11.
301. An, G., *High efficiency transformation of cultured tobacco cells*. Plant Physiol 1985. **79**(568-570).
302. Castro-Concha, L.A., R.M. Escobedo, and L. Miranda-Ham Mde, *Measurement of cell viability in in vitro cultures*. Methods Mol Biol, 2006. **318**: p. 71-6.
303. Hawes, C.R. and J. Coleman, *Endocytosis, Exocytosis and Vesicle Traffic in Plants*. First Edition ed. 1991, Cambridge: Cambridge University Press. 253.
304. Oparka, K.J. and C. Hawes, *Vacuolar sequestration of fluorescent probes in plant cells: a review*. Journal of Microscopy, 1992. **166**(1): p. 15-27.
305. Oparka, K.J., *Uptake and Compartmentation of Fluorescent Probes by Plant Cells*. Journal of Experimental Botany, 1991. **42**(5): p. 565-579.
306. Makarow, M., *Endocytosis in Saccharomyces cerevisia: internalization of α -amilase and fluorescent dextran into cells*. EMBO journal, 1985. **4**: p. 1861-1866.
307. Makarow, M. and L.T. Nevalainen, *Transport of a fluorescent macromolecule via endosomes to the vacuole in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Cell Biology, 1987. **104**: p. 67-75.
308. Preston, R.A., R.F. Murphy, and E.W. Jones, *Apparent endocytosis of fluorescein isothiocyanate-conjugated dextran by Saccharomyces cerevisiae reflects uptake of low molecular weight impurities not dextran*. Journal of Cell Biology, 1987. **105**: p. 1981-1987.
309. Cole, L., et al., *Internalisation of fluorescein isothiocyanate and fluorescein isothiocyanatedextran by suspension-cultured plant cells*. Journal of Cell Science, 1990. **96**: p. 721-730.
310. Cole, L., G.J. Hyde, and A.E. Ashford, *Uptake and compartmentalisation of fluorescent probes by Pisolithus tinctorius hyphae: evidence for an anion transport mechanism at the tonoplast but not for fluid-phase endocytosis*. Protoplasma, 1997. **199**: p. 18-29.
311. Panchuk-Voloshina, N., et al., *Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates*. J Histochem Cytochem, 1999. **47**(9): p. 1179-88.
312. Gall, L., et al., *Fluorescent detection of fluid phase endocytosis allows for in vivo estimation of endocytic vesicle sizes in plant cells with sub-diffraction accuracy*. Traffic, 2010. **11**(4): p. 548-59.
313. Tan, X., C. Lin, and B. Fugetsu, *Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells*. Carbon, 2009. **47**: p. 3479 -3487.
314. Manna, S.K., et al., *Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes*. Nano Lett, 2005. **5**(9): p. 1676-84.
315. Ding, L., et al., *Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast*. Nano Lett, 2005. **5**(12): p. 2448-64.

316. Murray, A.R., et al., *Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes*. Toxicology, 2009. **257**(3): p. 161-71.
317. Davoren, M., et al., *In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells*. Toxicol In Vitro, 2007. **21**(3): p. 438-48.
318. Shvedova, A.A., et al., *Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(4): p. L552-65.
319. Fenoglio, I., et al., *Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity?* Free Radic Biol Med, 2006. **40**(7): p. 1227-33.
320. Kim, J.S., et al., *Evaluation of biocompatible dispersants for carbon nanotube toxicity tests*. Arch Toxicol, 2011.
321. Wako, K., et al., *Effects of preparation methods for multi-wall carbon nanotube (MWCNT) suspensions on MWCNT induced rat pulmonary toxicity*. J Toxicol Sci, 2010. **35**(4): p. 437-46.
322. Zhang, L., D. Alizadeh, and B. Badie, *Carbon nanotube uptake and toxicity in the brain*. Methods Mol Biol, 2010. **625**: p. 55-65.
323. Alpatova, A.L., et al., *Single-walled carbon nanotubes dispersed in aqueous media via non-covalent functionalization: effect of dispersant on the stability, cytotoxicity, and epigenetic toxicity of nanotube suspensions*. Water Res, 2010. **44**(2): p. 505-20.
324. Simeonova, P.P., *Update on carbon nanotube toxicity*. Nanomedicine (Lond), 2009. **4**(4): p. 373-5.
325. Tutak, W., et al., *Toxicity induced enhanced extracellular matrix production in osteoblastic cells cultured on single-walled carbon nanotube networks*. Nanotechnology, 2009. **20**(25): p. 255101.
326. Simon-Deckers, A., et al., *In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes*. Toxicology, 2008. **253**(1-3): p. 137-46.
327. Kostarelos, K., *The long and short of carbon nanotube toxicity*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(7): p. 774-6.
328. Lam, C.W., et al., *A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks*. Crit Rev Toxicol, 2006. **36**(3): p. 189-217.
329. Smirnova, E.A., et al., *Multi-walled Carbon Nanotubes Penetrate into Plant Cells and Affect the Growth of Onobrychis arenaria Seedlings*. Acta Naturae, 2011. **3**(5): p. 99-106.
330. Muller, J., et al., *Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells*. Carcinogenesis, 2008. **29**(2): p. 427-33.
331. Shim, M., et al., *Functionalization of Carbon Nanotubes for Biocompatibility and Biomolecular Recognition*. Nano Lett, 2002. **2**(4): p. 285-288.
332. Lin, C., et al., *Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells*. J Hazard Mater, 2009. **170**(2-3): p. 578-83.
333. Khodakovskaya, M., et al., *Carbon Nanotubes Are Able To Penetrate Plant Seed Coat and Dramatically Affect Seed Germination and Plant Growth*. ACS Nano 3, 2009. **3**: p. 3221-3226.
334. Tripathi, S., S.K. Sonkar, and S. Sarkar, *Growth stimulation of gram (Cicer arietinum) plant by water soluble carbon nanotubes*. Nanoscale, 2011. **3**(3): p. 1176-81.
335. Lin, S., et al., *Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants*. Small, 2009. **5**(10): p. 1128-32.
336. Tan, X. and B. Fugetsu, *Multi-Walled Carbon Nanotubes Interact with Cultured Rice Cells: Evidence of a Self-Defense Response*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2007. **3**: p. 285-288.
337. Zhao, Y., B.L. Allen, and A. Star, *Enzymatic degradation of multiwalled carbon nanotubes*. J Phys Chem A, 2011. **115**(34): p. 9536-44.
338. Kagan, V.E., et al., *Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation*. Nature Nanotechnology, 2010: p. 1-6.
339. Campa, A., *Biological roles of plant peroxidases: known and potential function.*, in *Peroxidases III Chemistry and Biology*, J. Everse, K.E. Everse, and M.B. Grisham, Editors. 1991, CRC Press: Boca Raton.
340. Bewley, J.D. and M. Black, *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2nd edition ed. 1994, New York: Plenum.