



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**FUNCIONALIZACIÓN DIRIGIDA Y LOCALIZADA DE NANOTUBOS DE VP6 DE
ROTAVIRUS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA:

LILIANA CARREÑO FUENTES

DIRECTOR DE TESIS

DR. OCTAVIO TONATIUH RAMIREZ REIVICH

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JORGE ASCENCIO GUTIÉRREZ

INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS

DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

MÉXICO, D. F. marzo, 2014



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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de CONACYT, del proyecto CONACYT-CB 101847 y DGAPA IN-223210. Se agradece el apoyo técnico de la M.en C. Vanessa Hernández y de la M. en C. Ana Ruth Pastor, Dra. Guadalupe Zavala (Unidad de Microscopia, IBT, UNAM), M. en C. Alba Neri Lecona (Unidad de Microscopia Electrónica, INSP), Dr. Ariosto Medina (Unidad de Microscopia Electrónica, IIM-UMSNH), Dr. Adrián Martínez y Dr. Juan Méndez del CNMN, IPN y a Dr. Sergio Moya y Dr. Marco Marradi del CIC biomaGUNE, España. Se agradece el uso del clúster del IBT.

Esta tesis y todo el esfuerzo que implicó están **DEDICADOS** a

Guillermo

Porque eres mi motivo e inspiración. Gracias por tu fuerza, tu paciencia, tu alegría y el amor que compartimos. Gracias por el siempre y el cada día.

Mis padres

No tengo palabras para agradecerles sus enseñanzas, su ejemplo y la calidad de vida que me han dado. Gracias por su amor incondicional.

Mis hermanos y sobrinos

Ustedes que han sido siempre mi apoyo, mi refugio, mis cómplices, mi alegría y mi orgullo. Gracias por todo lo que me han dado.

Mirna

Porque empecé este camino contigo y me mostraste el significado de la valentía, la disciplina y principalmente, de la amistad. Porque no importa que tan lejos estemos, no estaremos separadas.

Aura, Pilla, Jack, Ely, Lidia, Joan, Yocan, Laura y Carla

Por todos estos años juntas. Por las risas. Por saber que tengo hermanas que yo elegí.

Gloria Acuña y familia

Porque tu apoyo en Cuernavaca me ha impulsado y supe que no estaba sola. Gracias

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Tonatiuh Ramírez** por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por brindarme su confianza y por darme la libertad para desarrollar este proyecto. Gracias por los consejos y los conocimientos que he recibido.

A la **Dra. Laura Palomares** por su constante apoyo y el tiempo dedicado para que este proyecto saliera adelante. Gracias por los conocimientos, las revisiones y los consejos.

A los miembros del **Comité Tutorial**: Dr. Jorge A. Ascencio y Dr. Enrique Rudiño. Les agradezco su tutoría y sus sugerencias que siempre fueron valiosas.

A los miembros del **Jurado**: Dr. Baltazar Becerril, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Dr. Jaime Ruiz, Dra. Gloria Saab y Dr. Jose M. Saniger.

Al **Dr. Sergio Moya** y los miembros de su grupo por confiar en mí y recibirme en su laboratorio. Gracias por el apoyo académico y los conocimientos recibidos durante mi estancia en el CIC biomaGUNE.

Gracias por el **apoyo técnico** de: Dr. Germán Plascencia (IBT y U.Texas); MC Vanessa Hernández, MC Ruth Pastor, MC Martha Contreras, QFB. Ioatzin Ríos, cDr. Mabel Rodríguez y cDr. Ricardo Castro (GPR, IBT), Dra. Guadalupe Zavala (Unidad de Microscopia Electrónica, IBT); MC Alba Neri Lecona (Unidad de Microscopia, INSP); Dr. Ariosto Medina (IIM-UMSNH); Dr. Juan Méndez y Dr. Adrián Martínez (CNMyN); cDr. Elena Rojas, cDr. Joseba Irigoyen, Dra. Irantzu Llarena y Dr. Marco Marradi (CIC biomaGUNE).

A la **Lic. Karin Levy** por el apoyo administrativo y logístico.

A la **Dra. Angélica Meneses**. Gracias por la asesoría, los consejos y la amistad.

A todos mis compañeros del **Grupo Palomares-Ramírez**, cuyos comentarios, sugerencias y preguntas enriquecieron mi trabajo.

A todos los integrantes del **Grupo Galindo** por su compañerismo.

Gracias por la amistad y el apoyo: loatzin (Joaks), Cuitláhuac (Patito), William (Williberto-Calamar), Mauricio (Maudacio), Lili, Mabel (Mabeluzka), Oriana, Gheorghe (Georgy), Vanessa, Toño, Ruth, Francisco (Muégano), Aurora (Alabasti), Germán, David (elDavi), Enrique (Paz).

A todos aquellos que contribuyeron a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. COMPLEJOS NANOESTRUCTURADOS	4
2.2. MOLÉCULAS BIOLÓGICAS COMO ANDAMIOS O MOLDES EN NANOTECNOLOGÍA	10
2.3. LA PROTEÍNA VP6 DE ROTAVIRUS COMO BLOQUE DE CONSTRUCCIÓN	17
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
3.1. HIPÓTESIS	24
3.2. OBJETIVO GENERAL	24
3.3. OBJETIVOS PARTICULARES	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. CULTIVO E INFECCIÓN DE CÉLULAS DE INSECTO PARA PRODUCCIÓN DE VP6	25
4.1.1. PRODUCCIÓN DE ABASTOS VIRALES	25
4.1.2. PRODUCCIÓN DE NANOTUBOS DE VP6	25
4.1.3. PURIFICACIÓN DE NANOTUBOS DE VP6	26
4.1.4. ANÁLISIS DE CANTIDAD DE PROTEÍNA, PUREZA, IDENTIDAD Y ENSAMBLAJE DE VP6	26
4.2. REENSAMBLAJE DE NANOTUBOS DE VP6.	27
4.3. FUNCIONALIZACIÓN EXTERNA DE NANOTUBOS DE VP6 CON NANOPARTÍCULAS DE ORO	28
4.3.1. FUNCIONALIZACIÓN SIN AGENTES ESTABILIZANTES.	28
4.3.2. FUNCIONALIZACIÓN CON AGENTES ESTABILIZANTES.	28
4.4. FUNCIONALIZACIÓN INTERNA DE NANOTUBOS DE VP6	29
4.4.1. REDUCCIÓN METÁLICA EN EL CANAL INTERNO DE VP6	29

4.4.2. REENSAMBLAJE DE VP6 EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS (NP)	29
4.5. CARACTERIZACIÓN NANOCOMPLEJOS PROTEÍNA-METAL	30
4.6. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS A-549 Y THP-1	31
4.6.1. MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES	31
4.6.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	31
4.7. SIMULACIÓN MOLECULAR	32
4.7.1. PREPARACIÓN DE LA PROTEÍNA	32
4.7.2. PREPARACIÓN DE LOS LIGANDOS	32
4.7.3. PREDICCIÓN DE SITIOS DE UNIÓN A METALES EN VP6	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE NANOTUBOS	34
5.2. BIFUNCIONALIZACIÓN EXTERNA DE LOS NANOTUBOS DE VP6	41
5.2.1. MODULACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	43
5.2.2. MODULACIÓN DE PROPIEDADES ÓPTICAS	54
5.2.3. MODULACIÓN DE ESTABILIDAD COLOIDAL	56
5.2.4. MODULACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD	60
5.3. FUNCIONALIZACIÓN INTERNA DE NANOTUBOS DE VP6	63
5.3.1. FORMACIÓN DE NANORRODILLOS (NR) Y NANOALAMBRES (NW) DE PLATA	63
5.3.2. FUNCIONALIZACIÓN INTERNA DE VP6: PROTEÍNA ENCAPSULANDO NP	77
5.4. FORMACIÓN DE NANOCOMPLEJOS MULTIFUNCIONALES	82
6. CONCLUSIONES	83
7. PERSPECTIVAS	85
8. PRODUCTOS GENERADOS	87
8.1. ARTÍCULOS ARBITRADOS	87
8.2. SOLICITUD DE PATENTE	87
8.3. TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES	87
8.4. TESIS DIRIGIDAS	88
9. REFERENCIAS	89
ANEXO	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen esquemática de un nanocomplejo multifuncional.	5
Figura 2. Fabricación por nanolitografía.	5
Figura 3. Ejemplos de complejos nanoestructurados formados por técnicas tradicionales “bottom-up”.	8
Figura 4. Copolímeros como andamios para la formación de complejos híbridos con compuestos inorgánicos.	9
Figura 5. Estructuras de diferentes virus.	12
Figura 6. Sitios posibles de modificación y funcionalización en virus y PPV.	13
Figura 7. Reconstrucción de la cápside del rotavirus.	17
Figura 8. Trimer de VP6.	18
Figura 9. Monómero de VP6.	19
Figura 10. Imágenes de TEM de la proteína VP6 polimórfica.	20
Figura 11. Corte longitudinal de nanotubo de VP6 visto por crio-TEM.	22
Figura 12. Curva de crecimiento y viabilidad de células H5 sin infectar e infectadas con el bacVP6.	35
Figura 13. Detección de VP6 por Western blot en caldo de cultivo.	35
Figura 14. Análisis por SDS-PAGE de las etapas de purificación de VP6.	37
Figura 15. Micrografías electrónicas de los nanotubos de VP6 purificados.	38
Figura 16. Perfil del análisis del tamaño de VP6 por HPLC.	39
Figura 17. Nanotubos de VP6 re-ensamblados mediante diálisis.	40
Figura 18. Estructura química del MPS.	42
Figura 19. Coloración de los nanocomplejos bifuncionales de VP6 con nanopartículas de oro modificadas superficialmente con MPS.	42
Figura 20. Micrografías nanocomplejos VP6-Au recubiertos con MPS.	43
Figura 21. DF-STEM de los nanocomplejos VP6-Au-MPS.	44
Figura 22. Formación de nanopartículas en presencia de tioles.	47
Figura 23. Estructura molecular del GlcC ₅ SH.	47
Figura 24. Micrografías nanocomplejos VP6-Au y GlcC ₅ SH.	48
Figura 25. Efecto del volumen del tiol en el diámetro de las NP.	49
Figura 26. Ejemplos de los espectros elementales de los nanocomplejos.	50

Figura 27. Porcentaje de los átomos de Au y S presentes en los diferentes nanocomplejos.....	51
Figura 28. Efecto estérico de tioles voluminosos sobre el tamaño de las NP.....	53
Figura 29. Efecto de la capa de tioles sobre la resonancia de los plasmones de superficie.....	55
Figura 30. Estabilidad coloidal de nanocomplejos VP6-Au.....	58
Figura 31. Coloración y estabilidad coloidal de los nanocomplejos VP6-Au-GlcC ₅ SH.	59
Figura 32. Citotoxicidad normalizada de los diferentes nanocomplejos VP6-Au.....	61
Figura 33. Formación de NP, NR y NW de plata dentro de los nanotubos de VP6...	65
Figura 34. Dimensiones de los nanocomplejos VP6 y las nanoestructuras de Ag formadas en su interior.	66
Figura 35. Funcionalización de los nanotubos de VP6 con Ag usando NaBH ₄ como reductor.....	68
Figura 36. Entrada de precursores y formación de meniscos en nanotubos de VP6	69
Figura 37. Análisis elemental de las nanoestructuras VP6-Ag.....	70
Figura 38. Estructura cristalina de las nanoestructuras de plata.	71
Figura 39. Coalescencia de NP dentro de los nanotubos de VP6.....	72
Figura 40. Localización de NW y NR de Ag en VP6.	73
Figura 41. Estructuras con a) oro y b) paladio en los nanotubos de VP6.	74
Figura 42. Simulación del acoplamiento entre el trimero de VP6 y los iones metálicos.	75
Figura 43. Estructuras formadas por el re-ensamblaje de VP6 sobre NP prefabricadas a diferentes pH.....	79
Figura 44. Estructuras formadas por el reensamblaje de VP6 a pH 7.2.	80
Figura 45. Análisis elemental (EDX) de las estructuras formadas por el reensamblaje de VP6.	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de tamaños de nanopartícula entre los diferentes complejos bifuncionalizados.	45
Tabla 2. Comparación de tamaños de nanopartícula entre los diferentes complejos VP6-Au-GlcC5SH.	48
Tabla 3. Comparación de los resultados del acoplamiento molecular para Ag ⁺ y Au(III).	76

ABREVIATURAS

AFM	Microscopio de fuerza atómica
BF/DF	Bright Field/ Dark Field (Campo claro / Campo oscuro)
CCMV	Virus moteado clorótico del caupí
CNT	Nanotubo de carbono
CPMV	Virus del mosaico del chícharo
EDS o EDX	Energía dispersiva de rayos X
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X
FE-SEM	Field Emission-Scanning Transmission Electron Microscopy (emisión de campo-microscopía electrónica de barrido)
FFT	Transformada rápida de Fourier
HAADF-STEM	High angle dark field – Scanning Transmission Electron Microscopy (campo oscuro de ángulo amplio- microscopía electrónica de transmisión y barrido)
Hpi	Horas post infección
HPLC	Cromatografía de alta presión de líquidos
HRTEM	High Resolution TEM (Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución)
LABE	Low-Angle Backscattered Electron Detector (detector de electrones retrodispersados en bajo ángulo)
MDI	Multiplicidad de infección
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)- 2,5-difenil-2H-tetrazolio
NP	Nanopartícula
NR	Nanorodillo
NW	Nanoalambre
PBS	Buffer salino de fosfatos
PMA	Acetato de forbol miristato
PPV	Partículas pseudo-virales
Qdot	Puntos cuánticos
RS	Compuesto tiolado
SCI-BV	Sistema Células de Insecto-Baculovirus

SEC	Cromatografía por exclusión molecular
SEM	Scannig Electron Microscopy (microscopía electronica de barrido)
SFB	Suero Fetal Bovino
SPR	Resonancia de plasmones de superficie
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TMV	Virus del mosaico del tabaco
ToMV	Virus del mosaico del tomate

RESUMEN

Un área clave de la nanotecnología es el desarrollo de nanocomplejos híbridos, en los cuáles se ordenan dos o más nanomateriales o complejos funcionalizantes combinando y aprovechando sus propiedades en una misma estructura.

En este proyecto se propuso el uso de los nanotubos de la proteína VP6 de rotavirus para el ensamblaje de nanocomplejos estructurados. Dada la disponibilidad de dos superficies (interna y externa) en estas estructuras tubulares, podrían construirse complejos nanoestructurados dirigiendo cada componente funcionalizante a una de estas superficies. En estudios previos se demostró que es posible emplear dichos nanotubos para la formación de nanopartículas metálicas en su superficie externa, pero la funcionalización interna no había sido probada.

En este proyecto se propusieron dos objetivos para hacer de VP6 un andamio multifuncional. El primero fue estudiar las condiciones de funcionalización que produjeran complejos metálicos estables coloidalmente, para evitar su agregación pero sin perder sus propiedades ópticas, de tal manera que se expandan sus aplicaciones potenciales. El segundo, el reto principal de este proyecto, fue generar estrategias que permitieran la funcionalización interna de los nanotubos de VP6 con metales.

Se desarrolló una metodología de síntesis de nanopartículas en la pared externa de los nanotubos de VP6, en la que mediante el uso de tioles, se moduló el tamaño de nanopartícula, obteniendo clústeres metálicos cuyos diámetros variaron entre 5 nm y menores a 2 nm. Además se duplicó el valor del potencial Z, que fue la medida de la estabilidad acuosa. Adicionalmente, se logró controlar la resonancia de los plasmones de superficie, hasta su total desaparición, cuando el tamaño de las nanopartículas fue menor que 2 nm. Por otra parte, se demostró, como lo indican otros grupos de investigación, que el volumen de las moléculas tioladas es un factor que influye directamente sobre el tamaño de las partículas sintetizadas y concomitantemente, en sus propiedades fisicoquímicas. Estos resultados son de particular importancia, pues se demostró que es posible ordenar, sobre bio-andamios, partículas con diámetros menores a 2 nm, manteniendo sus propiedades

particulares. Los nanotubos de VP6 demuestran que se puede alcanzar este objetivo a través de procesos sencillos y bajo condiciones ambientales estándar. Esto abre la posibilidad de expandir las aplicaciones de los nanocomplejos en campos como la electrónica y la biomedicina.

La metodología desarrollada para la funcionalización interna de VP6 permitió la síntesis de nanoalambres continuos de plata, con longitudes de hasta 1.5 μm , que se hallan entre las más largas reportadas con el empleo de bio-andamios. La formación de estos nanoalambres, se produjo por la internalización de los precursores debida al movimiento de solvente provocado por sonicación, lo cual también evitó la formación de nanopartículas en el exterior del tubo. Esta modificación en la metodología reportada previamente, demostró tanto la capacidad intrínseca de VP6 para estabilizar iones metálicos en su interior, como la posibilidad de dirigir específicamente las bioreducciones a una u otra superficie de los nanotubos proteicos.

En este proyecto se demostró que es posible lograr la funcionalización de los nanotubos de VP6 en ambas superficies, interna y externa, por lo que tales nanotubos son un andamio ideal para la formación de nanocomplejos.

ABSTRACT

A key area of nanotechnology is the development of hybrid nanocomplexes that allow the arrangement of two or more nanomaterials assembled in the same structure, combining and taking advantage of their individual properties.

In this project we proposed the use of rotavirus VP6 protein nanotubes to assemble nanocomposites. Given the availability of two surfaces (internal and external) in these tubular structures, it is possible to construct nanostructured complexes, directing each functionalizing component to one of these surfaces. Previous studies of our research group demonstrated that VP6 nanotubes can be employed to synthesize metal nanoparticles on its outer surface, but the inner functionalization was not tested.

This project set out two objectives to determine the feasibility of VP6 nanotubes as a multifunctional scaffold. The first was to study the synthesis conditions required to produce colloidally stable metallic complexes, preventing their aggregation without losing their optical properties. The second, the main challenge of this project was to create strategies that allow internal metallic functionalization of VP6 nanotubes. Altogether, the main goal was to expand the potential applications of VP6 scaffold for the manufacture of nanocomposites.

A methodology was developed for the synthesis of nanoparticles in the outer wall of VP6 nanotubes, using thiolated molecules to modulate the particle size. Metallic clusters with diameters ranging from 5 nm to less than 2 nm were obtained, which were characterized by a higher aqueous stability as determined by a Z potential value twice of that of the unmodified nanocomplexes. In addition, it was possible to control the resonance of surface plasmons, until their total disappearance when particles were smaller than 2 nm. Moreover, it was demonstrated, as indicated by other research groups, that the volume of the thiolated molecules is a factor that directly influences the particle size and concomitantly, their physicochemical properties. These results are particularly important, because they showed that it is possible to assemble nanoparticles with diameters less than 2 nm on bio-scaffolds, while keeping

their particular properties. Also, it was showed that this goal can be achieved through simple processes and under mild ambient conditions. This opens the possibility of expanding the nanocomplexes applications in fields such as electronics and biomedicine.

The developed methodology for internal functionalization of VP6 allowed the synthesis of continuous silver nanowires, with lengths of up to 1.5 μm , which are among the longest ones reported to date using bioscaffolds. The formation of these nanowires was produced by the internalization of precursors mediated through solvent motion caused by sonication, which also avoided formation of nanoparticles on the outside of the tube. This modification of the previously reported method, demonstrated both the intrinsic ability of VP6 to stabilize metal ions in its interior, as well as the ability to specifically direct the bioreductions to either surface of the protein nanotubes.

In this work it was demonstrated that VP6 nanotubes can be functionalized on both surfaces, internal and external, and can be considered as an ideal scaffold for the formation of nanocomposites.

1. INTRODUCCIÓN

En el campo de la electrónica, cada dos años durante las últimas cuatro décadas se ha duplicado el rendimiento de los microprocesadores. Esto se debe a que el número de transistores por unidad de área, se incrementó en varios órdenes de magnitud en el mismo periodo, gracias a su miniaturización [1, 2]. Estos avances sólo fueron posibles por el desarrollo de técnicas litográficas que permitieran la construcción de elementos a escala nanométrica.

La nanotecnología y las nanociencias se definen como el área que se enfoca en el desarrollo de métodos de síntesis y análisis para la construcción de estructuras con dimensiones menores a 100 nm, el estudio de las propiedades de dichas estructuras y la aplicación de las mismas y sus propiedades en el desarrollo de nuevos materiales y aparatos funcionales [3].

Durante las dos últimas décadas se ha producido un gran interés por el desarrollo nanotecnológico. Esto se debe principalmente a que cualquier sustancia, sin importar su composición, cuando es miniaturizada hasta la escala nanométrica adquiere propiedades nuevas y diferentes a las del material macroscópico [3], las cuáles pueden ser explotadas en prácticamente cualquier campo de la ciencia y la tecnología. El interés en la nanotecnología y sus áreas relacionadas es tal, que los Estados Unidos de América invirtió 12 mil millones de dólares en investigación y desarrollo en esta área entre los años 2000 al 2011 y el valor de los productos comerciales hasta el año 2009 ascendió a 254 mil millones de dólares en todo el mundo, esperando alcanzar un mercado de 3 billones en 2020 [4].

El desarrollo nanotecnológico depende fundamentalmente de la existencia de métodos sintéticos que permitan controlar la composición y la arquitectura de los objetos a escala nanométrica. En el presente existen numerosas metodologías para la construcción de nano-objetos. El método de litografía más avanzado permite producir alambres con diámetros tan pequeños como 45 nm. Sin embargo, los métodos convencionales de fabricación están alcanzando rápidamente su límite teórico de desempeño [2]. Se requieren nuevas formas de fabricación para producir sistemas más avanzados y en particular, complejos nanoestructurados, en los que

existan diferentes partículas con propiedades específicas ensambladas en un mismo objeto.

La naturaleza es la gran maestra en la construcción de materiales, ensamblajes multifuncionales e incluso máquinas moleculares, las que se han perfeccionado a través de más de 3,000 millones de años de selección natural [5, 6]. Estos nano-objetos que se autoensamblan a través del reconocimiento molecular de sus componentes, pueden ser explotados para fabricar nanoestructuras híbridas, orgánicas-inorgánicas, y estructuras más complejas con miras a su aplicación en tecnologías novedosas. Existen numerosos organismos que naturalmente emplean sus proteínas y otras biomoléculas para crear estructuras inorgánicas, como los huesos, las conchas, las paredes de las células diatomeas, las espículas de esponjas marinas, las partículas de magnetita que producen ciertas bacterias marinas, etc. [7, 8]. Por tanto, la unión de las moléculas orgánicas con los elementos de la nanotecnología es el paso natural para la expansión del desarrollo de nuevos complejos útiles para el hombre.

Una opción ideal para la construcción de nanoestructuras y nanocomplejos son los virus y las partículas pseudo-virales (PPV). Las partículas virales son contenedores proteicos robustos de tamaño nanométrico y de geometría definida y uniforme, que pueden ser modificados para lograr la funcionalización deseada [9]. Diferentes partículas virales se han empleado con éxito para la fabricación de nanoestructuras inorgánicas [10].

En este trabajo proponemos a los nanotubos formados por la proteína VP6 de rotavirus para ensamblar nanocomplejos estructurados. Los nanotubos de VP6 son estructuras altamente organizadas, simétricas y pueden ser usadas como bloques para la construcción ordenada de nanobiomateriales [11, 12]. Estas estructuras ya han sido metalizadas con diferentes metales nobles, logrando diferentes coberturas dependiendo del método de síntesis, con lo cual se ha demostrado su funcionalidad como bio-andamios [13, 14]. Los nanotubos de VP6 poseen dos superficies que pueden ser explotadas para la formación de complejos nanoestructurados, permitiendo la localización específica de las funcionalizaciones metálicas. Para ello se

hace necesario desarrollar metodologías que permitan funcionalizar la parte interna de los nanotubos, el cual es el reto principal del presente proyecto, así como mejorar la síntesis metálica para mantener estables a los complejos en solución. En este trabajo se reportan el desarrollo y los resultados obtenidos de dichas metodologías.

2. ANTECEDENTES

Las nanoestructuras se definen como objetos con dimensiones menores a 100 nm, que poseen un número reducido de átomos y cuyas propiedades únicas no son comparables con las de los átomos ni con las de las estructuras macroscópicas del mismo material [3, 15]. Entre los factores que determinan las propiedades físicas, químicas, ópticas, magnéticas, electrónicas o biológicas de los nanomateriales se encuentran su tamaño, su alta relación superficie-volumen, su composición y su forma [3, 16]. Los atributos particulares de las nanoestructuras son actualmente explotadas en campos tan diversos como la electrónica, la síntesis química, la biomedicina, la biotecnología, etc. Gracias a estas características y al desarrollo de los procesos de fabricación a escala nano, se han obtenido avances tecnológicos muy importantes para nuestra vida moderna, como lo ha sido el incrementar la densidad de los transistores por unidad de área [1], con lo cual se han logrado fabricar equipos electrónicos más rápidos y potentes.

Una de las necesidades fundamentales de la nanotecnología es el desarrollo de métodos de síntesis que permitan controlar las características de las nanoestructuras de manera precisa y al menor costo posible. En los capítulos siguientes se hablará de las tecnologías desarrolladas para controlar el ensamblaje de nanopartículas (NP) en estructuras más complejas, el uso de biomoléculas para facilitar este ensamblaje, y de nuestra propuesta para usar a la proteína VP6 de rotavirus como andamio y molde para la construcción de nanocomplejos.

2.1. Complejos nanoestructurados

Recientemente, el interés de la nanociencia y la nanotecnología se ha dirigido no solo a la miniaturización de las estructuras, sino que la mayor atención se enfoca hacia el desarrollo y construcción de **nanocomplejos (Figura 1)**, en los cuales se ordenan diferentes nanomateriales en una misma estructura con la finalidad de combinar y optimizar sus propiedades individuales e incluso, crear propiedades nuevas derivadas de la interacción entre ellas [17, 18]. Estas propiedades pueden ser

explotadas en la fabricación de dispositivos novedosos y útiles en diversos campos de la tecnología.



Figura 1. Imagen esquemática de un nanocomplejo multifuncional. En una misma estructura están ensamblados polímeros, NP con propiedades ópticas, moléculas de reconocimiento, estructuras magnéticas, etc. Tomado de [19].

El desarrollo tecnológico de nanocomplejos “por diseño” es el objetivo principal en nanotecnología [20] y depende completamente de nuestra habilidad para controlar la síntesis y el ordenamiento de los diferentes materiales en una misma estructura [21]. Existe una gran variedad de métodos de nanofabricación, pero en general, se dividen en dos categorías principales: “top-down” (de arriba hacia abajo o miniaturización) y “bottom-up” (de abajo hacia arriba o ensamblaje). Las metodologías top-down utilizan un material de gran escala como punto de partida y lo reducen hasta las dimensiones requeridas [22]. En su mayoría las técnicas “top-down”, son técnicas litográficas (**Figura 2**) y suelen producir materiales de alta pureza.

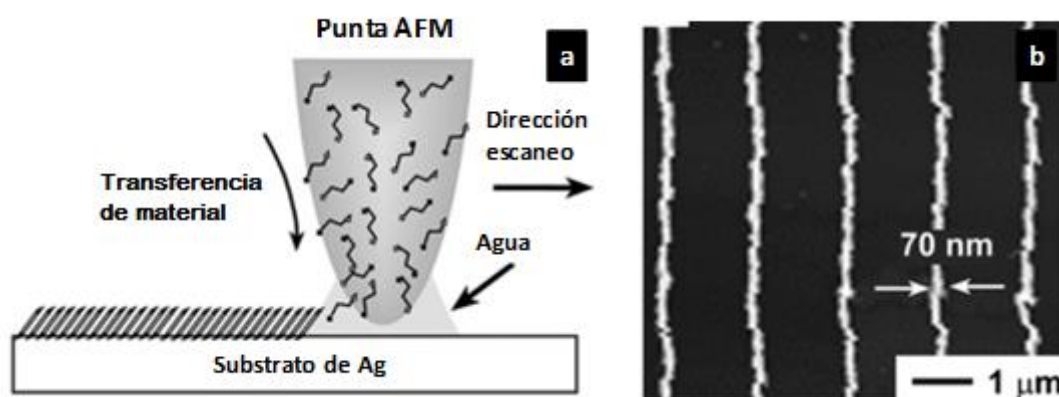


Figura 2. Fabricación por nanolitografía. a) Esquema de la técnica “dip-pen”; b) complejos formados. Modificado de [23].

Posiblemente el mayor éxito de las técnicas de litografía ha sido el desarrollo y fabricación de los microprocesadores que actualmente se utilizan en los equipos de cómputo personales, las consolas de videojuegos, los equipos de telefonía y en los equipos de supercómputo. Los microprocesadores más potentes actualmente en el mercado constan de hasta 3,100 millones de transistores de 22 nm fabricados mediante la metodología "silicon-on-insulator" (SOI) [24, 25].

La construcción de nanocomplejos multifuncionales está en etapa de desarrollo y se prevé que en los próximos 10 años se avance hacia su aplicación práctica [4]. Algunos ejemplos de estos desarrollos se describen a continuación.

Usando la metodología de nanolitografía electroquímica "dip pen", con un microscopio de fuerza atómica (AFM), Maynor y colaboradores [26] fabricaron alambres formados por GaN y Ga₂O₃, los cuáles presentaron un diámetro aproximado de 100 nm y varios micrómetros de longitud, y que mostraron mejor conducción eléctrica que los nanoalambres de un solo material (GaN), por lo que se propuso su uso en circuitos de aparatos electrónicos. Utilizando otra técnica litográfica, la litografía por haz de electrones, Kong y colaboradores [27] formaron transistores "de un solo electrón" a partir de nanotubos de carbono recubiertos con potasio, eliminando el recubrimiento en zonas específicas. Estos transistores mostraron propiedades electrónicas especiales con aplicaciones potenciales en la construcción de circuitos. Brétagne y colaboradores [28] combinaron dos técnicas de fabricación diferentes, la polimerización de plasma a baja presión y la litografía por haz de electrones, para delinear patrones nanométricos en una superficie y confinar en ellos proteínas. Este desarrollo tuvo como objetivo su aplicación en la construcción de biosensores.

Ejemplos como los presentados muestran las posibilidades de construcción de nanocomplejos por técnicas "top-down", sin embargo poseen las desventajas de que requieren de equipos muy sofisticados y procesos costosos para producir nanoestructuras con patrones u ordenamientos precisos, lo cual limita su explotación comercial, además de que algunos procesos difícilmente alcanzan resolución por debajo de los 100 nm [21, 22, 29].

En el caso de la síntesis por técnicas "bottom-up", la materia prima son átomos o moléculas que se unen para formar clústeres y estructuras complejas, ofreciendo la posibilidad de controlar el proceso, y con ello el tamaño, forma y composición de las nanoestructuras, logrando superar las limitaciones técnicas intrínsecas del "top-down" [30]. Una de las ventajas que ofrecen los procesos "bottom up" en la fabricación de nanocomplejos, es que son métodos menos complejos, debido al auto-ensamblaje natural de los componentes, y pueden ser procesos de menor costo, comparados con los procesos "top-down" [17, 22], sin embargo, esto dependerá de la nanoestructura a fabricar.

Un método de fabricación muy empleado es la síntesis en fase líquida. Por ejemplo, Shi y colaboradores construyeron complejos de nanopartículas magnéticas-metálicas (Au-Fe₃O₄), semiconductoras-metálicas (Au-PbS), magnéticas-semiconductoras (PbS-Fe₃O₄) y magnéticas-metálicas-semiconductoras, mediante la nucleación de los componentes sobre una partícula "semilla", en solventes orgánicos a altas temperaturas [18] (**Figura 3a**). Además de que lograron controlar la composición y forma de sus nanocomplejos, observaron que las propiedades intrínsecas de las nanopartículas individuales se modificaban por la conjugación con los otros elementos. Como prueba de concepto, este procedimiento demostró su capacidad para formar nanocomplejos, sin embargo, mostró la desventaja de que no siempre se obtienen complejos composicionalmente uniformes.

Usando un mecanismo "bottom-up" más sofisticado, la síntesis por crecimiento vapor-líquido-sólido, Jung y colaboradores [31] fabricaron nanoalambres de Ge-Sb-Te. En esta técnica, los precursores son evaporados a altas temperaturas (entre 400 y 700°C), los vapores son transportados a una cámara a presión y posteriormente condensados sobre un sustrato. Los nanoalambres (NW) formados presentaron diámetros entre 20 y 200 nm y longitudes de hasta 100 μm y fueron composicionalmente homogéneos. Los análisis de sus propiedades eléctricas mostraron sus capacidades como nano-dispositivos de memoria. Sin embargo, para lograr todas estas características deseables, el proceso se vuelve complejo, costoso y

ambientalmente poco amigable por el uso de altas temperaturas, presiones y equipos avanzados.

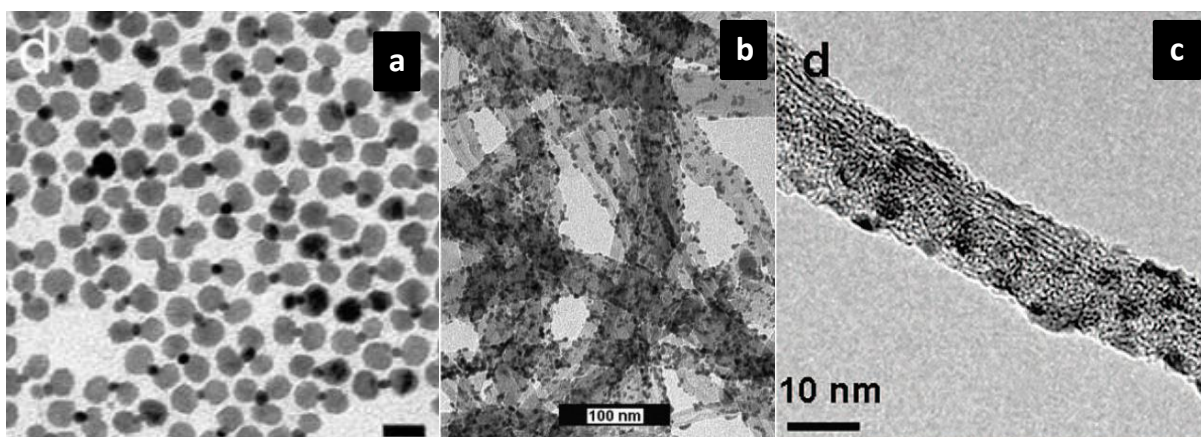


Figura 3. Ejemplos de complejos nanoestructurados formados por técnicas tradicionales "bottom-up".

a) Estructuras Au-Fe₃O₄ (tomado de [18]); b) CNT-NP de Pt (tomado de [32]); c) CNT-Qdot-EGF (tomado de [33]).

Tratando de contrarrestar las desventajas mencionadas para la construcción de estructuras multicomponente, se han desarrollado metodologías alternativas. Un método sencillo y muy utilizado para la construcción de nanocomplejos ha sido el empleo de andamios o "templados" preexistentes, en los cuales se ensamblan y ordenan el resto de los componentes. Para lograr el ensamblaje, es necesario que existan interacciones fuertes entre el andamio y las NP, las cuáles se colocarán en arreglos predefinidos por la topología del andamio [17, 34]. En nanotecnología se clasifican a los andamios utilizados para el ensamblaje de NP en dos tipos principales, "rígidos" y "suaves". En los primeros encontramos a los nanotubos de carbono y otros nanoalambres inorgánicos. Los nanotubos de carbono (CNT) poseen un gran atractivo, tanto por su capacidad para servir como andamios para la construcción de complejos, como por sus características eléctricas propias. Con el objetivo de explotar estas características, Xing y colaboradores desarrollaron una metodología para sintetizar NP de platino sobre CNT activados por sonicación (**Figura 3b**). Su metodología permitió la formación de complejos con partículas con una distribución de tamaño relativamente pequeña y con una actividad electroquímica mejorada en comparación con las NP libres [32]. También se han estudiado a los nanotubos de carbono como andamio para ensamblar nanocomplejos para entrega de fármacos. El grupo de investigación de Bhirde y

colaboradores [33], construyeron un sistema de entrega de fármacos, en el cual integraron cisplatino, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y puntos cuánticos (Qdot) en CNT (**Figura 3c**). En su estudio lograron la rápida internalización de los complejos en células cancerosas, la visualización de dicha internalización y la disminución de más del 60% de la viabilidad celular por efecto del cisplatino.

Pese a que los andamios rígidos ofrecen formas bien definidas para la organización de NP, carecen del control preciso del espaciamiento y la organización de las partículas depositadas [17], además de que para aplicaciones biomédicas se debe considerar que andamios como los CNT son altamente tóxicos para diferentes tipos celulares [35-37], por lo que se deben considerar otras alternativas.

El segundo tipo de andamios para la construcción de complejos nanoestructurados, son los "suaves", entre los que se encuentran polímeros [34, 38], hidrogeles [39] y micelas y bio-moléculas [40]. En comparación con los moldes o andamos rígidos, los suaves tienen la ventaja de que su síntesis se realiza mediante tecnologías menos complejas, menos costosas y potencialmente escalables [34].

Por ejemplo, utilizando el copolímero PFS₁₇-P2VP₁₇₀ el cual forma micelas cilíndricas que pueden ser funcionalizadas con sílice, zirconia, titania, magnetita, u oxido de titanio se pueden formar nanoalambres híbridos [41], demostrando su versatilidad (**Figura 4**).

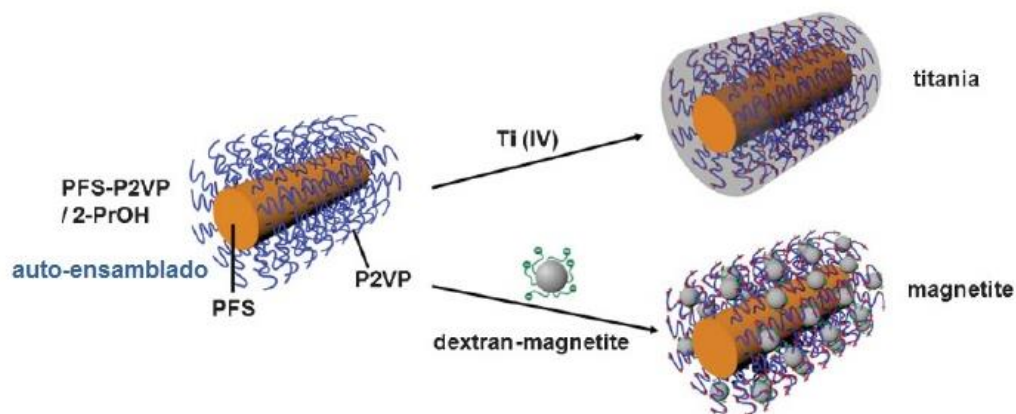


Figura 4. Copolímeros como andamios para la formación de complejos híbridos con compuestos inorgánicos.

2.2. Moléculas biológicas como andamios o moldes en nanotecnología

El uso de los complejos nanoestructurados en aplicaciones novedosas, requiere fundamentalmente de desarrollar procesos en los cuales se controle de manera precisa el ensamblaje de los componentes, la eliminación de impurezas, la reproducibilidad del proceso, la uniformidad de los complejos fabricados y un bajo costo de fabricación. La intersección de los campos de la biotecnología y la nanotecnología para formar una nueva disciplina, la nanobiotecnología [42], permite el desarrollo de nuevos procesos, en los que se pueden conjuntar las herramientas y materiales de escala nano, los cuáles poseen características electrónicas, ópticas y catalíticas únicas, con los sistemas biológicos [43], que ofrecen su capacidad de auto-ensamblaje, sus sitios específicos de funcionalización y su alto grado de organización [44]. Con esto se logran eliminar las deficiencias técnicas de los métodos más tradicionales para la fabricación de nanocomplejos.

Una gran variedad de moléculas biológicas se han utilizado para formar nanocomplejos híbridos, tales como DNA, lípidos, capas-S bacterianas, péptidos, proteínas, partículas pseudo virales (PPV) y virus [21, 44-48]; cada una de las cuáles posee propiedades explotables para la construcción de complejos específicos. Entre las ventajas que ofrecen estos andamios, es que sus estructuras despliegan múltiples sitios de unión específicos a otros materiales, que los procesos de funcionalización se llevan a cabo en agua, no requieren la aplicación de altas temperaturas, solventes orgánicos ni equipos costosos [45, 49], lo que los hace económicamente más atractivos y en muchos casos, son altamente biocompatibles.

Se han desarrollado tecnologías para ensamblar cadenas de oligonucleótidos en geometrías específicas, el llamado "origami de DNA", formando estructuras en dos dimensiones (2-D) y hasta tres dimensiones (3-D) funcionalizadas con NP preformadas de oro, plata o Qdots, o bien, metalizando *in-situ* las cadenas con plata [17, 22], lo que tiene potenciales aplicaciones en nanoelectrónica y biosensores.

Actualmente, ya es posible encontrar productos comerciales basados en nanocomplejos de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la línea UltraAmp™ Multi-Assay Signal Amplifiers, de la compañía Genisphere, son amplificadores de señal para la detección específica de moléculas blanco que pueden ser empleados en ensayos tipo ELISA, inmunodetecciones, inmunoprecipitaciones, etc. Estos amplificadores son estructuras tridimensionales de ADN en las cuales están ensambladas numerosas moléculas marcadoras y moléculas de unión. Las moléculas marcadoras pueden ser fluoróforos, nanopartículas de oro e incluso enzimas como peroxidasa, y las moléculas que se unirán al blanco pueden ser péptidos, secuencias específicas de ácidos nucleicos, proteínas como biotina, e incluso anticuerpos (<http://genisphere.com/our-technology>). Pese a la existencia de estos productos en el mercado, sus aplicaciones siguen siendo limitadas y las metodologías de fabricación siguen representando un reto, tanto para el control de los componentes como para su escalamiento[20].

Los péptidos y las proteínas son biopolímeros muy estudiados para el ensamblaje de nanoestructuras. Estas macromoléculas, comparadas con el DNA, unen con mayor especificidad a sus compuestos blanco y también tienen la propiedad de ensamblarse en estructuras complejas [48]. Otra de sus características deseables, es que pueden ser modificados genéticamente, para obtener múltiples sitios de unión a diferentes compuestos en una misma estructura [50]. En este tenor, Slocik y Naik diseñaron péptidos multifuncionales (Flg-A3 y A3-Flg) para servir como andamio para la síntesis de NP de Au y Pd y demostraron que dichos complejos bifuncionales incrementan la actividad catalítica de las NP [50]. Siguiendo una estrategia diferente para ensamblar complejos nanoestructurados, algunos grupos de investigación han explotado la especificidad de las interacciones proteína-proteína, tales como las interacciones anticuerpo-antígeno o biotina-avidina [51] para conectar NP y nanoalambres (NW). Esta estrategia pretende usar las propiedades conductoras de los complejos formados en futuros circuitos electrónicos.

Los virus son ensamblajes supramoleculares compuestos por una cápside proteica que rodea y protege a su material genético. Si las proteínas de la cápside se expresan de manera recombinante y se ensamblan sin incluir al material genético, se obtienen

PPV [52, 53]. Los virus y las PPV poseen características idóneas para servir como piezas en la construcción de nanocomplejos. Algunas de esas características son [10, 11, 52, 54-57]:

- Sus tamaños se encuentran en el intervalo nanométrico. Pese a que algunos virus filamentosos y PPV tubulares pueden alcanzar varios micrómetros de longitud, mantienen su diámetro menor a 100 nm.
- En comparación con nanomateriales sintetizados artificialmente, sus estructuras y dimensiones son precisas y uniformes.
- Se encuentran en diferentes formas (**Figura 5**): icosaedros, tubos, hélices y algunas PPV poseen polimorfismo. Esto provee una gama de estructuras cuya selección dependerá de la aplicación o proceso requerido.
- Sus secuencias genéticas y estructuras cristalográficas en general son bien conocidas.
- Su producción puede realizarse infectando a sus huéspedes o gracias a su capacidad de auto-ensamblaje, se pueden producir en sistemas de expresión in vitro, ofreciendo la posibilidad de obtenerlos en grandes cantidades y escalar los procesos de producción si la demanda lo requiere.
- Son altamente estables y biocompatibles.
- Sus secuencias pueden ser modificadas mediante ingeniería genética para reemplazar o insertar secuencias que les den nuevas funcionalidades.

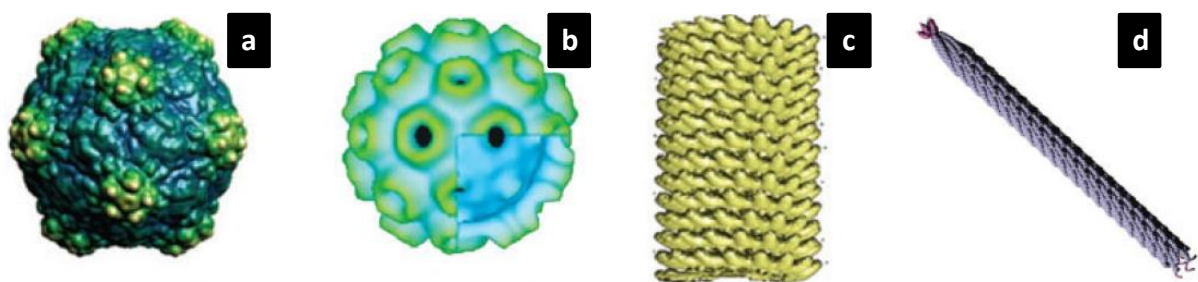


Figura 5. Estructuras de diferentes virus.

a) CPMV; b) CCMV; c) TMV; d) Bacteriófago M13. Modificada de [54].

Si se considera a los virus y las PPV como contenedores proteicos, existen tres sitios posibles de modificación: la superficie externa, la interna y las uniones entre las

subunidades [10] (**Figura 6**), con lo cual se expanden las posibilidades de funcionalización.

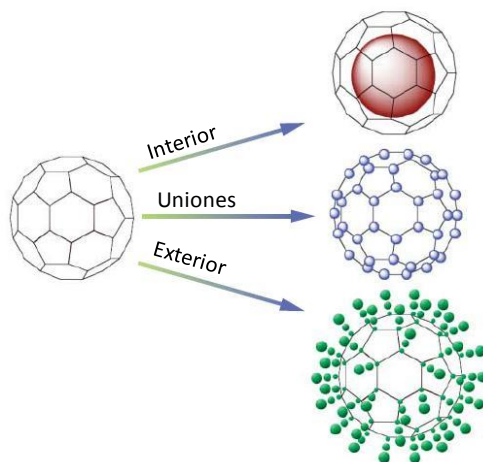


Figura 6. Sitios posibles de modificación y funcionalización en virus y PPV.

Se han empleado diferentes partículas virales como andamios para el ensamblaje de nanomateriales, entre ellas destacan los CCMV, CPMV, TMV, ToMV, que son virus de plantas, y el bacteriófago M13. Con ellos se han ensamblado nanocomplejos mono y multifuncionales, ya sea explotando las propiedades naturales del virus o modificándolas para obtener nuevas funcionalidades.

Douglas y Young, en su trabajo pionero de 1998 [58], usaron PPV del CCMV para encapsular y cristalizar aniones de paratungstato y decavanadato. El CCMV es un virus icosaédrico con un diámetro aproximado de 28.6 nm, formado por 180 copias idénticas de la proteína de la cápside, las cuáles se expanden a pH 6.5, abriendo poros que permiten el paso de solutos hacia el interior de la cápsula, y que se cierran a $\text{pH} < 6.5$. En el trabajo que se menciona, el encapsulamiento de los precursores aniónicos se favoreció por la carga positiva generada por los residuos básicos que se encuentran en la superficie interna del virus.

Otro desarrollo importante en el campo, es el trabajo de Mann y colaboradores [59], quienes emplearon al TMV como molde para la síntesis de nanotubos inorgánicos. El TMV es un virus helicoidal de 300 nm de largo, con un diámetro externo de 18 nm y un canal interno de 4 nm, dentro del cual se protege su material genético. La superficie del virus nativo posee residuos cargados, que sirvieron como centros de

nucleación para estabilizar los diferentes elementos, logrando mineralizar al virus con partículas de CdS, PbS, óxido de Fe e incluso recubriéndolos totalmente con sílice. Otros grupos usaron baños no-electrolíticos para producir NP de Co, Fe, Ni o aleaciones de ellos en el exterior o interior del TMV o en el exterior del CPMV, todo mediante la previa activación de la superficie con Pd(II) o Pt(II) [60-62], o usando dos precursores metálicos para la formación de NW en el interior del TMV [63].

Cabe resaltar, que la fabricación de NW por técnicas nanotecnológicas "tradicionales" ha sido un reto importante, ya que la elongación de materiales en una sola dirección no es un proceso energéticamente favorable y generalmente implica procesos complejos y costosos [34]. Por tanto, el empleo de moldes, como las PPV, que dirijan el crecimiento anisotrópico de estos materiales ha sido un avance tecnológico muy importante. El interés en la formación de estas estructuras 1-D radica principalmente en la posibilidad de usarlas como conectores y elementos funcionales en circuitos electrónicos [34, 64].

Para incrementar la versatilidad de estas y otras partículas virales, se ha optado por modificar las cápsides usando técnicas de biología molecular y conjugación química.

El CPMV es la partícula viral más empleada para su conjugación química con diversos materiales. Este es un virus icosaédrico no envuelto que tiene dos conformaciones debidas al empaquetamiento de dos diferentes RNA. Cada cápside está formada por copias de dos proteínas y expone residuos de lisina que pueden ser empleados para la conjugación de Qdots, Np de oro y CNT mediante el empleo de ésteres de N-hidroxisuccinimida. Para incrementar las posibilidades de conjugación y hacerla más específica, se modificó a la cápside en sitios específicos introduciendo residuos de cisteína que fueron usados para conjugar NP de oro, anticuerpos, oligonucleótidos y otras moléculas pequeñas mediante reacciones con maleimida y tioles (Revisado en [57]).

El CCMV ha sido modificado genéticamente para cambiar el potencial electrostático dentro de la partícula viral [65]. Se reemplazaron residuos básicos por glutámicos, cambiando la carga del interior de la cápside viral a negativa y favoreciendo la oxidación de Fe(II), logrando la formación de NP de óxido de hierro dentro de las cajas proteicas.

En un trabajo más reciente, Kobayashi y colaboradores mutaron residuos específicos en el canal interno del ToMV, un virus filamentoso similar al TMV en dimensiones y estructura, para formar NW magnéticos de Co-Pt [66]. Ellos encontraron que incrementando la carga positiva dentro de la superficie interna del virus se favorecía la nucleación de los iones $[PtCl_4]^{2-}$.

Una metodología recurrentemente empleada es la llamada "phage display", la cual consiste en seleccionar péptidos, expuestos en la superficie de fagos, a través de su afinidad por un material específico. El bacteriófago más usado para el phage display es el M13, un virus filamentoso de 860 nm de largo y 6.5 nm de diámetro, del que existen bibliotecas comerciales con aproximadamente 10^9 secuencias peptídicas aleatorias fusionadas con una de las proteínas de la cápside del virus [67]. Con el uso de esta tecnología se han seleccionado péptidos con afinidad a diversos materiales inorgánicos. Dichas secuencias son insertadas posteriormente, mediante ingeniería genética, en otras proteínas o bien, son mantenidas en los mismos fagos para la construcción de los materiales deseados [52, 68]. De esta manera se han construido NW de diversos materiales magnéticos como FePt, CoPt o semiconductores, ZnS o CdS, usando al bacteriófago M13 como molde [67].

Estos trabajos han demostrado dos características importantes de las PPV y los virus como bloques de nanoconstrucción: la primera, que es posible emplear ciertos residuos en las partículas virales para la nucleación y conjugación de agentes inorgánicos, sin que esto altere el ensamblaje y estructura de las cápsides; y segundo, que una misma cápside puede ser altamente versátil, pudiendo ser funcionalizada con diversos materiales, ya sea por sus sitios naturales de unión o mediante el rediseño de sus proteínas. Esta versatilidad puede ser explotada para incrementar sus posibles aplicaciones.

Se ha mencionado que la construcción de nanocomplejos es del mayor interés en el campo, ya que se pueden explotar las propiedades de diferentes compuestos usando una sola estructura. Algunos grupos de investigación ya han desarrollado métodos de fabricación de nanocomplejos usando como andamios a las partículas virales, demostrando el potencial tecnológico de estas estructuras supramoleculares.

El grupo de Belcher demostró que, mediante ingeniería genética, es posible lograr dos funcionalidades en un mismo virus, el bacteriófago M13 [69, 70]. En el trabajo de Nam y colaboradores [70], insertaron dos péptidos diferentes en la proteína p8, los cuáles se distribuyeron de manera aleatoria en la cápside del virus, y unieron partículas de Co_3O_4 y Au específicamente localizadas en sus péptidos correspondientes. Lee y colaboradores [69] modificaron la pVIII para sintetizar partículas de FePO_4 amorfo y la proteína pIII para unir CNT en el mismo virus. Los nanocomplejos formados poseen propiedades electroquímicas que abren el camino para la fabricación de electrodos para baterías de litio [71].

Los trabajos descritos representan un avance significativo en el desarrollo de nanocomplejos, sin embargo, aún es necesario desarrollar metodologías que controlen con precisión la localización de las funcionalizaciones en las cápsides, así como de andamios que sean capaces de unir diferentes tipos de moléculas sin requerir de modificaciones químicas o genéticas específicas y que su producción sea escalable y de bajo costo.

Por sus características intrínsecas, en este trabajo proponemos a la proteína VP6 de rotavirus expresada heterológamente por el sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-BV) como un andamio ideal para la fabricación de nanocomplejos.

2.3. La proteína VP6 de rotavirus como bloque de construcción

Los rotavirus, son agentes infecciosos ubicuos que causan gastroenteritis, de leve a severa, en infantes y animales [72]. Es por esto que la estructura del virus, la de las proteínas que lo conforman y las interacciones entre ellas han sido ampliamente estudiadas [11, 73-80].

El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*, su material genético está compuesto de once segmentos de RNA de cadena doble (dsRNA), cada uno de los cuáles codifica para una proteína, con excepción del segmento once, que codifica para dos proteínas; su cápside icosaédrica, que mide aproximadamente 75 nm, está formada por tres capas concéntricas de proteína [81] (**Figura 7**).

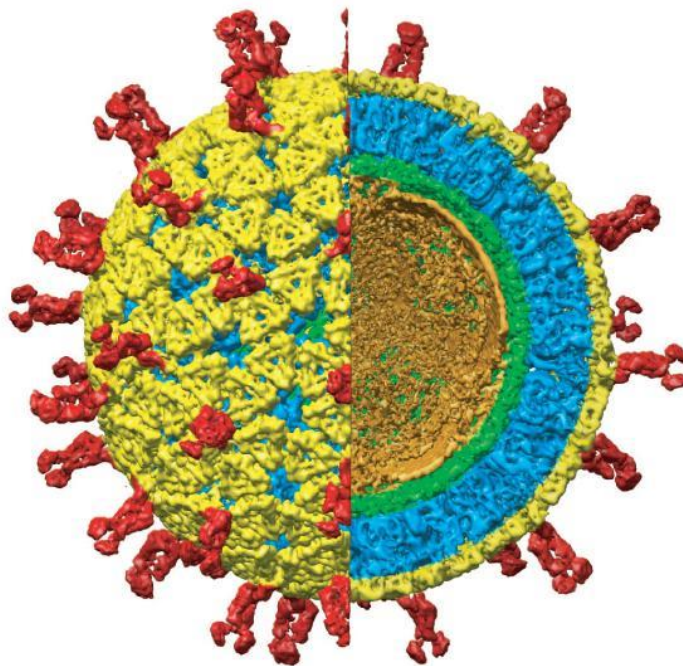


Figura 7. Reconstrucción de la cápside del rotavirus.

En diferentes colores se muestran las proteínas que constituyen el virus. Rojo: espículas formadas por VP4; amarillo: capa de VP7; azul: capa de VP6; verde: capa de VP2; naranja: dsRNA, VP1 y VP3. Tomado de [74].

La nucleocápside se forma por 60 dímeros de la proteína VP2 en un arreglo de triangulación $T=1$, la capa intermedia está formada por 260 trímeros de VP6 en $T=13$ y la capa externa está formada por los trímeros de la glicoproteína VP7 en $T=13$, sobre la cual se encuentran 60 espículas de VP4 de 120 Å [73, 74]. La partícula viral

tiene 132 canales con una profundidad de aproximada de 140 Å [74] que se dividen en tres tipos: I, II y III. Los canales tipo I, localizados en el eje de simetría del pentágono, son relevantes para el ciclo replicativo ya que a través de ellos sale el transcrito de mRNA viral [82]. Las espículas de VP4 están localizadas al borde de los canales tipo II cercanos a los canales tipo I.

Crawford [83] produjo las proteínas estructurales del virus mediante el sistema de expresión células de insecto-baculovirus (SCI-BV) e identificó la formación de PPV de doble y triple capa: VP2/VP6, VP2/VP6/VP4 y VP2/VP6/VP7. En ausencia de las otras proteínas virales, VP6 se auto-ensambla en diferentes estructuras, esferas y nanotubos, dependiendo de las condiciones ambientales [11, 78].

VP6 es la proteína más abundante del virus, representa alrededor del 51 - 60 % de la masa total de proteína [73, 78]. La estructura cuaternaria de VP6 es un trímero, similar a una torre, con una altura de 95 Å y cuya base triangular mide aproximadamente 60 Å por lado.

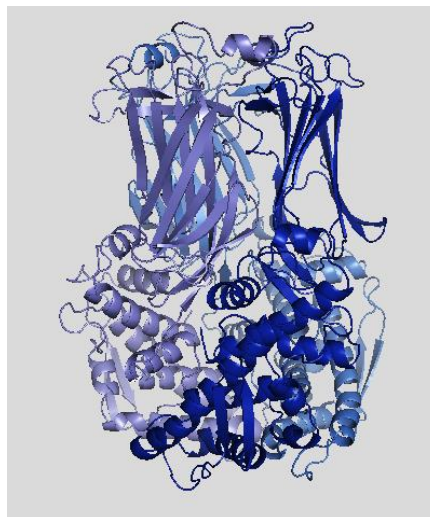


Figura 8. Trimero de VP6.
Modelado en PyMol a través del archivo en PDB 1QHD [76].

La cadena polipeptídica de una subunidad de VP6 consta de 397 residuos, los que se pliegan en dos dominios, el dominio H y el dominio B (**Figura 9**).

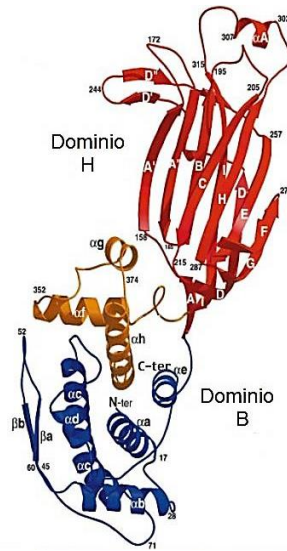


Figura 9. Monómero de VP6.
Modificado de [76].

El dominio H, que comprende de los residuos 151-334, se encuentra en la parte superior de la molécula y está plegado en forma de hojas β . El dominio B, que incluye los residuos 1-150 y 335-397, se encuentra en la base de la molécula y está constituido en su mayoría por residuos hidrofílicos que forman α -hélices [76].

Los trímeros pueden ensamblarse *in vitro* en icosaedros o nanotubos dependiendo del pH del medio, de la fuerza iónica, la concentración de Ca^{2+} y la concentración de proteína. A bajas concentraciones de iones, el pH es el factor principal en el control de la estructura de VP6. A pH menores que 3, la VP6 se encuentra en trímeros; a pH de 3.5 a 5.5 se ensamblan las partículas icosaédricas, mientras que los nanotubos con un diámetro externo de 75 nm se ensamblan a pH entre 5.5 y 7; a pH mayores de 7 se forman nanotubos con diámetros de 45 nm (**Figura 10**).

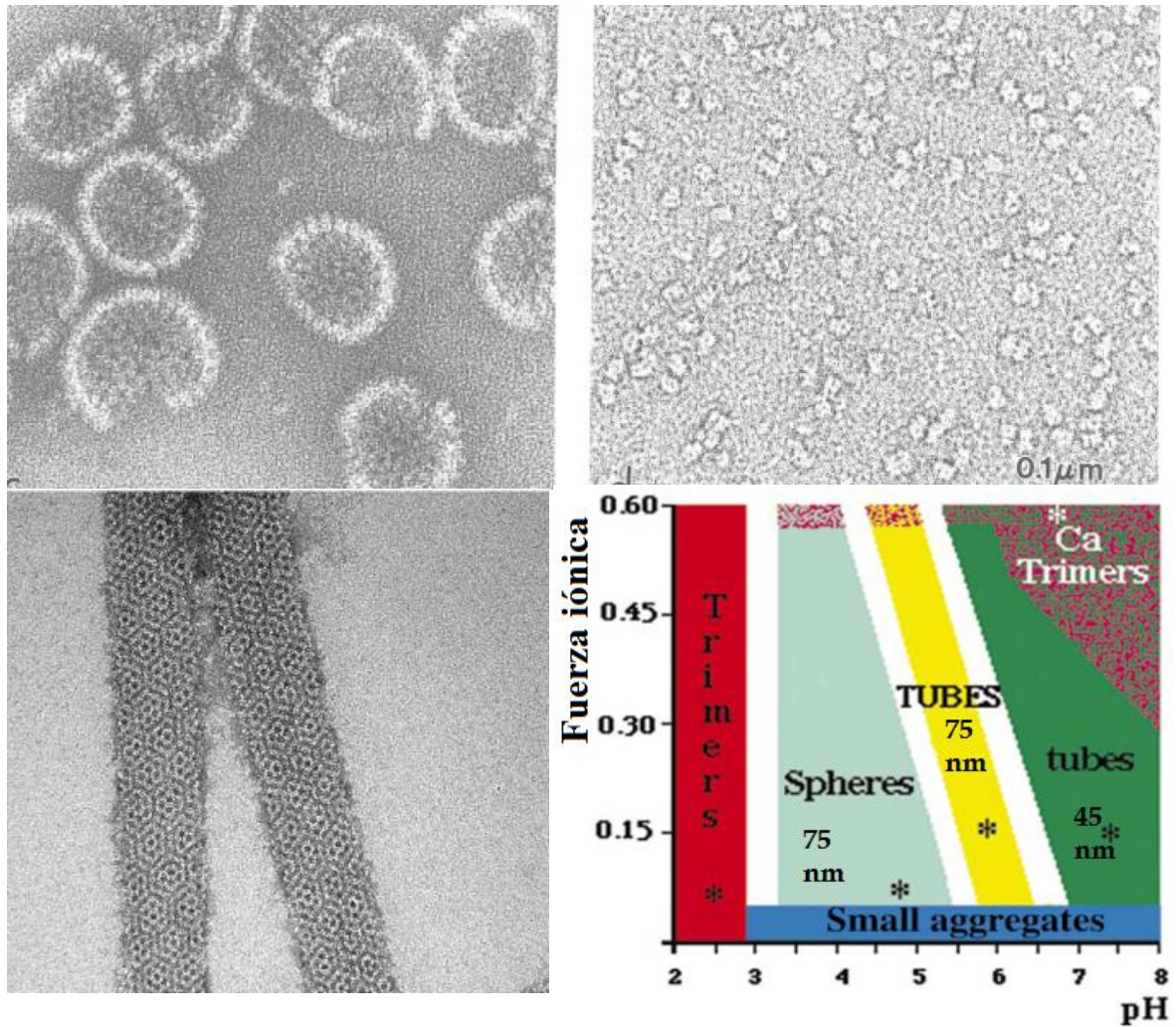


Figura 10. Imágenes de TEM de la proteína VP6 polimórfica. Se muestra su ensamblaje en esferas (superior izquierdo), trimeros (superior derecho) y nanotubos (inferior izquierdo). El cuadro inferior derecho muestra el diagrama de fases que correlaciona pH, fuerza iónica y las estructuras formadas. Tomado y modificado de [11, 84].

Todo lo anterior sugiere que el estado de protonación de la proteína define la forma de su ensamblaje [11], ya que determina los contactos alternativos entre los diferentes trímeros. De acuerdo con Lepault y colaboradores, los nanotubos de VP6 son estructuras helicoidales, en las cuáles los trímeros se ensamblan en arreglos cuasi-hexagonales, y que pueden alcanzar longitudes de hasta 3 μm . Las estructuras pueden ser desestabilizadas por cationes divalentes (Ca^{2+} y Zn^{2+}) a concentraciones mayores a 100 mM [11, 13].

En la estructura reportada por Mathieu, Petitpas y colaboradores [76], existen varios sitios potenciales de unión a metales en la secuencia de aminoácidos. Dichos sitios son las Met295, Met300, Met342, Met394, Cys197, Cys331, His153 y la His316. De ellos, la His153 es muy importante estructuralmente, pues une al ion Zn^{2+} , el cual se encuentra en el eje central entre las tres subunidades, coordinado por un Cl^- y una His153 de cada una de ellas, y que está involucrado en el ensamblaje de la VP6 [85]. El resto de los sitios reportados en la estructura se encuentran principalmente en el dominio H, y la mitad de ellos se encuentran hacia el interior de la proteína o en los contactos intratrímero.

VP6 posee características que la hacen un bio-andamio natural y ventajoso para ensamblar nanocomplejos:

- En comparación con los andamios rígidos de los que se habló en la sección 2.1, los nanotubos de VP6 se sintetizan y ensamblan mediante un método menos costoso, el sistema células de insecto-baculovirus (SCIBV), el cual es un sistema de expresión de proteínas recombinantes que permite obtener grandes cantidades de la proteína de interés, hasta 50% del contenido total de proteína [86]; no se producen subproductos tóxicos y los nanotubos, que se ensamblan en el citosol de las células, son liberados al medio por la lisis celular debida al ciclo del virus, lo que facilita su purificación [14, 77, 86, 87]. Además, los nanotubos de VP6 son estables en agua y no son tóxicos para las células a los que han sido expuestos [88], contrario a sus contrapartes de carbono [89].
- VP6 posee numerosos sitios potenciales de funcionalización, formados por las cadenas laterales de residuos con His, Glu, Asp, Asn, etc. [84, 90] expuestos en su superficie externa e interna, por lo que el andamio no requiere de pre-tratamientos para generar estos sitios reactivos, como lo han requerido los CNT y andamios biológicos como el TMV o el CCMV [33, 60, 65].
- En comparación con otros andamios biológicos, como los virus, los nanotubos de VP6 ofrecen versatilidad, ya que su polimorfismo natural les permite ensamblarse *in vitro* para formar tubos o icosaedros [11, 87], carecen de material genético por lo que no son infectivos y de acuerdo con I. Ríos, es posible manipular la longitud de los tubos a través de cortes transversales producidos por sonicación a bajas amplitudes [91].

Como andamio, VP6 posee dos superficies libres, en el exterior y en el interior de sus nanoestructuras, ambas con posibles sitios reactivos, en las cuáles se podrían ordenar diversas funcionalizaciones metálicas de manera localizada y específica, evitando la competencia por sitios de unión y los impedimentos de funcionalización por efectos estéricos. El desarrollo de metodologías de funcionalización diferencial podrían dar lugar a la formación de diferentes estructuras metálicas, por ejemplo tubos o alambres, o bien el encapsulamiento de material (**Figura 11**).

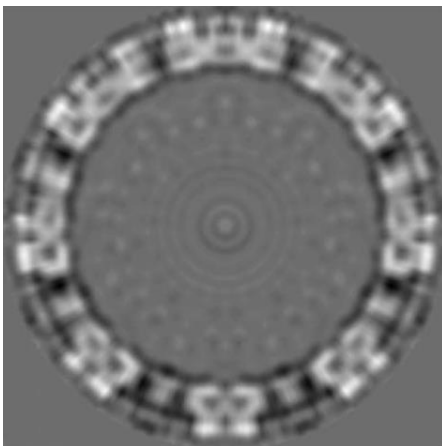


Figura 11. Corte longitudinal de nanotubo de VP6 visto por crio-TEM. Se observa que el interior del nanotubo se encuentra lleno de solvente. Tomado de [11].

De acuerdo con Plascencia-Villa [84], la interacción de los iones metálicos con la proteína se produce principalmente por interacciones electrostáticas determinadas por la protonación de los residuos de unión. Los residuos disponibles para funcionalizarse en las estructuras icosaédricas o en los nanotubos de VP6, son aquellos que en la cápside viral interactúan con VP2 o con VP7 (capas interna y externa, respectivamente). VP6 interactúa con VP7 a través de varias regiones de su dominio H, como las A'-A'', B-C y la hélice αA . Hacia el interior, VP6 interactúa con VP2 en el asa $\beta b-\alpha c$ y en el extremo N-terminal de la hebra βb [74, 76]. En ausencia de VP2 y VP7 estas regiones quedan libres para interactuar con el ambiente y con otras especies químicas.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que es posible emplear la forma tubular de la VP6 de rotavirus para la biorreducción en su superficie externa de diferentes

metales nobles [12, 84], aprovechando el potencial electrostático negativo presente en la superficie externa de los tubos, formando nanopartículas de plata, oro, platino y paladio. Sin embargo, no se encontró evidencia de funcionalización interna. De acuerdo con la literatura, a pH 7-8, en la pared interna de los nanotubos de VP6 se genera un potencial electrostático negativo [76], que permitiría la estabilización de cationes metálicos y su posterior reducción en nanopartículas, pero no se habían desarrollado las metodologías que permitieran corroborar esta hipótesis.

Por tanto, el principal reto del presente proyecto fue generar estrategias que permitieran la funcionalización interna de los nanotubos de VP6 para explotar ambas superficies y permitir la construcción de complejos nanoestructurados.

Por otra parte, se propuso desarrollar metodologías para evitar la agregación de los complejos metálicos, mediante su bifuncionalización con agentes que favorezcan su estabilidad coloidal.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Es posible dirigir la funcionalización de los tubos de VP6 para obtener nanocomplejos metálicos multifuncionales en los que la bio-reducción sea específica topográficamente.

3.2. Objetivo general

Desarrollar procesos a través de los cuáles se puedan funcionalizar con distintos metales a los nanotubos de VP6 del rotavirus de manera diferencial y localizada.

3.3. Objetivos particulares

Desarrollar estrategias para estabilizar coloidalmente a los nanocomplejos metálicos.

Diseñar y aplicar estrategias que permitan funcionalizar la parte interna de los nanotubos de VP6.

Identificar las condiciones del proceso de funcionalización diferencial para construir un complejo nanoestructurado.

Caracterizar las propiedades físicas y químicas de los complejos funcionalizados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivo e infección de células de insecto para producción de VP6

La producción de VP6 se llevó a cabo usando el sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV) que se describe a continuación.

4.1.1. Producción de abastos virales

Se empleó el baculovirus recombinante bacVP6, que fue amablemente donado por la Dra. Susana López (IBT, UNAM) y que contiene el gen de VP6, cepa SA-11 (Simian Agent-11), bajo el promotor de poliedrina (*polh*). La propagación de los virus se realizó infectando células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) a una densidad celular de 1×10^6 cel/mL en medio SF900II-SF (Invitrogen) con una multiplicidad de infección de 0.1 pfu/cel. El cultivo se cosechó a las 96 horas post infección (hpi), se centrifugó a 2000 rpm @ 8°C y se almacenó el sobrenadante con 1% de suero fetal bovino (SFB) en refrigeración (4-8°C).

Los abastos se titularon mediante un ensayo de viabilidad, usando células Sf9 y siguiendo la metodología descrita por Mena y colaboradores [92].

4.1.2. Producción de nanotubos de VP6

Para la producción de los nanotubos de VP6 se empleó la línea celular High Five™ (Invitrogen) que proviene del ovario de *Trichoplusia ni* y crece en suspensión. Se emplearon dos medios de cultivo diferentes: ExCell® 405 (Sigma-Aldrich) o Express Five® (Invitrogen), ambos libres de suero. El cultivo se realizó en matraces de un litro con un volumen de trabajo de 200 mL, agitados a 110 rpm y con control de temperatura a 26.5 °C.

Los cultivos se iniciaron a una densidad celular de 0.5×10^6 cel/mL y viabilidad mayor al 95%; al alcanzar densidad de 1×10^6 cel/mL fueron infectados a multiplicidad de infección de 0.1 pfu/cel con el baculovirus bacVP6.

Los cultivos fueron monitoreados cada 24 h para determinar densidad celular y viabilidad, ambas analizadas en un hemocitómetro mediante la técnica de exclusión por azul de tripano.

Al alcanzar menos del 80% de viabilidad, los cultivos se cosecharon y centrifugaron a 4000 rpm @ 8°C durante 10 min. El sobrenadante fue adicionado con 0.05% de azida de sodio para evitar crecimiento microbiano y fue empleado inmediatamente para purificar la proteína.

4.1.3. Purificación de nanotubos de VP6

La purificación de VP6 se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por nuestro grupo [14]. El sobrenadante del cultivo se concentró tres veces (3x) en un concentrador Amicon (Millipore) usando una membrana de celulosa regenerada con corte de 30 o 100 KDa. Para la cromatografía de intercambio iónico, volúmenes de 25 mL del concentrado fueron inyectados en una columna XK-16 (GE Healthcare) empacada con 30 mL de resina Q-Sepharose FastFlow (GE Healthcare) y equilibrada con al menos 90 mL de buffer Tris-HCl 30 mM, pH 6.16 y 0.1mM de EDTA, eluyendo la fracción adherida a la resina con Tris-HCl 30 mM, pH 6.16 y 1 M NaCl. La cromatografía se llevó a cabo en un sistema ÄktaPrime plus (GE Healthcare) con el cual se controló el flujo a 2.0 mL/min y se monitoreó la absorbancia a 280 nm, la conductividad y el pH. El primer pico del intercambio aniónico se concentró 5x en el sistema Amicon con membrana de 30 KDa y se separó por cromatografía de exclusión en gel. Para dicha cromatografía, se inyectaron alícuotas de 35 mL del concentrado en una columna XK-26 (GE Healthcare) con 400 mL de resina Toyopearl HW65F (TOSOH Biosciences), a un flujo de 2.5 mL. El primer pico, correspondiente a las nanoestructuras de VP6 se colectó y almacenó con 0.05% azida de sodio para su posterior análisis y uso.

4.1.4. Análisis de cantidad de proteína, pureza, identidad y ensamblaje de VP6

La proteína total fue medida mediante el método de Bradford, usando el reactivo del mismo nombre (Bio-Rad), en placas de 96 pozos, adicionando 160 µL de muestra y 40 µL de reactivo. Para la curva tipo se emplearon concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60 y 80 µg/ml de albúmina sérica bovina.

La pureza del purificado fue analizada separando las proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 50 V durante la etapa de concentración y 150 V durante la etapa de separación. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

La identidad de VP6 se determinó mediante ensayos de Western-Blot a partir de los SDS-PAGE transferidos a membranas de PVDF (Millipore). La transferencia se realizó en cámara húmeda (Bio-Rad) a 250 mA constantes durante dos h y manteniendo en hielo la cámara para evitar su calentamiento. Las membranas transferidas fueron bloqueadas con leche sin grasa al 5% en TBS (50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, pH 7.5) por una hora y posteriormente se incubaron una hora más en agitación con suero policlonal de conejo anti-rotavirus cepa NCDV (producido por la M. C. Ruth Pastor) a una dilución de 1:3000 en TBS. Las membranas fueron lavadas durante una hora con cambios de buffer TBS-T (TBS con Tween 20 al 0.1 %) cada 15 minutos. Se incubaron por una hora con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch Labs) a dilución 1:2000 en TBS y se lavó nuevamente con TBS-T. Para detectar la actividad peroxidasa se empleó la solución 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Invitrogen) o el kit de quimioluminiscencia Western Lightning® Plus-ECL (Perkin-Elmer).

El ensamblaje de VP6 se verificó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un JEM-1011 (Jeol, Japón) o un EM900 (Zeiss, Alemania), ambos operados a 80 kV. La visualización de la proteína se alcanzó mediante tinción negativa usando acetato de uranilo al 4% como agente contrastante. La tinción se realizó como sigue: se tomaron 10 µL de muestra con concentración de proteína entre 20 y 200 µg/mL y se colocaron sobre una rejilla de formvar-carbon con 200 divisiones (F-200-Cu, Electron Microscopy Sciences). La muestra se dejó interactuar 5-7 min con la rejilla y se eliminó cuidadosamente el líquido con papel absorbente libre de pelusas, se colocaron 10 µL de acetato de uranilo al 4% sobre la rejilla, se incubó 3 min y se retiró el exceso de líquido con papel absorbente. Se lavó la rejilla con 10 µL de H₂O ultrapura filtrada por 0.22 µm retirando el líquido inmediatamente con un papel absorbente. La rejilla se dejó secar por al menos 12 horas previo a su análisis por TEM.

4.2. Reensamblaje de nanotubos de VP6.

Dependiendo de la integridad estructural de los nanotubos purificados se emplearon directamente para funcionalizarse o fueron reensamblados. El reensamblaje se llevó a cabo en dos etapas [11]. En la primera, se desensambló la proteína adicionando 250 mM de CaCl₂ a una solución de 60 a 200 mg/mL de VP6 en Tris 30mM pH 8.0 y 0.05%

de azida, manteniendo en agitación a temperatura ambiente durante 4 h. En la siguiente etapa, se dializó la solución anterior en una membrana de corte 6-8 kDa (Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Inc.) contra Tris 10 mM pH 7.5, por 18 h a 4°C, con un cambio de buffer.

La distribución de tamaño de VP6 después del desensamblaje y la diálisis fue analizada mediante cromatografía (HPLC) de exclusión en gel, usando una columna Ultrahydrogel 500 (Waters) conectada a un sistema cromatográfico (Waters). La fase móvil fue 10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA pH 8 y se operó a un flujo de 0.9 mL/min. Se registró la absorbancia a 280 nm. Se identificaron los tiempos de retención de las estructuras ensambladas comparando con la curva de calibración realizada como está descrito en [14]. Los tubos reensamblados se almacenaron con 0.05% azida de sodio en refrigeración. El correcto ensamblaje se verificó por TEM mediante tinción negativa.

4.3. Funcionalización externa de nanotubos de VP6 con nanopartículas de oro

4.3.1. Funcionalización sin agentes estabilizantes.

La funcionalización externa de nanotubos de VP6 se realizó siguiendo la metodología reportada previamente por nuestro grupo [84]. Previo a la funcionalización, los nanotubos de VP6 fueron diafiltrados con agua ultrapura (MilliQ Synthesis, Millipore) a través de una membrana de 100 kDa (Amicon Ultra 100K, Merck Millipore) en al menos tres ciclos de cambio de buffer, para alcanzar concentraciones de Tris menores que 30µM. Al finalizar, se midió la concentración de proteína por medio del método en microplaca de Bradford (apartado 4.1.4). En una celda de plástico desechable se mezclaron 25 µg/mL de VP6 con H_{Au}Cl₄ a una concentración final de 0.35 mM y se permitió su interacción durante 3 h, en agitación suave y oscuridad. Se adicionó NaBH₄ a concentración final de 0.35 mM y se permitió la sedimentación de los nanocomplejos por 12 h. Se desechó el sobrenadante y se agregó la misma cantidad de agua ultrapura filtrada.

4.3.2. Funcionalización con agentes estabilizantes.

Se modificó la metodología descrita en el párrafo anterior: Se permitió la interacción de los nanotubos de VP6 con H_{Au}Cl₄ por 3 h y se agregó uno de dos tioles: 3-

mercapto-1-propanosulfonato de sodio (MPSA) (Sigma-Aldrich) o 5-mercaptopentil β -D-glucopiranosido (GlcC₅SH) (amablemente donado por el Dr. Marco Marradi, CIC biomaGUNE, España) a diferentes relaciones con respecto al precursor de oro, incubando durante 15 minutos y posteriormente, reduciendo con NaBH₄, adicionando el reductor en una relación 2:1 con respecto al ión metálico. Las relaciones analizadas tiol/Au fueron: 0.25 (0.088 mM tiol – 0.35mM Au), 0.5 (0.175 mM tiol – 0.35mM Au), 1 (0.35 mM tiol – 0.35mM Au) y 2 (0.7 mM tiol – 0.35mM Au).

4.4. Funcionalización interna de nanotubos de VP6

4.4.1. Reducción metálica en el canal interno de VP6

La funcionalización se realizó usando como precursores metálicos AgNO₃, HAuCl₄ y K₂PdCl₄, a concentraciones de 0.5 - 0.75 mM; como reductores se empleó NaBH₄ a concentraciones equimolares con los precursores metálicos, o ácido cítrico a concentración de 3 mM. Se modificó la metodología de funcionalización externa, usando ciclos de ultrasonicación para introducir los reactantes al lumen del nanotubo de acuerdo a lo descrito por otros grupos [63]. A continuación se describe la metodología.

En un tubo cónico de 1.5 mL se colocaron 20 μ g de VP6 desalada a un volumen final de 1 mL. Se agregó un tercio de la concentración final de la sal metálica, se mezcló e inmediatamente se sonicó (Ultrasonicador Misonix) a amplitudes de 0.5 o 1, durante 3 s. Se repitió este paso dos veces más, para alcanzar la concentración final del precursor metálico, cuidando que la temperatura de la mezcla se mantuviera de 15 a 18 °C. Una vez terminados los tres ciclos de sonicación se incubó la mezcla por 3 h a 18-20 °C, en oscuridad y agitación suave. Al finalizar, se agregó el agente reductor en tres ciclos de sonicación. Se incubaron durante 12-18 h a temperatura ambiente y cubiertos de la luz para que se llevara a cabo la reducción y sedimentaran los complejos. Para eliminar los precursores y nanopartículas no asociadas con los nanotubos, se retiró el sobrenadante y se agregó el mismo volumen de agua ultrapura.

4.4.2. Reensamblaje de VP6 en presencia de nanopartículas (NP)

Se emplearon dos tipos de NP: Np de Au, 40 nm diámetro, carga negativa y Np de FeOx (óxido de hierro), 70 nm diámetro, sin carga. Se reensambló VP6 en presencia de

dichas NP, modificando el procedimiento del reensamblaje de los nanotubos de VP6 descrito en párrafos anteriores. Se desensambló la proteína adicionando 250 mM de CaCl_2 a una solución 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de VP6 en Tris 30mM pH 8 y 0.05% de azida, manteniendo en agitación por 4 h a temperatura ambiente o 4°C "overnight". En la siguiente etapa, a 1 mL de la solución anterior se agregaron nanopartículas de oro a una concentración final de 10 – 40 μM o nanopartículas de FeOx a concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se dializó contra Tris 10 mM pH 7.5 o buffer de acetatos pH 4.6 durante 24 h a 4°C, con cambios de buffer cada 12 h. Las estructuras reensambladas se almacenaron con 0.05% azida en refrigeración.

4.5. Caracterización nanocomplejos proteína-metal

La formación de NP, NR y NW se verificó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un JEM-1011 (Jeol, Japón) o un EM900 (Zeiss, Alemania), ambos operados a 80 kV. Para estos análisis, 10 μL de muestra se colocaron sobre una rejilla de formvar-carbon con 200 divisiones (F-200-Cu, Electron Microscopy Sciences). La muestra se dejó interactuar 10 min con la rejilla y se eliminó cuidadosamente el líquido con papel absorbente libre de pelusas. La rejilla se secó durante 12 horas previo a su análisis. El ensamblaje alrededor de NP se verificó por TEM (JEM-1011, Jeol) empleando tinción negativa con acetato de uranilo 4% como agente contrastante.

Se realizaron análisis de estructura y composición usando un TEM Tecnai F20 (Philips Electron Optics) operado a 200 kV, en colaboración con el doctor Ariosto Medina de la UMSNH o en un HRTEM-2010F (JEOL) a 200kV, así como en un TEM JEM-ARM-200F (JEOL) operado a 80 kV y un FE-SEM S5500 (HITACHI) operado a 30 kV, en colaboración con el doctor German Plascencia Villa de la UTSA.

Se realizaron mediciones de las dimensiones de los nanotubos funcionalizados y NP mediante el uso del programa Image J 1.42q (NIH, USA). Los análisis estadísticos como el test U de Mann-Whitney y el análisis de varianza de Kruskal-Wallis se realizaron usando el programa Sigma Plot 11 (Systat Software, Inc).

Se analizaron los espectros de absorción Uv-Vis de los nanocomplejos en un espectrofotómetro DU65 (Beckman, USA) haciendo barridos a longitudes de onda de 200 a 800 nm, con las muestras a concentraciones de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de VP6.

La estabilidad coloidal de los nanocomplejos se analizó midiendo su potencial Z, mediante un Zetasizer Nano (Malvern, UK), usando celdas desechables recomendadas por el fabricante (DTS1070, Malvern, UK). Se inyectaron cuidadosamente 800 μL de cada muestra en la celda, evitando la formación de burbujas, la muestra se colocó en el equipo y se leyó con los parámetros estándar ofrecidos por el equipo: polistirene latex como material, dispersante agua, temperatura 25 °C, tiempo de equilibrio de temperatura 1 min y duración de la medición automática. Cada muestra individual se leyó por triplicado.

4.6. Ensayos de citotoxicidad en células A-549 y THP-1

4.6.1. Mantenimiento de las líneas celulares

Las células A-549, de origen pulmonar humano, fueron cultivadas en medio DMEM-F12 con 10% de suero fetal bovino (SFB) a temperatura de 37 °C y atmósfera con 5% de CO_2 .

Las células THP-1, que son monocitos humanos, fueron cultivados en medio RPMI adicionado con 10% de SFB, 0.05 mM de 2-mercaptoetanol y 1x de mezcla de antibióticos penicilina, estreptomina y anfotericina B (Sigma), a 37 °C y 5% de CO_2 .

4.6.2. Ensayos de citotoxicidad

Para estos ensayos se emplearon nanocomplejos VP6-Au, sin estabilizante y con estabilizante (MPS y GlcC_5SH).

Las células A-549 se sembraron a densidad de 25×10^3 cel/mL en placas de 96 pozos (5×10^3 cel/pozo) en DMEM-F12 sin suero y antibiótico. Doce horas después se les adicionaron 18, 35 y 70 $\mu\text{g/mL}$ de tubos funcionalizados, esterilizados por UV y dispersados en DMEM-F12 sin suero y con antibiótico.

Las células THP-1 se sembraron a densidad de 25×10^3 cel/mL en placas de 96 pozos y se les adicionó 50 ng/mL de acetato de forbol miristato (PMA), para inducir su diferenciación a macrófagos. Después de 96 h se les adicionaron 18, 35 y 70 $\mu\text{g/mL}$

de tubos funcionalizados, esterilizados por UV y dispersados en RPMI sin suero y con antibiótico.

A las 24 y 48 h de incubación con los nanocomplejos, se analizó la viabilidad celular de ambas líneas mediante el ensayo colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se adicionó a cada pozo 20 μ L de una solución 5 mg/mL de MTT en PBS, incubando durante 3 h a 37°C, 5% CO₂. Al finalizar la incubación, se retiró todo el medio de los pozos, los cristales de formazán se resuspendieron con 200 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO) y se colocaron las muestras en tubos de 1.5 mL. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min y se leyó la absorbancia de 150 μ L de cada sobrenadante a 550 nm (referencia 630 nm).

4.7. Simulación molecular

4.7.1. Preparación de la proteína

El trímero de VP6 se modeló a partir de la estructura 1QHD [76] mediante el programa PyMol 1.2 (Schrödinger, USA) y se optimizó en el servidor YASARA [93] para alcanzar el estado de equilibrio. Para simular las condiciones experimentales, se calculó el estado de protonación de los grupos ionizables de la proteína a pH 5 y 7 mediante el servidor PDB2PQR [94]. El ensamblaje de dos trimeros de VP6 fue modelado en PyMOL usando el archivo PDB 3GZU[95], obtenido del servidor VIPERdb y eliminando las estructuras correspondientes a la proteína VP2.

4.7.2. Preparación de los ligandos

Se construyeron las especies metálicas mediante el programa Maestro (Schrödinger, USA) y se optimizó su estructura molecular al nivel de teoría b3lyp/lacv3p**++ con el programa Jaguar (Schrödinger, USA). Las estructuras modeladas fueron Ag⁺, [AuCl₄]⁻, [AuCl₂(OH)₂]⁻.

4.7.3. Predicción de sitios de unión a metales en VP6

Para realizar la simulación del acoplamiento molecular "docking" se utilizaron los programas AutoGrid 4.0 y AutoDock 4.0 [96, 97], que emplean un algoritmo genético

Lamarckiano para determinar los potenciales sitios de interacción. El algoritmo genético, es un método de optimización y búsqueda, en este caso del sitio de unión más favorable entre el ligando y la proteína. Como un primer paso el programa genera una población, la cual en varias generaciones muta, intercambia parámetros conformacionales y compete de manera análoga a la evolución biológica, lo cual selecciona a los individuos con la menor energía de unión, es decir, la más favorable. El aspecto "Lamarckiano" permite que configuraciones individuales busquen sus propias configuraciones espaciales, encuentre su mínima energía y "hereden" esta información a su progenie [97].

Se construyó una red con 0.375 Å de espaciamiento en la parte superior o inferior del trímero, usando los parámetros estándar del programa, con un tamaño poblacional de 150 y realizando 100 corridas por ensayo. Las estructuras mejor clasificadas fueron analizadas con el software ADLTools (The Scripps Research Institute) y PyMOL (Schrödinger).

El docking se realizó utilizando el clúster del IBT.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este proyecto propusimos explotar la disponibilidad de dos superficies en los nanotubos de VP6 para dirigir y controlar la localización de las funcionalizaciones y así, construir nanocomplejos con diferentes propiedades y potenciales aplicaciones. Los resultados de las estrategias desarrolladas e implementadas para funcionalizar una u otra superficie, se describen a continuación.

Este apartado se divide en tres secciones, la primera de ellas muestra la producción del andamio proteico, la segunda hablará del estudio para bi-funcionalizar la superficie externa de los nanotubos de VP6 con NP metálicas y agentes estabilizantes y la última sección, hablará de las estrategias diseñadas para producir nanoestructuras en el canal interno de los nanotubos de VP6.

5.1. Producción y purificación de nanotubos

La producción de la proteína VP6 se realizó empleando el sistema de expresión CI-BV, que ofrece la posibilidad de producir la proteína recombinante en altas cantidades, llegando a ser hasta el 50% de la proteína total [86]. Se eligió infectar a las células High Five™ con el bacVP6 a multiplicidad de infección (MDI) de 0.1 pfu/cel para maximizar la producción de la proteína. De acuerdo con Plascencia-Villa y colaboradores [13], esta estrategia permite infectar inicialmente sólo el 10% de la población celular, permitiendo que el resto de las células no infectadas se multiplique y posteriormente, se infecten por la progenie viral durante el proceso de infección secundaria. En la **Figura 12** se muestra una curva típica de crecimiento y viabilidad en células infectadas y no infectadas con bacVP6.

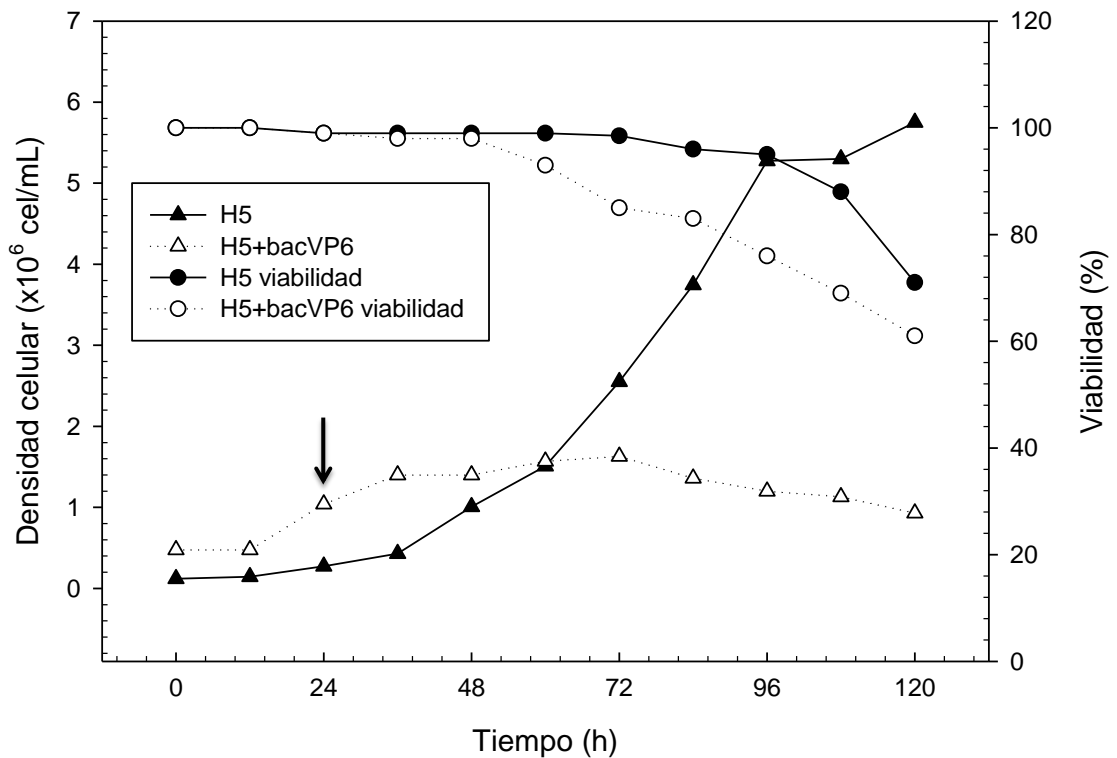


Figura 12. Curva de crecimiento y viabilidad de células H5 sin infectar e infectadas con el bacVP6. La flecha indica el momento de la infección.

De acuerdo con Mena y colaboradores [77, 87], las condiciones de pH y fuerza iónica dentro de las células de insecto favorecen el auto-ensamblaje de la proteína VP6 en nanotubos, los cuáles se acumulan en el citoplasma. La lisis celular, debida al ciclo infectivo del virus, provoca la liberación de los nanotubos. A través de ensayos tipo western blot se corroboró la presencia de VP6 en el caldo de cultivo (**Figura 13**).

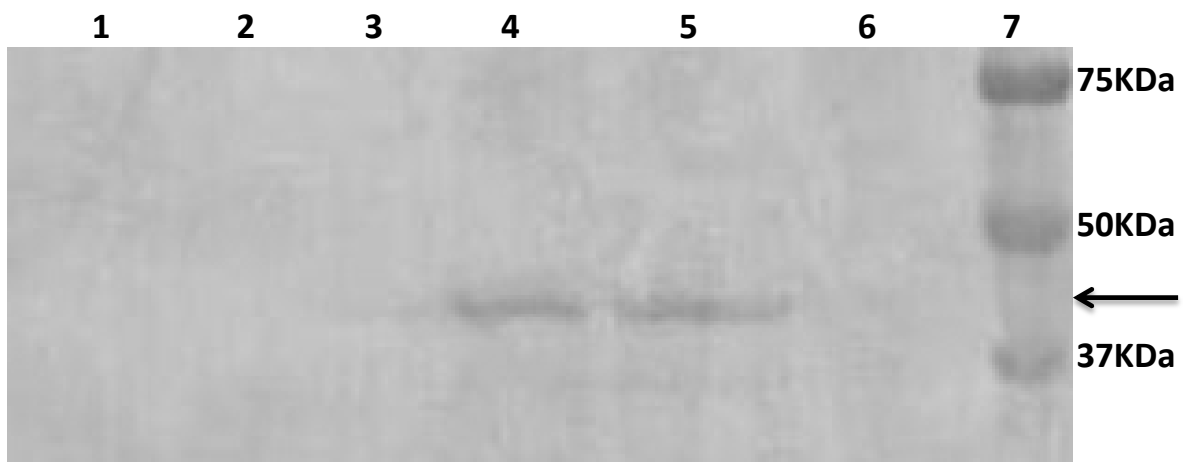


Figura 13. Detección de VP6 por Western blot en caldo de cultivo. Carriles: 1) 24 hpi; 2) 48 hpi; 3) 72 hpi; 4) 96 hpi; 5) 120 hpi; 6) control negativo (sobrenadante de un cultivo sin infectar); 7) Marcador de peso molecular Dual Color (BioRad). VP6 (45 KDa) aparece en el caldo de cultivo sólo a las 96 y 120 hpi.

A las 96 y 120 hpi, que corresponden a 80% y 60 % de viabilidad respectivamente, se observó la mayor cantidad de VP6 en sobrenadante. Los cultivos fueron cosechados y centrifugados para separar el sobrenadante cuando la viabilidad disminuyó al 80%, sin permitir que alcanzara menos del 60%, de tal manera que se conservara la integridad estructural de los nanotubos, la cual puede estar comprometida por la liberación de proteasas al medio de cultivo por la misma lisis celular. Análisis previos de nuestro grupo y de este mismo trabajo, han mostrado que en el pellet celular permanece una gran cantidad de VP6, aproximadamente el 50% de la VP6 producida, sin embargo no se realizó la purificación de esta proteína pues la ruptura celular también podría comprometer la integridad de los nanotubos [13]. De acuerdo con Plascencia-Villa y Ríos de Anda [13, 91], la integridad estructural de los nanotubos es fundamental para su funcionalización y el mantenimiento de sus propiedades mecánicas.

Una de las ventajas de producción de VP6 en el SCI-BV es la liberación de los nanotubos al caldo de cultivo, lo que facilita su purificación, la cual requiere sólo de dos etapas cromatográficas: una etapa de intercambio iónico y una de exclusión por tamaño. Entre ambas etapas se concentra, usando una membrana de 100 kDa, el caldo de cultivo o la fracción que se inyectará en la columna [14]. La cromatografía por intercambio iónico tiene como objetivo eliminar las impurezas más abundantes que son los baculovirus producidos por la infección de las células y los ácidos nucleicos liberados al medio por la lisis celular, así como otras proteínas de carga negativa. En la segunda etapa, la cromatografía de filtración en gel, se tiene como objetivo la separación de los nanotubos de VP6 del resto de proteínas de bajo peso molecular y VP6 no ensamblada.

En la siguiente figura (**Figura 14**) se presentan el análisis por SDS-PAGE del proceso total de purificación de VP6.

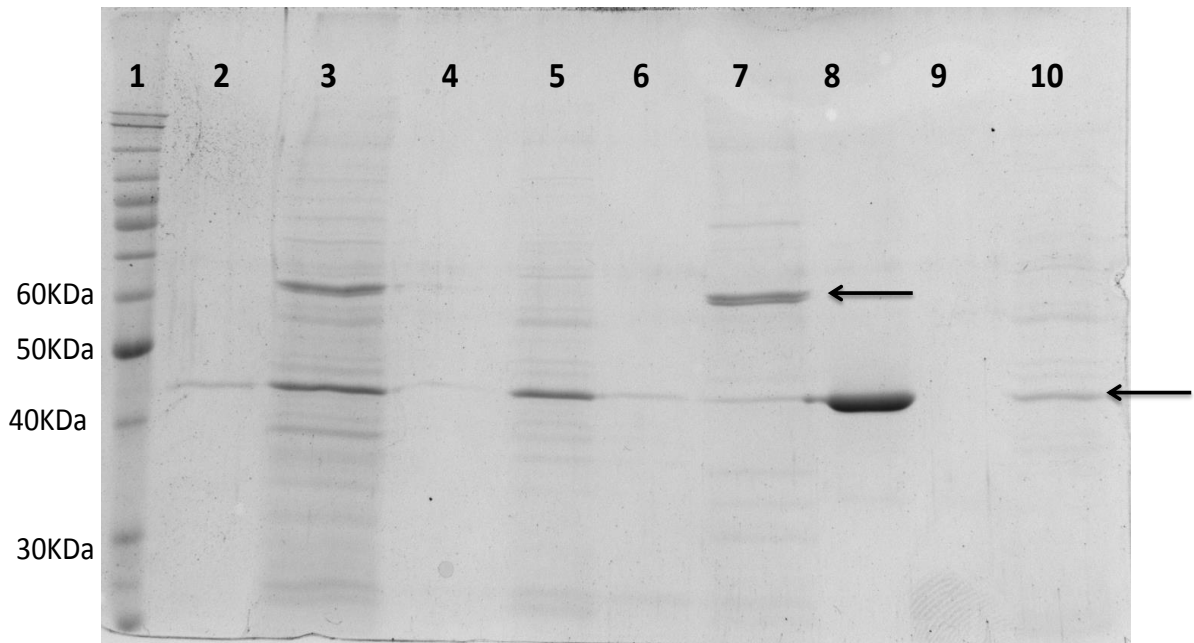


Figura 14. Análisis por SDS-PAGE de las etapas de purificación de VP6. Carriles: 1) Marcador de peso molecular BenchMark™. 2) Control positivo de VP6 (VP6 pura). 3) Caldo de cultivo cosechado. 4) Permeado caldo de cultivo. 5) Pico 1, intercambio aniónico. 6) Permeado pico 1, intercambio aniónico. 7) Pico 2, intercambio aniónico. 8) Pico 1, exclusión en gel. 9) Permeado pico 1, exclusión en gel. 10) Pico 2, exclusión en gel. La flecha superior muestra las bandas de la proteína gp64 (64 kDa) perteneciente al baculovirus. La flecha inferior muestra las bandas de la proteína VP6 (45 KDa).

En el SDS-PAGE se observó como la banda de VP6, que corresponde a 45 kDa, se enriqueció a través de las diferentes etapas de purificación. En el carril correspondiente al primer pico del intercambio iónico, se observa que el mayor componente fue VP6, entre otras proteínas contaminantes que no interactuaron con la columna. En cambio, en el carril correspondiente al segundo pico de la misma etapa, la presencia de la banda de VP6 es menor, mientras que se ve enriquecido con la proteína gp64, la cual se localiza en la envoltura lipídica del baculovirus, indicando que el proceso de eliminación de este virus fue satisfactorio. En la etapa de filtración en gel, las proteínas de bajo peso molecular y la VP6 no ensamblada en nanoestructuras salen de la columna en el segundo pico, como se observa en el carril 10 de la **Figura 14**, mientras que los nanotubos, que no interactúan con la columna, se encontraron en el primer pico (carril 8). Al final del proceso se obtuvo VP6 con una pureza de 95 - 96% (intensidad carril 8) lo cual es similar a lo reportado previamente [14, 91].

La VP6 purificada fue concentrada hasta 100 -200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y analizada por microscopía electrónica para determinar su ensamblaje. En la **Figura 15** se muestran las estructuras purificadas.

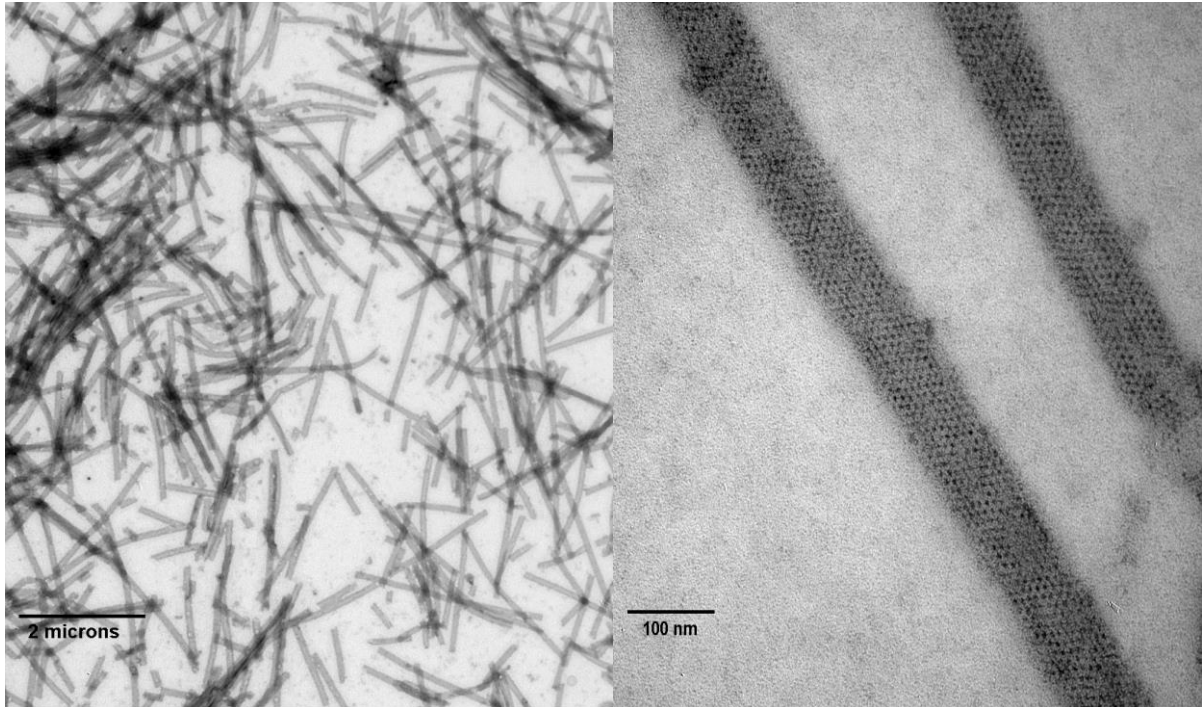


Figura 15. Micrografías electrónicas de los nanotubos de VP6 purificados. A la izquierda se observan que los nanotubos de VP6 pueden alcanzar más de 2 μm de longitud. A la derecha se muestra un nanotubo a alta magnificación, observándose el arreglo hexagonal de los trímeros.

Con los resultados anteriores se demostró que la producción y purificación del andamio proteico, son procesos que no requieren de la aplicación de altas temperaturas, se realizan en condiciones ambientales, en líquido y sin generar subproductos tóxicos, lo que comparado con las metodologías nanotecnológicas tradicionales, representan ventajas económicas y ambientales. Otra ventaja importante de estos procesos es que el volumen de producción puede escalarse de manera reproducible de acuerdo a la demanda del producto, además de que puede ser aplicado para la fabricación de otras partículas pseudo-virales. Estas y otras ventajas los hace atractivos tecnológicamente y comercialmente [98].

De acuerdo con estudios anteriores [84] el correcto ensamblaje de los nanotubos de VP6 es un factor determinante para llevar a cabo la reducción de nanopartículas metálicas en su superficie. Condiciones como la osmolaridad del medio de cultivo, la

condición de las células productoras, la capacidad productora del virus y el tiempo de cosecha, son factores determinantes para obtener nanotubos con la calidad estructural (correcto ensamblaje) suficiente para su funcionalización. Cuando esto no ocurre, es posible corregir la estructura a través de re-ensamblaje. Está reportado que el ion Ca^{2+} se une a ciertos residuos de VP6 involucrados en los contactos intra e inter trímeros [76], de tal manera que permite desensamblar los nanotubos. La posterior eliminación de Ca^{2+} por diálisis o diafiltración en condiciones controladas de pH y fuerza iónica, permite el reensamblaje de las nanoestructuras [11]. Para explotar esta característica de nuestra proteína y conseguir nanotubos correctamente ensamblados, se modificó el método reportado por Lepault [11] desensamblando con 250 mM de calcio y reensamblando mediante diálisis contra buffer Tris-HCl a pH 7.5. Se realizaron análisis por SEC-HPLC de muestras con calcio y dializadas, lo que se muestra en la **Figura 16**.

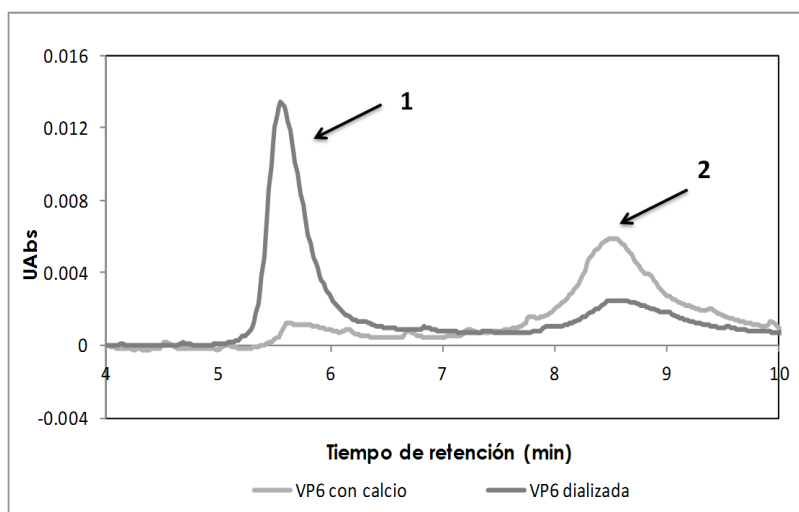


Figura 16. Perfil del análisis del tamaño de VP6 por HPLC.
1) Pico de macroestructuras. 2) Pico de monómero y trímeros de VP6.

Se observó que la VP6 con calcio presentaba un pico mayoritario de absorción a 280 nm al tiempo de retención reportado para los monómeros y trímeros, mientras que la VP6 dializada mostró el pico de mayor absorción en el tiempo de retención reportado para macroestructuras de VP6 [87]. La observación microscópica de las estructuras obtenidas por diálisis mostró tubos estructuralmente idénticos a los mostrados en la **Figura 17**.

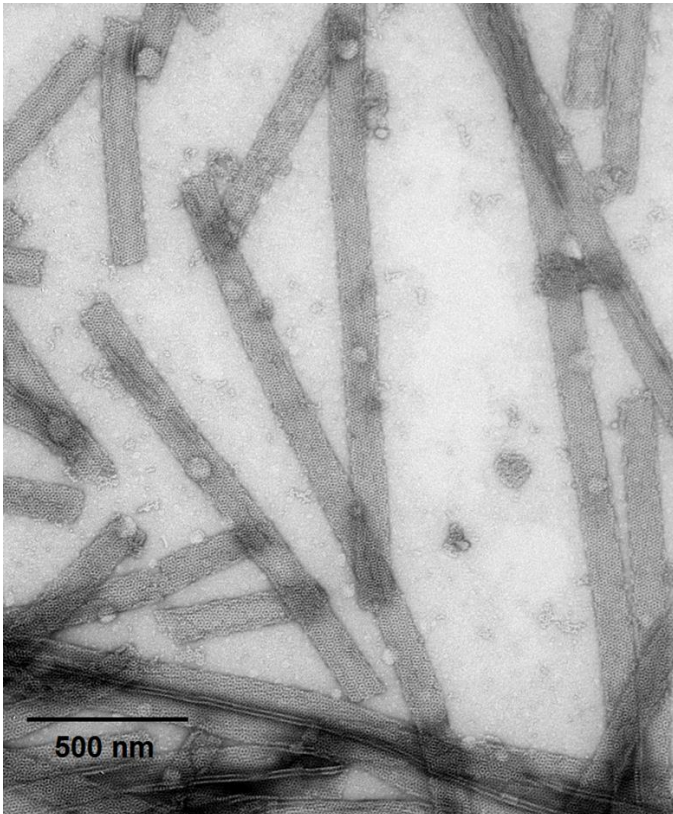


Figura 17. Nanotubos de VP6 re-ensamblados mediante diálisis. Se observan nanotubos con longitudes desde 0.5 μm , bordes definidos y diámetros constantes.

Un dato importante a resaltar es que en estos ensayos de des-ensamblaje/re-ensamblaje la concentración de proteína se mantuvo entre 60 y 200 $\mu\text{g/mL}$ en ambas etapas, mostrando que es posible re-ensamblar a VP6 por diálisis a concentraciones hasta 6 veces menores que lo reportado por Mena [87] y 100 veces menores a lo reportado por Lepault [11]. El reensamblaje de VP6, a estas concentraciones de proteína también fue alcanzado mediante diafiltración en el estudio realizado por loatzin Ríos en su tesis de licenciatura [91].

Los tubos purificados o re-ensamblados fueron empleados como andamios para la construcción de los nanocomplejos de VP6, cuyas estrategias de producción se describen en los capítulos siguientes.

5.2. Bifuncionalización externa de los nanotubos de VP6

Los nanotubos de VP6 ya han demostrado que tienen la capacidad intrínseca de unir metales y permitir la reducción de NP metálicas en su superficie externa [84]. Estos nanocomplejos VP6/NP poseen propiedades ópticas y eléctricas que tienen potenciales aplicaciones en áreas tan diversas como la biomedicina y la electrónica. Sin embargo, debido a que las NP se encuentran en estado metálico (Au^0 , Ag^0 , etc.), en la superficie de los nanocomplejos no hay carga, por lo que se agregan y sedimentan. Lo anterior limita su empleo, pues ciertas aplicaciones, como la construcción de bioelectrónicos y biosensores, requerirán de la composición precisa, así como del ordenamiento y estabilidad coloidal de las NP sobre los nanocomplejos [99, 100]. Por otra parte, un punto crítico a considerar, es que la falta de estabilidad de las NP, reflejada como la agregación de los nanocomplejos, disminuye la reproducibilidad de los experimentos realizados con los complejos y su viabilidad como materiales reales [101]. Así, se hace necesario aplicar estrategias para alcanzar y mantener su dispersión.

La estrategia propuesta en este trabajo para evitar la aglomeración de los nanocomplejos metálicos fue la doble funcionalización de VP6: la reducción de nanopartículas de oro y el recubrimiento de los complejos VP6- NP de Au con compuestos tiolados. Este tipo de compuestos han sido empleados anteriormente debido a que el Au y el grupo SH forman un fuerte enlace covalente Au-tiolato [102]. Sin embargo, una de las cuestiones importantes a considerar en la síntesis de NP recubiertas con estabilizantes, es que los ligandos modifican el tamaño y las propiedades del núcleo metálico. A continuación se describen los cambios que se produjeron en los nanocomplejos de VP6 al sintetizarse en presencia de los compuestos tiolados.

El primer tiol probado fue el 3-mercaptopropano sulfonato de sodio (MPS) (Sigma-Aldrich) cuya estructura molecular se muestra en la **Figura 18**, el cual consiste de un grupo sulfidrilo unido a una cadena de tres carbonos con un grupo sulfonato en su extremo y que ya ha demostrado ser un buen agente estabilizante en la preparación de nanopartículas dispersas [103, 104].

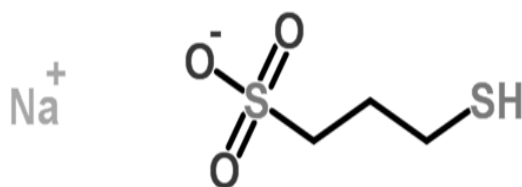


Figura 18. Estructura química del MPS.

El grupo SH reacciona con los átomos de Au para formar un enlace RS-Au. ChemSpider ID: 78666.

La metodología descrita por Plascencia-Villa [84] se modificó, adicionando las cantidades de tiol necesarias para alcanzar diferentes relaciones mol/mol de tiol con respecto al Au (tiol/Au). Las relaciones estudiadas fueron 0.25, 0.5, 1 y 2. La formación de las NP y su recubrimiento se produjo mediante la adición de un donador de electrones. En la **Figura 19** se muestra el aspecto macroscópico de los nanocomplejos formados.

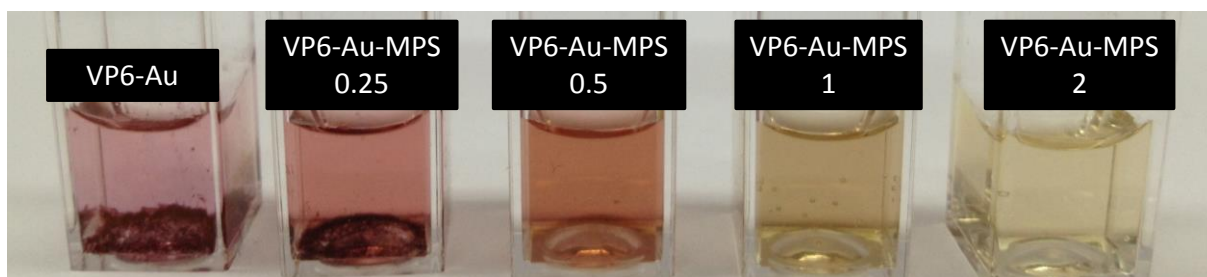


Figura 19. Coloración de los nanocomplejos bifuncionales de VP6 con nanopartículas de oro modificadas superficialmente con MPS.

Los nanocomplejos sin modificación superficial se nombran como VP6-Au. Se sintetizaron nanocomplejos con relaciones molares de tiol con respecto de Au (tiol/Au) de 0.25, 0.5, 1 (concentraciones equimolares) y 2.

La adición de los agentes estabilizantes modificó la apariencia macroscópica de los nanocomplejos de oro. Se observa además que los nanocomplejos sin tioles muestran aglomerados, sedimento y una coloración roja. Conforme incrementó la relación de tiol/Au se observó una disminución en los aglomerados y la pérdida de coloración en las soluciones. Estas características macroscópicas se relacionaron con un cambio en las propiedades de las NP reducidas sobre VP6, las cuáles se analizarán a continuación.

5.2.1. Modulación del tamaño de partícula

En la **Figura 20** se muestran las micrografías electrónicas de los nanocomplejos VP6-Au-MPS a las diferentes relaciones molares de tiol con respecto a Au probadas.

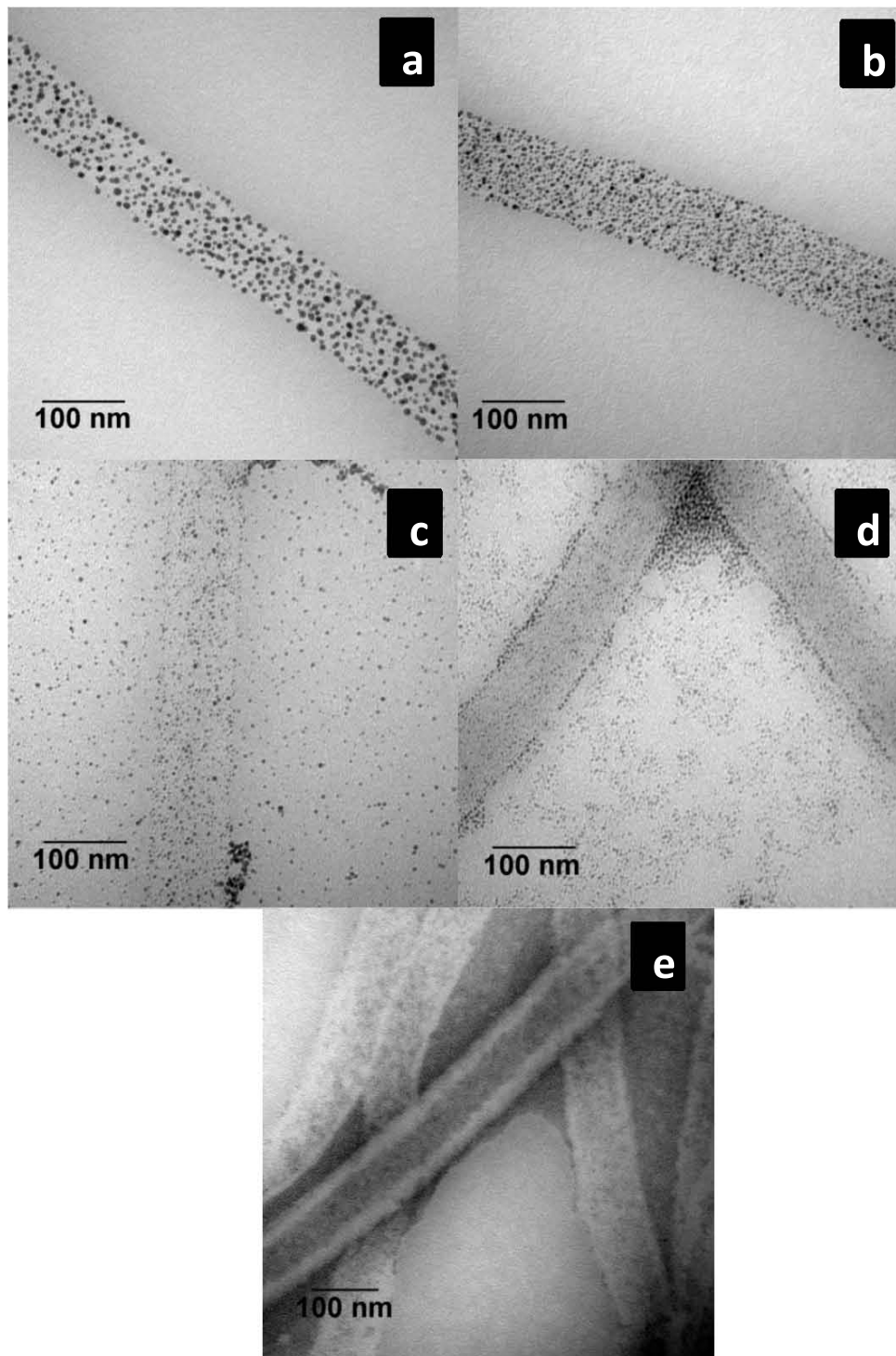


Figura 20. Micrografías nanocomplejos VP6-Au recubiertos con MPS. Diferentes relaciones mol/mol. a) Sin tiol; b) Tiol/Au 0.25; c) Tiol/Au 0.5; d) Tiol/Au 1; e) Tiol/Au 2. Ninguna de las muestras fue teñida para su observación microscópica.

Para corroborar la presencia de metal sobre los nanotubos de VP6, los nanocomplejos se analizaron por ADF-STEM. En la técnica ADF-STEM se generan imágenes que presentan intensidades diferentes dependiendo del número atómico (Z) de los elementos presentes en la muestra, de tal manera que los elementos más pesados, por ejemplo el oro, tendrán mayor contraste que los elementos más ligeros, como el carbono, nitrógeno, oxígeno que forman al nanotubo proteico (**Figura 21**).

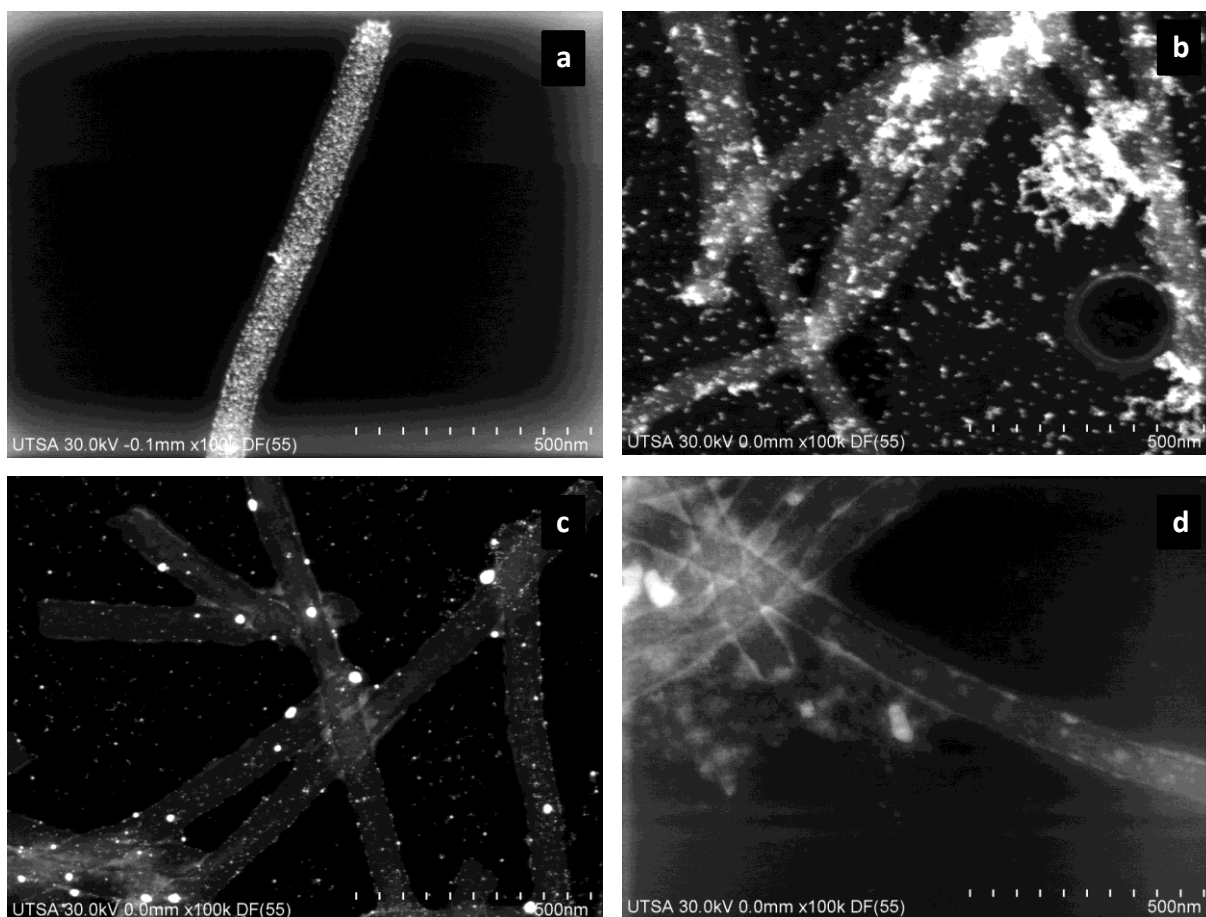


Figura 21. DF-STEM de los nanocomplejos VP6-Au-MPS.

Diferentes relaciones molares tiol/Au: a) 0.25; b) 0.5; c) 1; d) 2. Se observa que la intensidad de la señal aparente del elemento más pesado (Au) disminuye al incrementar el contenido de tiol en la muestra.

Las micrografías tomados por TEM (**Figura 20**) muestran que la doble funcionalización no modificó la estructura tubular de VP6 y que los diámetros de los tubos se mantuvieron entre 70 y 80 nm. Sin embargo, se muestra una clara disminución en el tamaño de las NP con el incremento de la relación molar entre el MPS y el Au. Mediante el uso del programa ImageJ se midió el diámetro de las nanopartículas reducidas sobre VP6 y se encontraron los resultados mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de tamaños de nanopartícula entre los diferentes complejos bifuncionalizados.

	VP6-Au	VP6-Au-MPS 0.25	VP6-Au-MPS 0.5	VP6-AuMPS 1	VP6-Au-MPS 2
Diámetro promedio (nm)	4.9 ± 1.9	3.5 ± 1.3	2.6 ± 1.1	2.2 ± 0.9	< 2

Los diámetros de las NP de los nanocomplejos a relación tiol/Au (mol/mol) de 2 se reportan como “< 2” por la dificultad técnica de medir el tamaño de partículas tan pequeñas.

El promedio de los tamaños de las partículas disminuyó de alrededor de 5 nm hasta menos de 2 nm. En nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que muestra la modulación del tamaño de los centros metálicos mediante moléculas tioladas sobre un nanotubo proteico, lo que representa un aporte en el conocimiento de las capacidades como estabilizantes de este tipo de andamios.

La modificación del tamaño del centro metálico debido a la presencia de ligandos tiolados ha sido estudiada desde que Brust y colaboradores desarrollaron el método para sintetizar clústeres de oro recubiertos con el compuesto 1-dodecanetiol para evitar su agregación [105]. Un ejemplo de este tipo de estudios fue el realizado por Leff y colaboradores, quienes usando diferentes relaciones de 1-dodecanetiol y HAuCl_4 , lograron sintetizar NP con diámetros que variaban de 1.5 hasta 20 nm, logrando que dichos clústeres fueran estables y solubles en solventes orgánicos [106]; lo mismo demostraron Hostetler y colaboradores [107], quienes variaron la relación tiol/Au, así como la temperatura de reacción y la velocidad de adición del reductor y obtuvieron tamaños de partícula de 1.5 a 5.2 nm. Por otra parte, Yonezawa y colaboradores utilizaron el ácido 3-mercaptopropiónico para modular el tamaño de NP de oro, entre 2.3 y 20 nm, las cuáles poseían la cualidad de ser estables en agua [108]. Existen numerosos trabajos en los que se han utilizado diversos compuestos tiolados, no polares y polares, como tioles aromáticos y biomoléculas como el glutatión [109, 110] para modular el tamaño y alcanzar la dispersión de clústeres metálicos libres. Lo que resulta claro de todos estos trabajos es que la proporción

tiol: AuCl₄ usada en la síntesis, es el factor que controla el tamaño de las NP [111], un fenómeno que también ocurre en los clústeres metálicos reducidos sobre los nanotubos de VP6, como se demostró en este trabajo, y que no había sido reportado previamente.

Gran cantidad de trabajos han tenido como objetivo el control del tamaño de partícula para lograr obtener NP monodispersas con diámetros menores a 2 nm, ya que su tamaño induce propiedades novedosas, como una incrementada fotoluminiscencia y magnetismo intrínseco, así como propiedades catalíticas [112, 113]. La metodología aplicada en nuestro estudio logró la formación de NP de diversos diámetros, incluyendo clústeres con diámetros menores a 2 nm, demostrando que es posible su síntesis y además, que es posible su ordenamiento sobre el nanotubo. Esta última característica ofrece un avance en el desarrollo de nanocomplejos metálicos pues se demostró que los nanotubos de VP6 permiten la estabilización de los iones metálicos y la formación de NP sobre su superficie, incluso en presencia del tiol, de lo cual no hemos encontrado antecedentes. El ordenamiento de NP sobre un soporte, es un objetivo importante que se busca en el campo, ya que su organización incrementa la capacidad catalítica [114] y el acoplamiento electrónico de las partículas [99].

De acuerdo con varios autores, la estructura de las NP de oro estabilizadas con ligandos, consiste de un centro metálico recubierto por una capa tiolada la cual está formada por oligómeros oro-tiol (RS-(Au-SR)) [102] (**Figura 22**). Durante la formación de las NP, la superficie altamente curvada de los pequeños clústeres iniciales facilita la unión de iones metálicos, sin embargo cuando alcanzan cierto tamaño, la curvatura se reduce, y la capa de ligandos bloquea la unión de nuevos iones, impidiendo que las NP continúen creciendo [115]. Por lo tanto, es de esperarse que tioles de mayor volumen ejerzan efectos estéricos mayores reduciendo el tamaño de las NP sintetizadas (**Figura 22**).

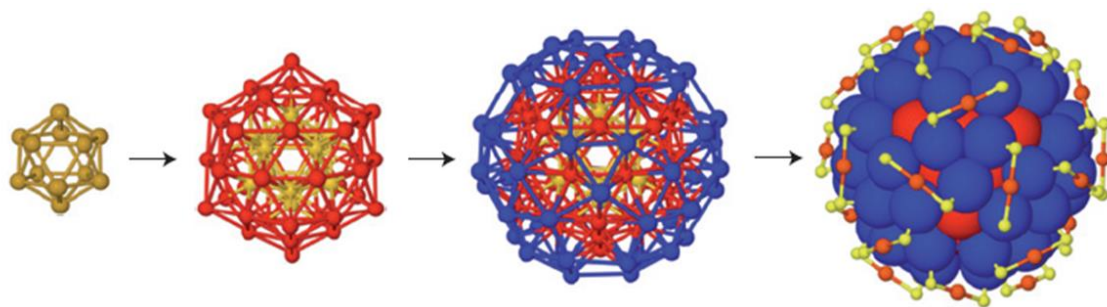


Figura 22. Formación de nanopartículas en presencia de tioles. Se muestra el ordenamiento de los átomos de Au en los clústeres. En dorado, rojo y azul se representan las diferentes capas de átomos. En la última capa se muestran los oligómeros SR-Au-SR en color amarillo y rojo. Modificados de [102].

Para probar esta hipótesis cambiamos el MPS por un ligando de mayor volumen, el 5-mercaptopentyl β -D-glucopiranosido (GlcC₅SH) (donado amablemente por M. Marradi, CIC biomaGUNE, España), el cual consiste de un tiol unido a una cadena de cinco carbonos en cuyo extremo está unida una glucosa (**Figura 19**).

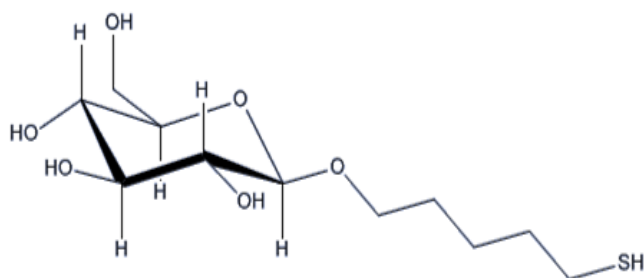


Figura 23. Estructura molecular del GlcC₅SH.
Figura por M. Marradi.

La síntesis se realizó usando la misma metodología que con el MPS, en la **Figura 24** se muestran las micrografías electrónicas de los complejos sintetizados.

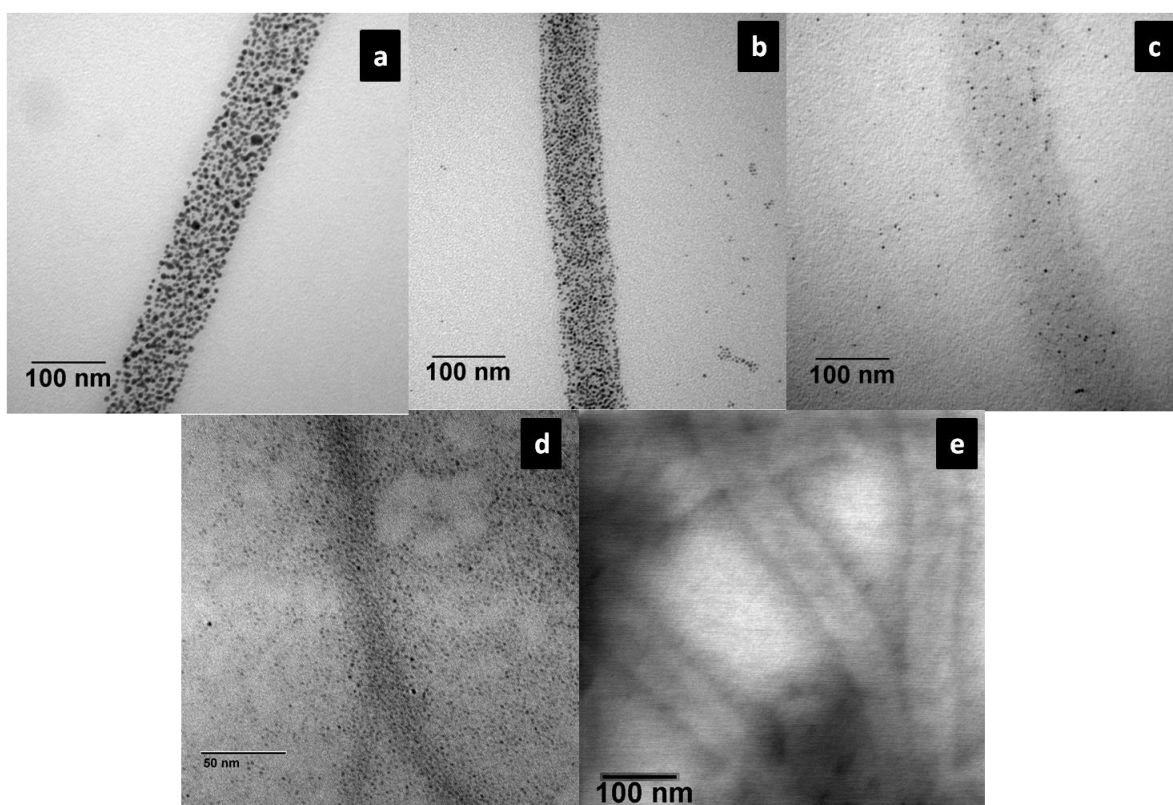


Figura 24. Micrografías nanocomplejos VP6-Au y Glc5SH. Diferentes relaciones mol/mol. a) Sin tiol; b) Tiol/Au 0.25; c) Tiol/Au 0.5; d) Tiol/Au 1; e) Tiol/Au 2. Ninguna de las muestras fue teñida para su observación microscópica.

A través de las micrografías electrónicas se midió el diámetro de las nanopartículas, los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación de tamaños de nanopartícula entre los diferentes complejos VP6-Au-Glc5SH.

	VP6-Au	VP6-Au-MPS 0.25	VP6-Au-MPS 0.5	VP6-AuMPS 1	VP6-Au-MPS 2
Diámetro promedio (nm)	5.0 ± 2.2	2.9 ± 1.15	1.9 ± 0.37	< 2	< 2

Los diámetros de las NP de los nanocomplejos a relaciones tiol/Au (mol/mol) de 1 y 2 se reportan como "< 2" por la dificultad técnica de medir el tamaño de partículas tan pequeñas.

Observamos que desde la relación tiol/Au 0.25 el tamaño de partícula promedio se redujo considerablemente con respecto al control y que a la relación 1 las NP sintetizadas tienen diámetros menores a 2 nm, lo que con el tiol MPS ocurrió hasta la

relación de 2. En la **Figura 25** se hace una comparación entre tioles y el tamaño de partícula.

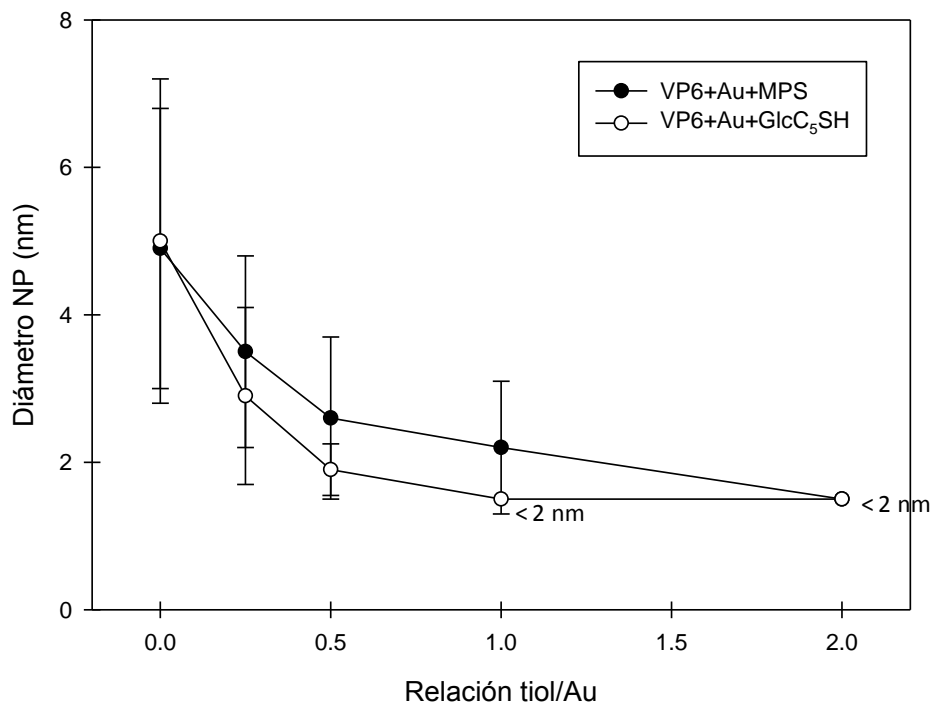


Figura 25. Efecto del volumen del tiol en el diámetro de las NP. Se muestran los promedios de las mediciones y la desviación estándar de al menos 100 NP. El análisis estadístico Kruskal-Wallis, aplicado a cada grupo de nanocomplejos, demostró que hay diferencia significativa en el tamaño de NP entre los nanocomplejos a diferentes relaciones molares tiol/Au ($P \leq 0.001$).

Pese a que las desviaciones estándar de las mediciones son grandes, los promedios muestran que comparado con el MPS, la presencia del GlcC₅SH limitó más el crecimiento de las NP, habiendo una diferencia significativa ($P \leq 0.001$, test U de Mann-Whitney) en los diámetros de las NP. Se realizaron análisis elementales (EDS) sobre los nanocomplejos para conocer si las diferencias en el tamaño de partícula estaban asociadas con un cambio en la composición de las NP. Ejemplos de los espectros obtenidos se muestran en la **Figura 26**.

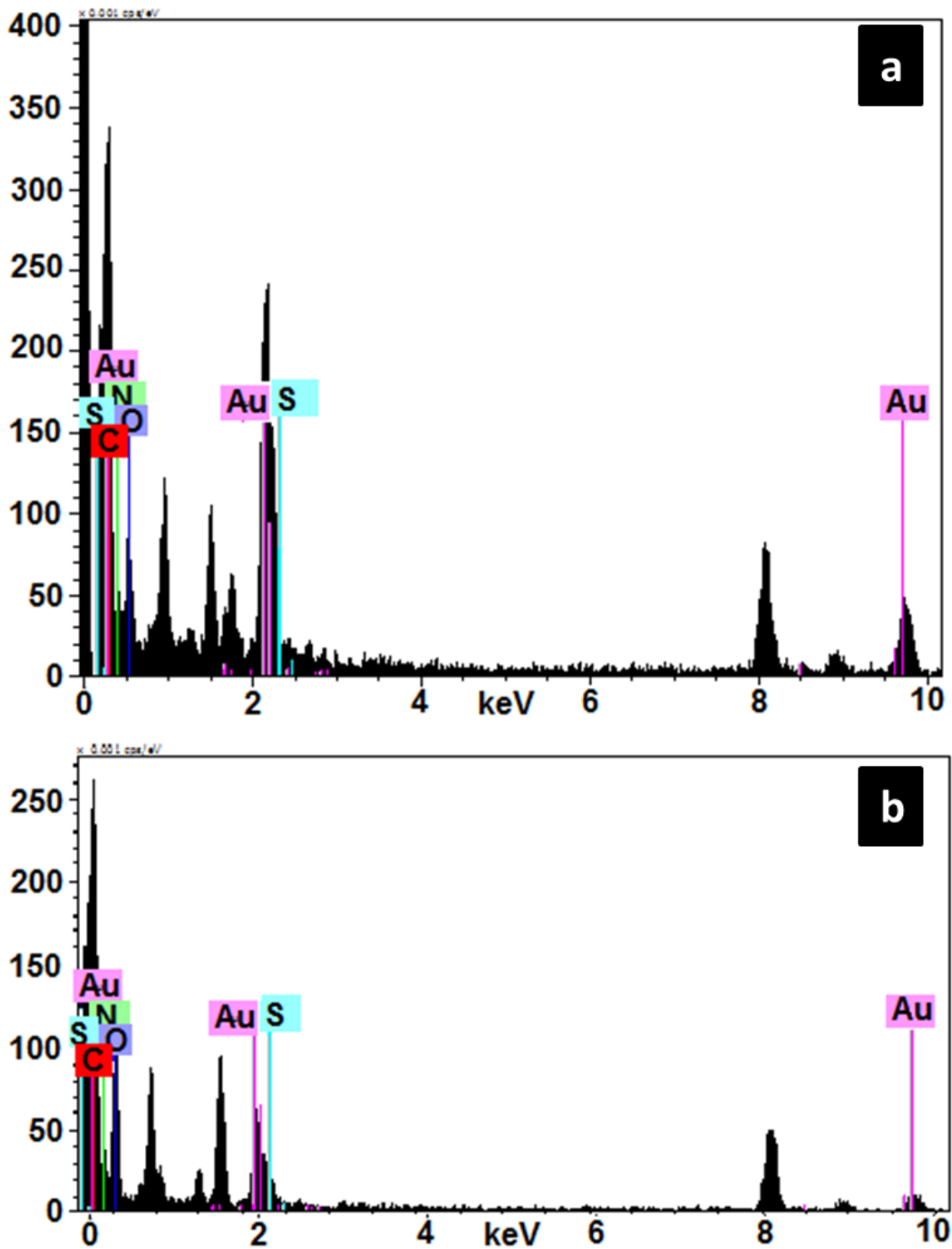


Figura 26. Ejemplos de los espectros elementales de los nanocomplejos. a) VP6-Au sin recubrimiento. b) VP6-Au-MPS 1. Se observa la disminución en la señal de los elementos Au y S al aumentar la relación molar tiol/Au.

Los espectros de los nanocomplejos mostraron una disminución en la señal de oro al incrementar la cantidad de tiol en la mezcla. Para hacer una comparación semi-cuantitativa de este fenómeno, se graficaron los porcentajes de los átomos presentes

en cada muestra, considerando como el 100% la suma de los átomos de Au y S. Las gráficas generadas se muestran en la **Figura 27**.

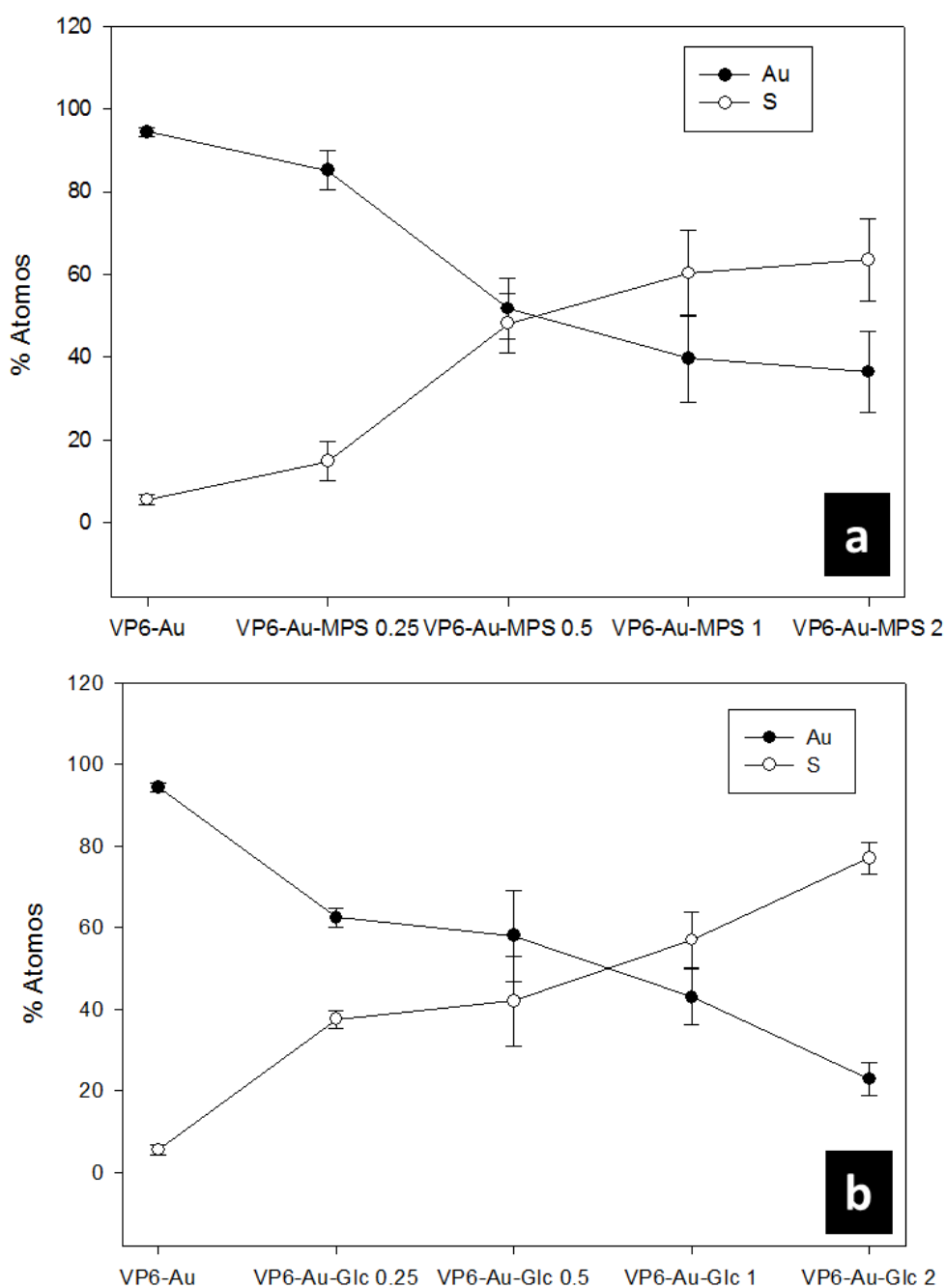


Figura 27. Porcentaje de los átomos de Au y S presentes en los diferentes nanocomplejos.

a) nanocomplejos VP6-Au-MPS; b) nanocomplejos VP6-Au-GlcC5SH. Los nanocomplejos sin tiol se denominan VP6-Au, mientras que las diferentes relaciones molares tiol/ Au se denotan como 0.25, 0.5, 1 y 2. Los datos mostrados son el promedio de al menos tres mediciones independientes y su desviación estándar.

En las gráficas (**Figura 27**) se observa que con el MPS a relación tiol/Au de 0.25, el porcentaje de átomos de oro disminuye en un 20%, mientras que la presencia del GlcC₅SH, a la misma relación, disminuye hasta un 40 % los átomos de oro, lo que concuerda con la hipótesis de que tioles voluminosos provocan un menor crecimiento del clúster metálico durante la síntesis. Además, se observa que mientras que con el MPS el porcentaje de átomos de oro y azufre se mantienen casi constantes a relaciones de 0.5, 1 y 2, con el GlcC₅SH la disminución de átomos de oro sigue un patrón lineal. Estos análisis nos sugieren que es posible que el GlcC₅SH afecte fuertemente el crecimiento de los clústeres y que a la relación molar de tiol/Au de 2, haya sobre VP6 mucho menos cantidad de oro que lo que existe a la misma relación en los nanocomplejos con MPS.

Mediante diferentes técnicas, se ha determinado con gran precisión las composiciones elementales de NP altamente estables cuyos tamaños varían entre 1 y 3 nm, obteniendo relaciones Au/tiol a las que se ha denominado "números mágicos" o "compuestos mágicos", con la fórmula Au_n(SR)_m, donde n y m es el número de átomos de oro y ligandos, respectivamente, y que incluyen complejos como Au₂₀(SR)₁₆, Au₃₈(SR)₂₄, Au₆₈(SR)₃₄, etc, que son químicamente estables. [102]. Cabría determinar si nuestros nanocomplejos caen en alguno de estos "compuestos mágicos", sin embargo, dicho análisis no sería trivial pues se debería considerar que una parte de la superficie de las NP no está recubierta con la capa de tioles ya que está embebida en el soporte proteico, por lo que la cantidad de tioles en la superficie es menor.

Nuestros resultados de la disminución del tamaño de partícula en relación con el volumen del tiol, concuerdan con el estudio reportado por Krommenhoek [115] que reportó que los tioles más voluminosos ejercen un efecto estérico mayor durante la formación de las NP, produciendo centros metálicos de menores tamaños. De acuerdo con estos autores los ligandos voluminosos evitan el crecimiento de las NP al impedir que nuevos iones Au y ligandos pasen a través de la capa de tioles y se unan a los clústeres de oro, lo cual se ilustra en la **Figura 28**.

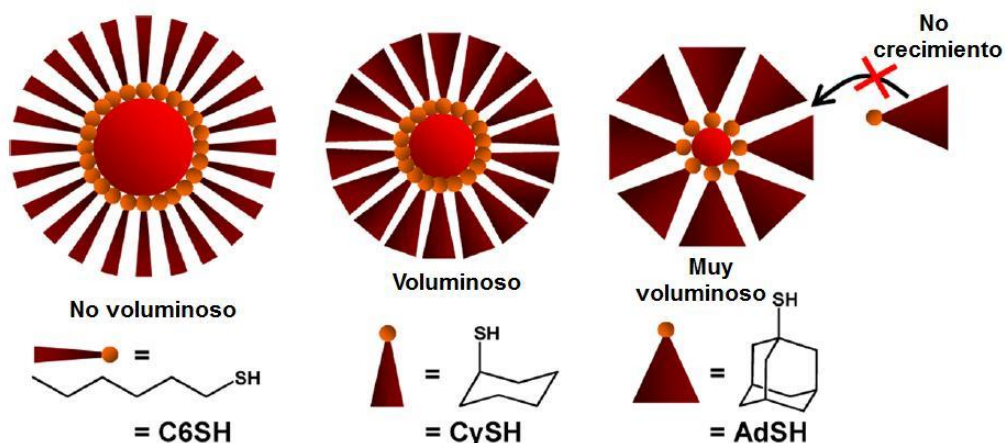


Figura 28. Efecto estérico de tioles voluminosos sobre el tamaño de las NP. Modificado de [115].

El tamaño de las NP puede ser modulado mediante las condiciones de reacción: concentración de precursores, tipo y concentración del agente reductor, la velocidad de adición y mezclado y la temperatura [107]. Dado que las condiciones de reacción para la síntesis de nuestros nanocomplejos fueron las mismas, los efectos observados sobre el diámetro de las NP fueron debidos exclusivamente a la relación molar tiol/Au. Además de los autores citados, varios estudios de otros grupos de investigación reportaron modificaciones en el tamaño de los clústeres debidas al tamaño de los tioles [116-119].

El presente trabajo muestra que los fenómenos descritos antes para NP libres, también son aplicables a la modulación del tamaño de partículas reducidas sobre un bio-andamio como el usado en este trabajo, los nanotubos de la proteína VP6 de rotavirus.

Las diferencias descritas en el tamaño de las NP tuvieron efectos importantes sobre las propiedades de los nanocomplejos, dichos efectos serán descritos a continuación.

5.2.2. Modulación de propiedades ópticas

Lo que hoy conocemos como NP de oro u oro coloidal, se ha explotado empíricamente desde la antigüedad para colorear vidrio, porcelana y cerámica [120], debido a su atractiva coloración rojo rubí. A mediados de los 1800's Faraday descubrió que era posible sintetizar diferentes soluciones coloidales de oro que exhibían diferentes colores, desde el rojo rubí hasta el violeta amatista [121]. Ahora sabemos que esas coloraciones intensas son debidas a una fuerte absorción de luz en la zona UV-visible, la cual es producida por la interacción de las NP con la luz incidente [122]. Esta interacción produce la resonancia de los plasmones de superficie (SPR), es decir la excitación y oscilación colectiva de los electrones libres en la superficie de las NP, generando la mencionada banda de absorción de luz, la cual depende de la composición, tamaño, geometría, la constante dieléctrica del solvente y la distancia inter-partícula [120, 122, 123]. En las últimas décadas las propiedades ópticas de las NP de oro han sido sujeto de múltiples estudios y aplicaciones tecnológicas, explotando la SPR en electrónicos, sensores ópticos, biomedicina, almacenamiento de datos y generación de luz [123].

Para determinar si el recubrimiento con tioles afectó la banda de resonancia de los plasmones, se realizaron barridos de absorción en el espectro UV-visible. Los resultados se muestran en la **Figura 29**.

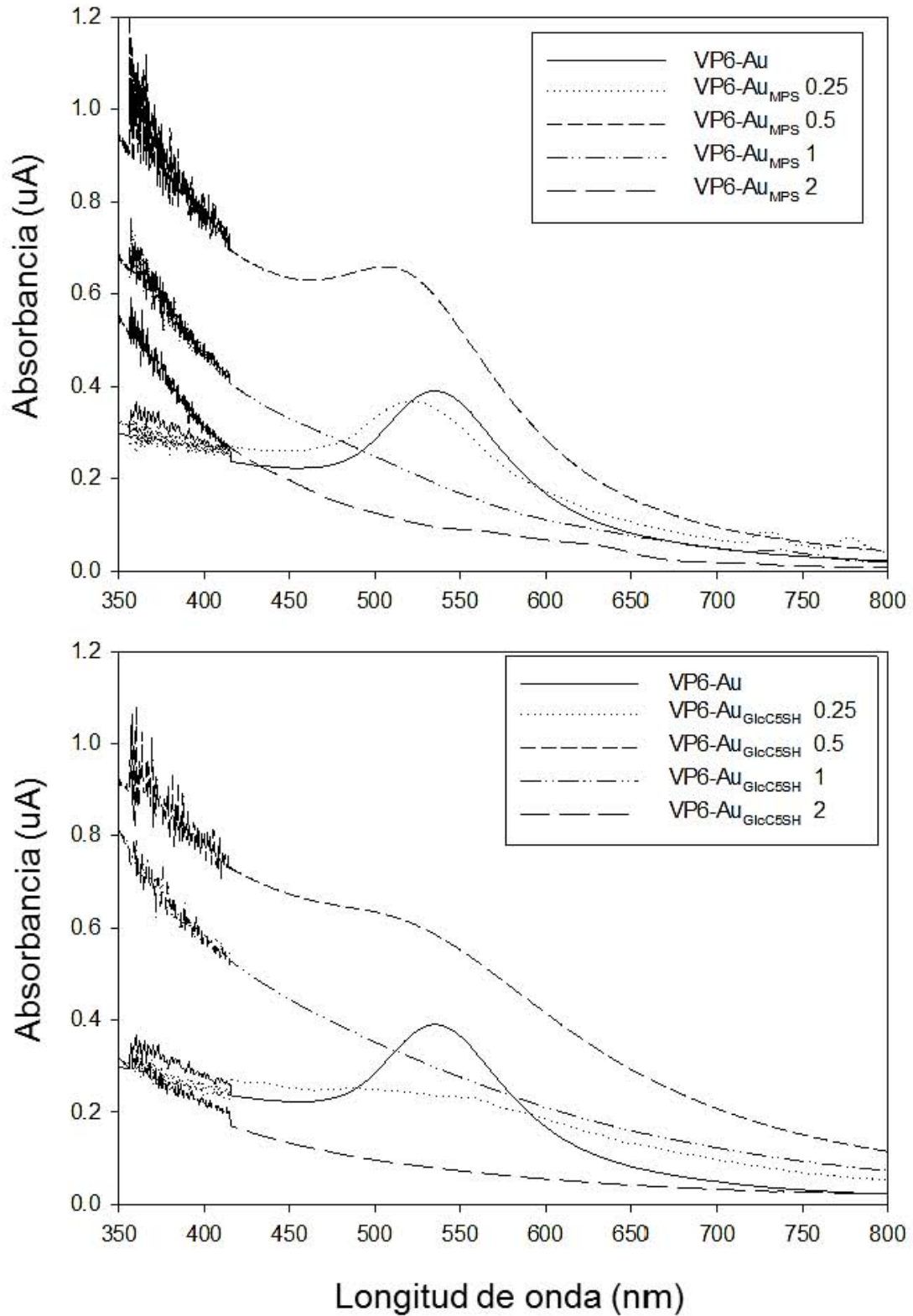


Figura 29. Efecto de la capa de tioles sobre la resonancia de los plasmones de superficie.

Los nanocomplejos sin tiol se denominan VP6-Au, mientras que las diferentes relaciones molares tiol/ Au se denotan como 0.25, 0.5, 1 y 2.

Los nanocomplejos VP6-Au sin tioles mostraron bandas de absorción máxima centradas a longitudes de onda de 530 nm, que son las características de estos arreglos VP6-NP de oro [84] y otras partículas esféricas [108]. Para los complejos bifuncionalizados con MPS a relaciones de 0.25 y 0.5 se observó un corrimiento en las bandas de SPR hacia 523 y 512 nm, respectivamente. Estos cambios en las longitudes de onda de absorción máxima se pueden explicar por la disminución del tamaño de las NP [120] o por la presencia de los tioles. Se han reportado bandas de SPR a 511, 512 y 520 nm para partículas de 4.5, 3.8 y hasta 2.2 nm recubiertas con tioles [124, 125]. Al aumentar la relación tiol/Au la resonancia de los plasmones se perdió por completo. En comparación, los nanocomplejos recubiertos con GlcC₅SH a relación molar tiol/Au de 0.25, presentaron una banda de absorción muy débil entre los 510 y 520 nm, similar a lo encontrado por [107], y perdieron la banda de absorción desde la relación 0.5. Este fenómeno puede deberse a dos factores: a que en NP menores a 2 nm predominan los efectos cuánticos y las bandas de SPR no son observables [120]; o bien a que el enlace covalente del tiol con la NP de oro (S-Au) sea tan fuerte que impida la movilidad de los electrones de la superficie y no se produzca la resonancia de los plasmones [108].

Nuestros hallazgos son comparables con lo reportado por los grupos de Murray, Whetten y Jose-Yacamán, que demostraron que la banda de SPR disminuye dramáticamente con la disminución del tamaño del clúster metálico, llegando a ser indetectable para los clústeres más pequeños (< 2 nm), independientemente del tipo de tiol usado como estabilizante [107, 118, 126, 127].

5.2.3. Modulación de estabilidad coloidal

Una de las motivaciones principales de este estudio, fue obtener nanocomplejos VP6-Au dispersos y estables en medio acuoso. En la **Figura 19** se mostró que al incrementar la relación tiol/Au se perdió tanto la coloración roja de los nanocomplejos, como los agregados y su concomitante sedimentación. Para hacer un estudio cuantitativo de la estabilidad coloidal, se midió el potencial Z (ζ) de las diferentes muestras.

La carga de las partículas presentes en una suspensión es apantallada por iones de carga opuesta que rodean a las partículas. Estos contra-iones se distribuyen en dos capas eléctricas: la capa interna, que también se llama capa de Stern, y la capa difusa [128, 129]. En la superficie de la partícula, donde la concentración de contra-iones es muy alta, el potencial eléctrico es máximo y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa, donde la cantidad de contra-iones es mínima. En la frontera entre la capa interna y la difusa existe una zona, llamada "slipping plane", donde los iones y las partículas forman una unidad estable, de tal manera que cuando la partícula se mueve, esos iones viajan con ella. El potencial electrocinético o potencial eléctrico en esta zona se denomina potencial Z (ζ). La magnitud del potencial Z es un indicativo de la estabilidad coloidal del sistema [128-130]. Si el potencial Z de las partículas está alejado de 0 mV, positiva o negativamente, significa que tenderán a repelerse y serán estables en solución. Se considera que una solución es estable cuando su potencial Z es menor que -30 mV o mayor que +30 mV.

Usando el equipo Zetasizer Nano, se analizó el potencial Z de los diferentes nanocomplejos. Los resultados se muestran en la **Figura 30**.

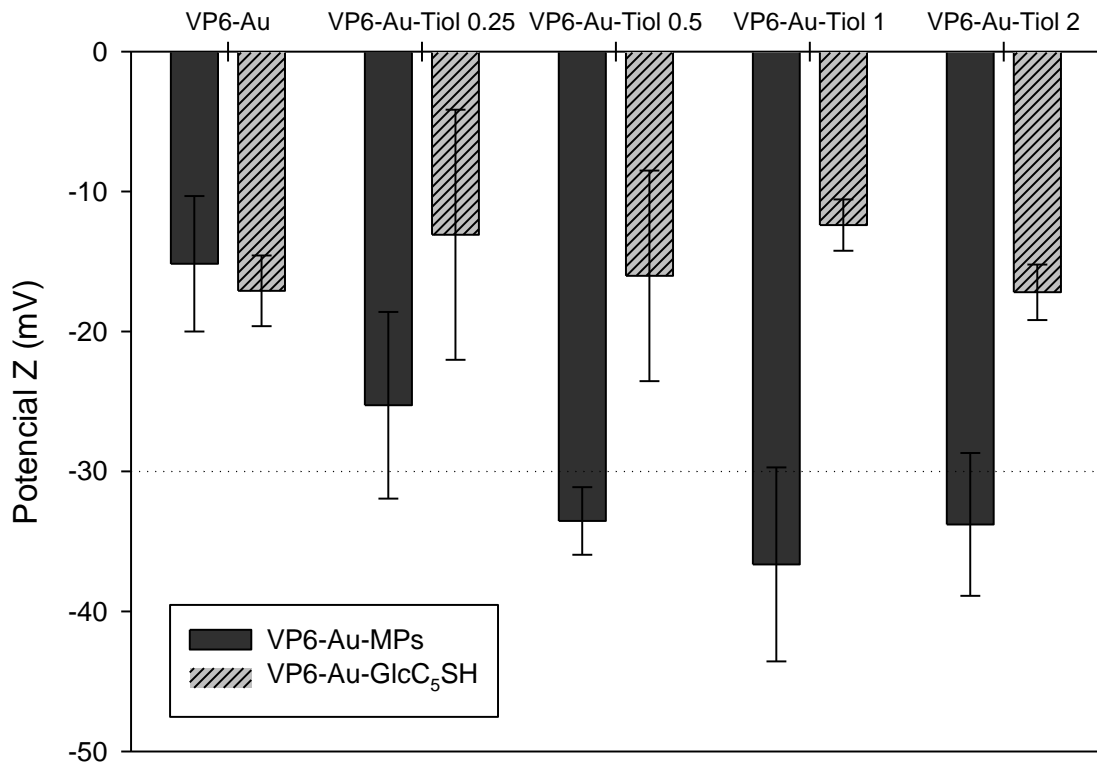


Figura 30. Estabilidad coloidal de nanocomplejos VP6-Au.

Los nanocomplejos sin tiol se denominan VP6-Au, mientras que las diferentes relaciones molares tiol/ Au se denotan como 0.25, 0.5, 1 y 2. La línea horizontal representa el punto donde se alcanza la estabilidad coloidal.

Observamos que los complejos VP6-Au sin recubrimiento tienen potenciales Z promedio cercanos a los -14 mV, y que para los complejos recubiertos con MPS, dicho valor se hizo más negativo conforme incrementó la cantidad de tiol. Los nanocomplejos con MPS a relación de 0.5 alcanzaron la estabilidad coloidal, teniendo potenciales menores que -30 mV y esta estabilidad se mantuvo para los complejos a relaciones 1 y 2. Esto se explica por la franca carga negativa del grupo $-\text{SO}_3^-$ del MPS y concuerda con lo reportado por otro grupo de investigación [131].

En caso contrario, los complejos con GlcC₅SH no mostraron un incremento en el potencial Z, ya que el compuesto tiolado no ofrece una carga neta al complejo. Sin embargo, la naturaleza altamente polar de la glucosa hace que los compuestos se encuentren dispersos en la solución, como se observa en la **Figura 31**.

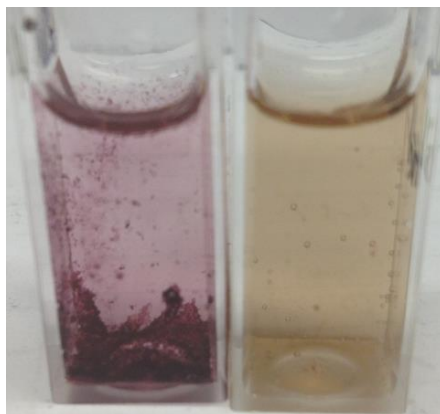


Figura 31. Coloración y estabilidad coloidal de los nanocomplejos VP6-Au-GlcC₅SH. A la izquierda se muestra los complejos VP6-Au sin modificación y a la derecha se observan los nanocomplejos a relación molar tiol/Au de 1.

Otros compuestos polares, como el glutatión o el polietilenglicol, han sido ampliamente usados para la síntesis de NP estables en agua [110, 132]. El grupo de Belcher utilizó bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para producir NW metálicos con diámetros uniformes y agregación reducida [133]. El grupo de Penadés ha usado el GlcC₅SH y otras moléculas con terminaciones de carbohidratos para sintetizar glico-nanopartículas, con centros metálicos de 2 nm, que han demostrado ser solubles en agua y biocompatibles [134].

Hasta aquí se ha demostrado que la bifuncionalización de los nanotubos de VP6 con NP de oro y recubrimientos tiolados permite modular las propiedades fisicoquímicas de los complejos. La presencia de un grupo funcional como el SO₃⁻ del MPS o la glucosa del GlcC₅SH, o la posibilidad de intercambiar los ligandos [135], permitirían en un futuro modificar químicamente dichas terminaciones para agregar péptidos, proteínas, anticuerpos, lectinas, fluoróforos, etc., que permitan dar aplicaciones novedosas a los nanocomplejos de VP6. Por otra parte, la formación de nanocomplejos de oro sin agregados que conservan sus propiedades ópticas permitiría su aplicación en la fabricación de sensores o potenciadores de señal en, por ejemplo, espectroscopia RAMAN (SERS).

Dado que una de las características que ampliaría más el espectro de aplicaciones de los nanocomplejos es la biocompatibilidad, se realizaron ensayos para determinar si su presencia en los cultivo produce toxicidad en dos líneas celulares humanas. A continuación se muestran los resultados.

5.2.4. Modulación de la citotoxicidad

Como ya se ha mostrado en trabajos previos de nuestro grupo y en el presente trabajo, los nanotubos de VP6 decorados con NP de oro tienen propiedades de interés práctico, como los son absorción de luz y conducción eléctrica, lo cual podría ser empleado para el diseño de biosensores o materiales con aplicaciones biomédicas. Con este objetivo y para conocer los riesgos de su manejo, es importante determinar si estos nanocomplejos híbridos son inocuos o si pueden tener alguna consecuencia adversa sobre los organismos a los que se expongan. Existen reportes que indican que NP de oro desnudas de 2 a 30 nm de diámetro pueden mermar el crecimiento *in vitro* de macrófagos J774 y producir nefrotoxicidad en ratones *desnudos (nu/nu)* [37, 136], sin embargo se desconoce si el arreglo tridimensional de las NP sobre VP6 y sus recubrimientos podrían tener efectos similares.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron sobre dos líneas modelo: A-549, originaria de carcinoma de pulmón humano y THP-1 de leucemia monocítica, las que fueron seleccionadas por representar a sus tejidos o sistemas de origen y que son usadas ampliamente como modelos en análisis de citotoxicidad. Las células se expusieron a diferentes concentraciones de nanocomplejos de oro sin modificaciones superficiales o recubiertas con los tioles. Se analizó la viabilidad a las 24 y 48 h mediante el ensayo colorimétrico con MTT. Los datos de viabilidad se reportan normalizados con respecto al control al tiempo correspondiente, el cual consistió de células con las mismas condiciones que las células problema, pero sin ser expuestas a los nanocomplejos (**Figura 32**).

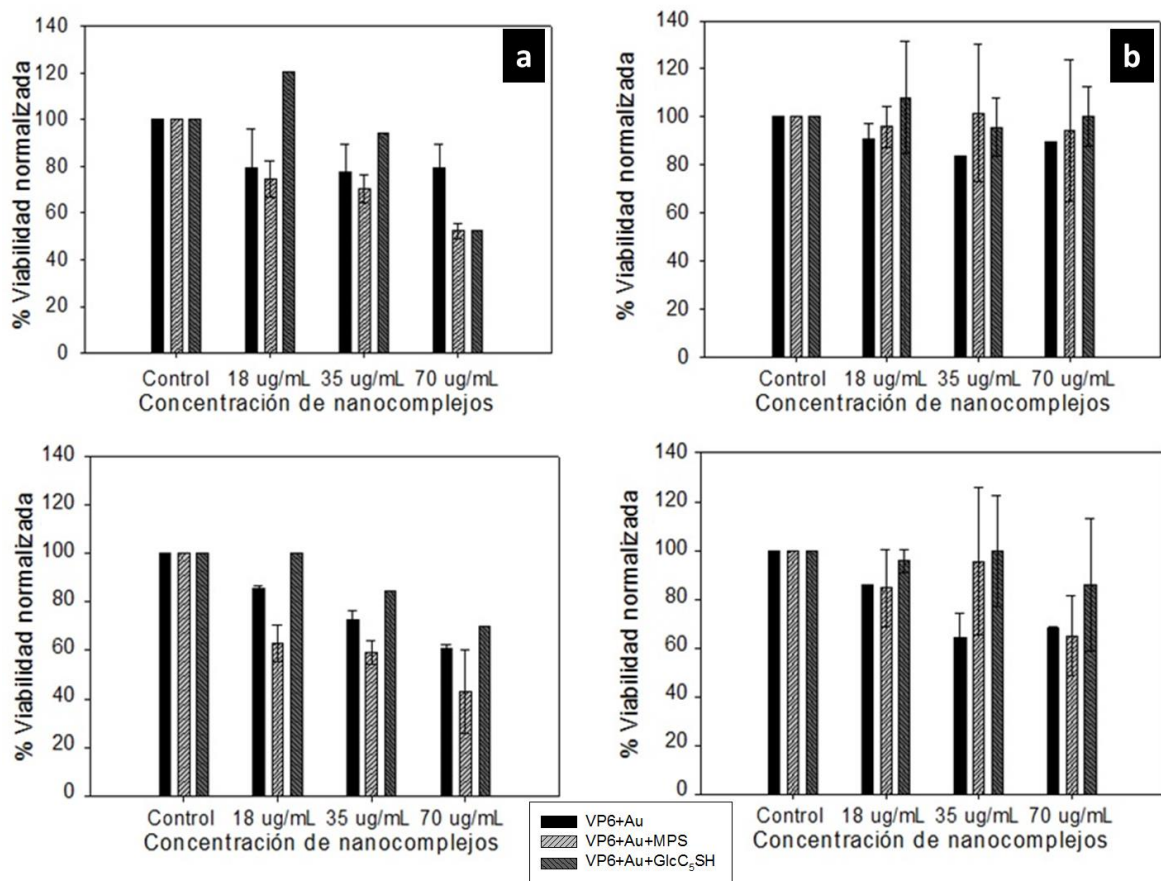


Figura 32. Citotoxicidad normalizada de los diferentes nanocomplejos VP6-Au.

a) Células A-549: superior 24 h e inferior 48 h.

b) Células THP-1: superior 24 h e inferior 48 h.

Los controles a cada tiempo fueron células a las mismas condiciones que las problema, sin nanocomplejos.

Las gráficas muestran que los efectos citotóxicos de los nanocomplejos fueron diferentes en cada línea celular y además, fueron dependientes de la concentración de los nanotubos funcionalizados. Como un control extra, se analizó la citotoxicidad *in vitro* de los nanotubos desnudos de VP6, a concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sobre las células A-549, manteniéndose una viabilidad mayor al 90% en todos los tiempos. Cabe mencionar que los efectos de la toxicidad celular de los nanotubos desnudos de VP6 ya fue estudiada en nuestro grupo para diferentes líneas celulares, mostrando que en todos los casos la viabilidad se mantuvo por arriba del 80%, incluso a concentraciones de tubos de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [88] por lo que los resultados obtenidos en este trabajo con los nanocomplejos de VP6 no fueron ejercidos por el andamio proteico.

En el caso de las células A-549 (**Figura 32**, panel izquierdo), desde las 24 h de incubación, se observaron mermas en su viabilidad debidas a la exposición con los diferentes nanocomplejos, siendo mayor el efecto a las 48 h con los nanocomplejos VP6-Au-MPS a 70 $\mu\text{g/mL}$, que redujeron la viabilidad más del 50%, mientras que los complejos VP6-Au-GlcC₅SH fueron los menos tóxicos para estas células a concentraciones hasta 35 $\mu\text{g/mL}$.

Por el contrario, la viabilidad de los macrófagos (**Figura 32**, panel derecho) no se vio afectada durante las primeras 24 h por la exposición a los nanocomplejos, y disminuyó un 40% con las concentraciones más altas de VP6-Au y VP6-Au-MPS a las 48 h.

Observamos, que a concentraciones de 35 y 70 $\mu\text{g/mL}$ y después de 48 h de incubación, los ensambles VP6-Au fueron citotóxicos para ambas líneas, lo que concuerda con lo reportado para NP libres [136], indicando que los efectos tóxicos no se evitan por el arreglo tridimensional de las NP sobre el andamio proteico.

En la literatura existen varios estudios que muestran que el recubrimiento de las NP puede modular la toxicidad celular de los clústeres [37, 137, 138], lo que también observamos en este trabajo, siendo el MPS el recubrimiento más citotóxico, mientras que el GlcC₅SH ayudó a reducir la toxicidad de los nanotubos funcionalizados, incrementando su biocompatibilidad, tal como lo reporta Penadés y colaboradores [134]. Otros trabajos han demostrado que el recubrimiento con diferentes biomoléculas como aminoácidos o terminaciones de carbohidratos muestran una alta biocompatibilidad [139, 140].

En algunos casos, las barras de error de la **Figura 32** son muy altas e indican una alta variabilidad de los resultados, por lo que se sugiere continuar este estudio implementando nuevas técnicas de purificación y concentración de los nanocomplejos, además de determinar si los efectos observados fueron debidos a la internalización de los nanocomplejos en las células.

Nuestros resultados indican que podemos modificar las propiedades de los nanocomplejos VP6-Au, incluyendo su citotoxicidad, al modificar su superficie con diferentes ligandos. Las características especiales de nuestros nanocomplejos podrían

ser explotadas para construir nano-electrónicos, bio-sensores e incluso terapéuticos. En este último sentido, durante los últimos años se ha estudiado el empleo de NP de Au conjugadas con marcadores específicos de células cancerígenas para lograr su identificación *in vivo*, así como para su internalización, usándolas como centros de calor en terapia fototérmica (Jain, 2007).

5.3. Funcionalización interna de nanotubos de VP6

Desde el punto de vista nanotecnológico, una de las ventajas de los nanotubos de VP6 sobre otros bio-andamios, es que poseen dos superficies, interna y externa, que pueden ser empleadas para el ensamblaje o síntesis de diferentes tipos de moléculas, cuyas propiedades pueden ser explotadas en aplicaciones novedosas. Como ya se ha mencionado, nuestro grupo de investigación demostró que los nanotubos de VP6 tienen la capacidad de unir, estabilizar y permitir la reducción de nanopartículas metálicas en su superficie externa [141], pero no se habían realizado estudios para conocer si la superficie interna de los nanotubos permitiría su funcionalización. El mayor reto del presente proyecto fue lograr la funcionalización interna de VP6, desarrollando metodologías que explotaran las características intrínsecas de los aminoácidos localizados en la parte baja del trímero, la que forma la pared interna del tubo, o bien haciendo uso de la capacidad que posee VP6 de auto-ensamblarse en diferentes estructuras de acuerdo con el pH del medio [11].

5.3.1. Formación de nanorrodillos (NR) y nanoalambres (NW) de plata

Para que la reducción de metales y formación de nanoestructuras dentro de los nanotubos de VP6 se lleve a cabo es necesario que dos condiciones se cumplan:

1. Que los precursores metálicos entren al canal de los nanotubos y,
2. Que los iones metálicos se estabilicen en residuos de la pared interna permitiendo la formación de NP después de la reducción con un donador de electrones.

Como ya se mencionó en los antecedentes, se conocía que en la pared interna de los nanotubos de VP6, bajo ciertas condiciones de pH, se generaba potencial

electrostático negativo [76] y se formuló la hipótesis de que mediante dicho potencial era posible atraer electrostáticamente a los cationes metálicos. Las pruebas preliminares y los propios antecedentes de nuestro grupo [84], mostraron que estas fuerzas de atracción no eran suficientes para dirigir los precursores metálicos al interior de los nanotubos. Por lo tanto, fue necesario aplicar energía para forzar la entrada de los precursores aplicando ultrasonificación, la cual es una estrategia usada ampliamente para rellenar nanotubos de diferentes composiciones y grados de hidrofobicidad con solventes y moléculas de diversas clases [142]. Esta estrategia fue probada con tres metales modelo: plata, usando AgNO_3 como precursor; oro, usando HAuCl_4 y paladio, usando K_2PdCl_4 . Como agentes reductores se usaron borohidruro de sodio (NaBH_4), que es un reductor fuerte, y ácido cítrico, el cual es un agente reductor débil.

La metodología descrita por Plascencia-Villa [13, 84] fue modificada adicionando los precursores a la suspensión de nanotubos en tres ciclos de sonicación [63]. Se dejó incubar la mezcla durante tres horas para permitir la interacción de los iones con los residuos en la cara interna de la proteína y posteriormente, se agregó el agente reductor mediante otros tres ciclos de sonicación. Se permitió que la reacción se llevara a cabo por 12 h a temperatura ambiente y en oscuridad.

El empleo de AgNO_3 como precursor metálico y ácido cítrico como donador de electrones produjo la funcionalización interna de los nanotubos de VP6, logrando que los nanotubos proteicos estabilizaran y moldearan la formación de NP, NR y NW, como se muestra en la **Figura 33** (definiendo como NR aquellas estructuras cuya relación longitud/diámetro, el llamado "aspect ratio", es menor a 20 o 25, o igual o mayor para los NW [143, 144]).

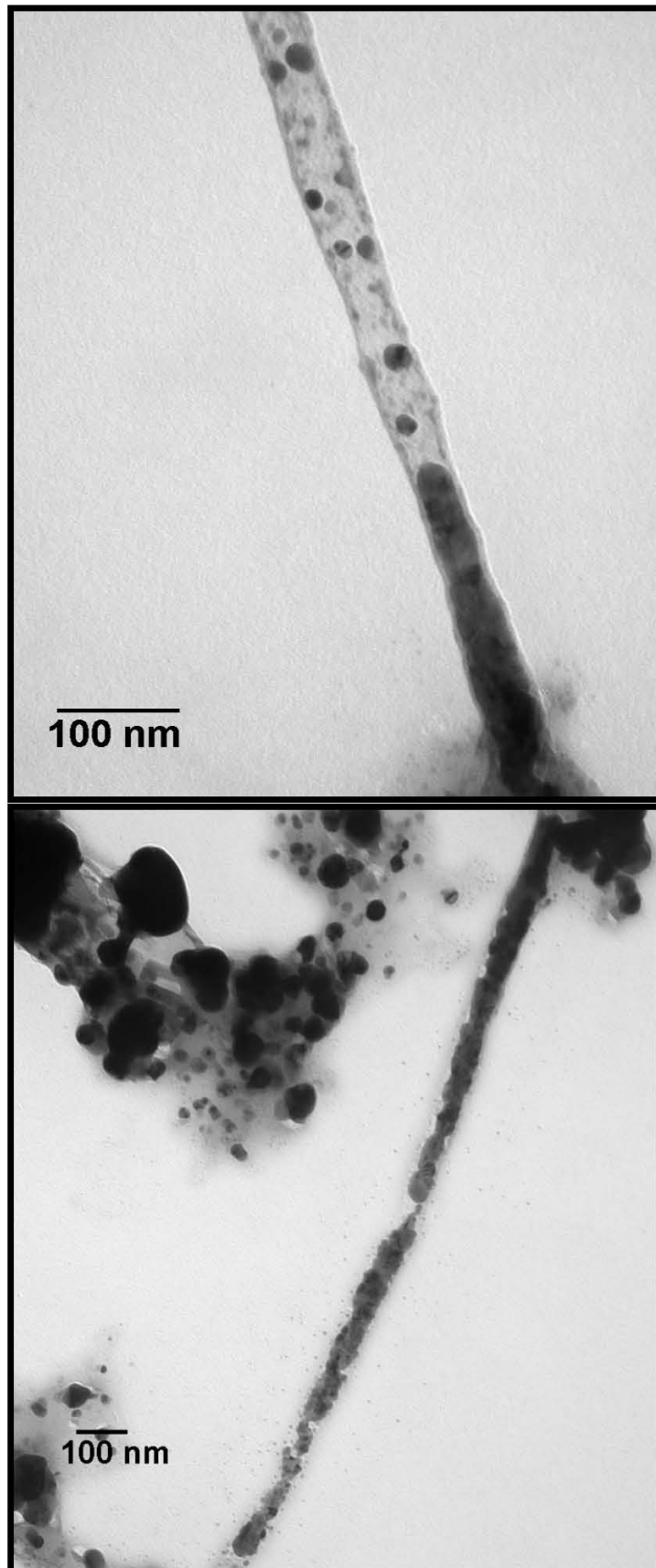


Figura 33. Formación de NP, NR y NW de plata dentro de los nanotubos de VP6. En la imagen superior se observa el crecimiento de NP desde la pared interna del nanotubo proteico, así como la formación de NR. En la imagen inferior se observa un NW con una longitud de 1.5 μm .

Las longitudes de los alambres obtenidos fueron de 0.3 hasta 1.5 μm y diámetros promedio de alrededor de 42 nm. Estas longitudes son mayores, hasta casi una 1 μm más largas, que las reportadas para nanoalambres formados por otros bio-andamios virales [60, 63, 67], ya que en general, están sujetos al tamaño del virus original. Para corroborar la presencia de las nanoestructuras en el interior de VP6, se midieron los diámetros, externo e interno, así como el grosor de la pared de los tubos funcionalizados, y se encontró que concuerdan con las dimensiones esperadas para los tubos de VP6 [11] (**Figura 34**).

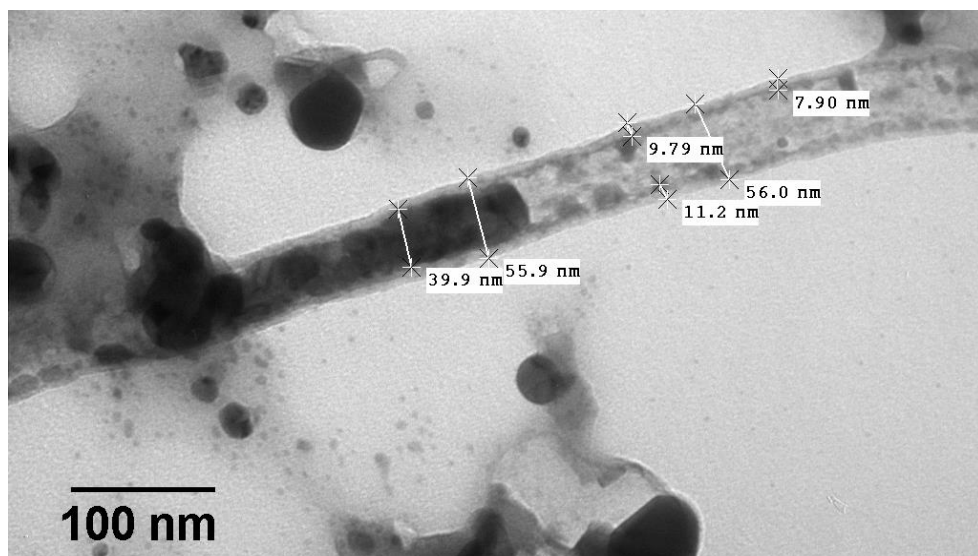


Figura 34. Dimensiones de los nanocomplejos VP6 y las nanoestructuras de Ag formadas en su interior.

Los NW metálicos son de gran interés por la expectativa de emplearlos como conectores, bloques de construcción y elementos funcionales en futuros aparatos electrónicos, optoelectrónicos, electroquímicos y electromecánicos [34, 145]. Para poder utilizar los NW en aplicaciones novedosas se requiere primeramente, que sus métodos de fabricación aseguren el control de su morfología y composición, lo cual no siempre es alcanzado por métodos litográficos, además de que el desarrollo de esos métodos "top-down" parece estar alcanzando sus límites tecnológicos [64]. El uso de los canales de nanotubos proteicos ha demostrado ser una alternativa exitosa para alcanzar los objetivos mencionados: Reches y Gazit emplearon nanotubos de péptidos amiloides para sintetizar NW de plata [146]; Knez y colaboradores, así como Tsukamoto y colaboradores emplearon el canal central del TMV para sintetizar NW

de diferentes metales, ya sea mediante la "activación" química de la superficie mediante paladio para formar NW de níquel o mediante la reducción de dos metales (Co-Pt, Fe-Pt) [60, 63]; Kobayashi y colaboradores usaron el canal central del ToMV para reducir y alinear NP magnéticas [66]. La plataforma desarrollada en el presente trabajo presenta ventajas respecto a las mencionadas ya que no es necesario modificar genéticamente a la proteína para introducirle sitios de unión a metales, no fue necesario "activar" la superficie interna para lograr la funcionalización, la funcionalización se realiza a temperatura ambiente y la producción de VP6 puede escalarse si la demanda lo requiere.

Los nanotubos funcionalizados con esta estrategia mostraron pocas o ninguna NP decorando la superficie externa de los nanotubos, probablemente debido al desprendimiento de los iones metálicos durante los ciclos de sonicación. Estos resultados muestran que introduciendo una modificación en la metodología de síntesis, se pueden **dirigir de manera específica** las funcionalizaciones a la superficie externa o interna de los nanotubos sin necesidad de modificar genética o químicamente al molde proteico.

El uso de un agente reductor débil resultó ser determinante para la formación de las nanoestructuras dentro de VP6, pues pruebas con borohidruro de sodio no dieron los resultados deseados. Cuando se adicionó dicho reductor a la mezcla de nanotubos y el precursor de plata, hubo un inmediato cambio de coloración en los tubos de reacción de transparente a gris, seguido de la precipitación de partículas. La observación al TEM de las nanoestructuras obtenidas mostró la formación de NP exclusivamente en la superficie externa de los nanotubos (**Figura 35**). La literatura indica que la formación de NP comienza con la estabilización de los iones metálicos en residuos de la superficie de la proteína, logrando la formación de clústeres metálicos mediante la adición de un agente reductor. La cinética de esta reacción depende de la concentración de los precursores, el agente reductor y condiciones del proceso como la temperatura [2, 45, 122, 147, 148]. Los resultados obtenidos usando borohidruro como agente reductor nos sugieren que este reductor fuerte produce la reducción instantánea, antes incluso de los ciclos de sonicación, de los iones metálicos presentes en la solución y en la superficie de VP6, impidiendo que dicho

reductor alcance el lumen de los nanotubos, dejando los Ag^+ en el interior de los nanotubos en su forma iónica. Esto explicaría porque sólo se observan NP en el exterior de los tubos.

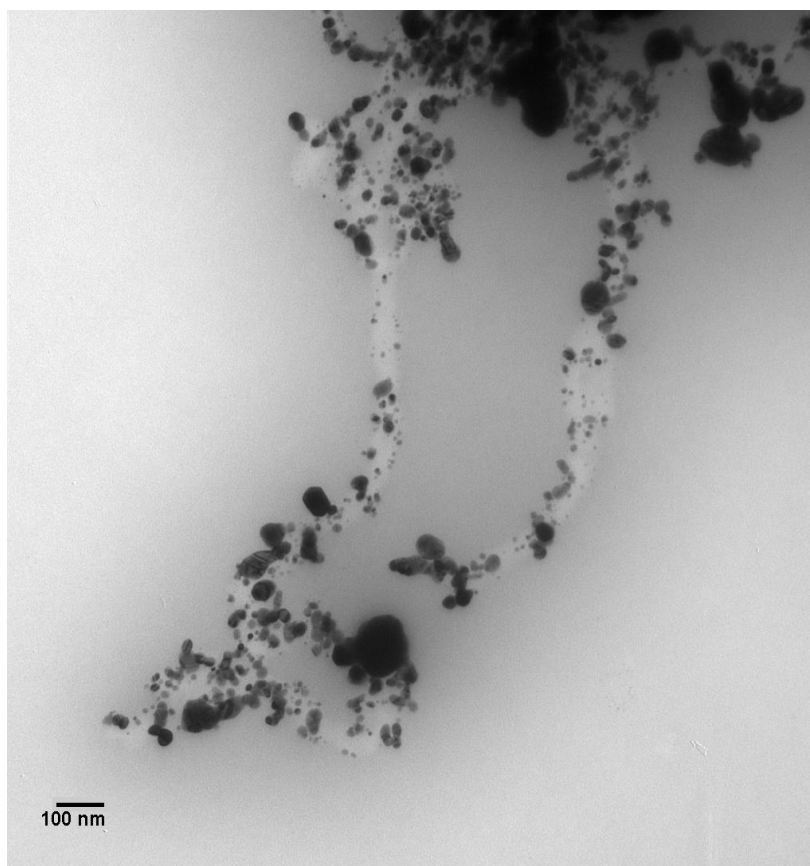


Figura 35. Funcionalización de los nanotubos de VP6 con Ag usando NaBH_4 como reductor.

Se emplearon ciclos de sonicación para introducir los reactantes al lumen del tubo, pero la funcionalización interna de los nanotubos de VP6 no se produjo.

Como ya se había mencionado antes, la primera condición que debía cumplirse para funcionalizar el canal de los nanotubos de VP6 era que los precursores entraran al lumen de los tubos. Cuando el proceso de funcionalización se realizó sin sonicación, no se observaron NP en el interior de los tubos, sólo en el exterior como ya se había reportado previamente [84]. Esto sugiere que la carga negativa dentro de los nanotubos de VP6 no fue suficiente para atraer electrostáticamente a los iones Ag^+ , por lo que es indispensable sonicar la mezcla de reacción para conseguir el transporte de los iones.

Durante la sonicación se forman e implotan burbujas de varios micrómetros de diámetro; de acuerdo con Huang y colaboradores [149], la implosión promueve que

los nanotubos o filamentos presentes en el líquido se alineen al flujo radial, con lo cual se puede producir la entrada de solvente y solutos a los tubos (**Figura 36a**). Este fenómeno fue observado en las micrografías electrónicas por la formación de meniscos (**Figura 36b**), los que sugieren la dirección del flujo de precursores. Tsukamoto y colaboradores también emplearon ultrasonido para producir nanoalambres dentro del TMV, sin embargo requirieron la presencia de dos metales cobalto y platino [63], para lograr dicha funcionalización.

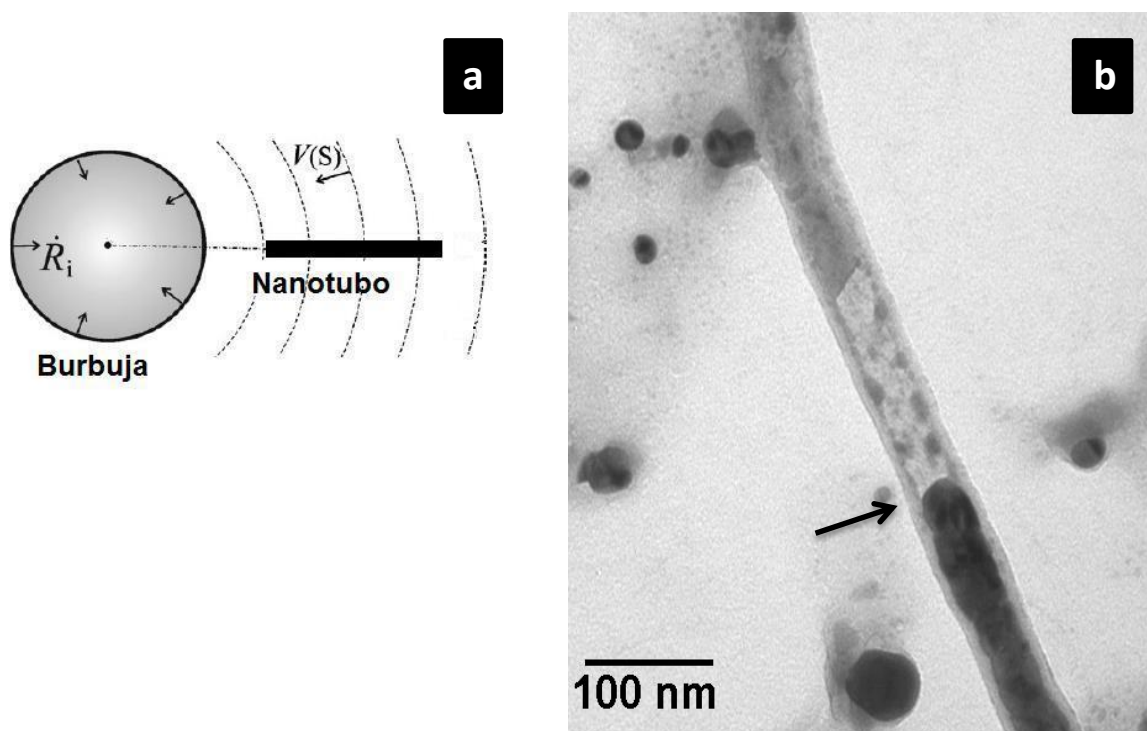


Figura 36. Entrada de precursores y formación de meniscos en nanotubos de VP6
a) Caricatura del alineamiento de los nanotubos al flujo radial con una velocidad $V(S)$ originado por la implosión de las burbujas a una velocidad (\dot{R}_i). b) Formación de meniscos de Ag dentro de los nanotubos, señalado por la flecha.

Para corroborar la presencia de plata en las nanoestructuras observadas por TEM, se realizaron análisis elementales por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS o EDX). En esta técnica, un haz de electrones impacta en punto específico de la muestra produciendo la emisión de los rayos X característicos de cada elemento. Los espectros de la **Figura 37** corroboran la presencia de plata en las nanoestructuras analizadas.

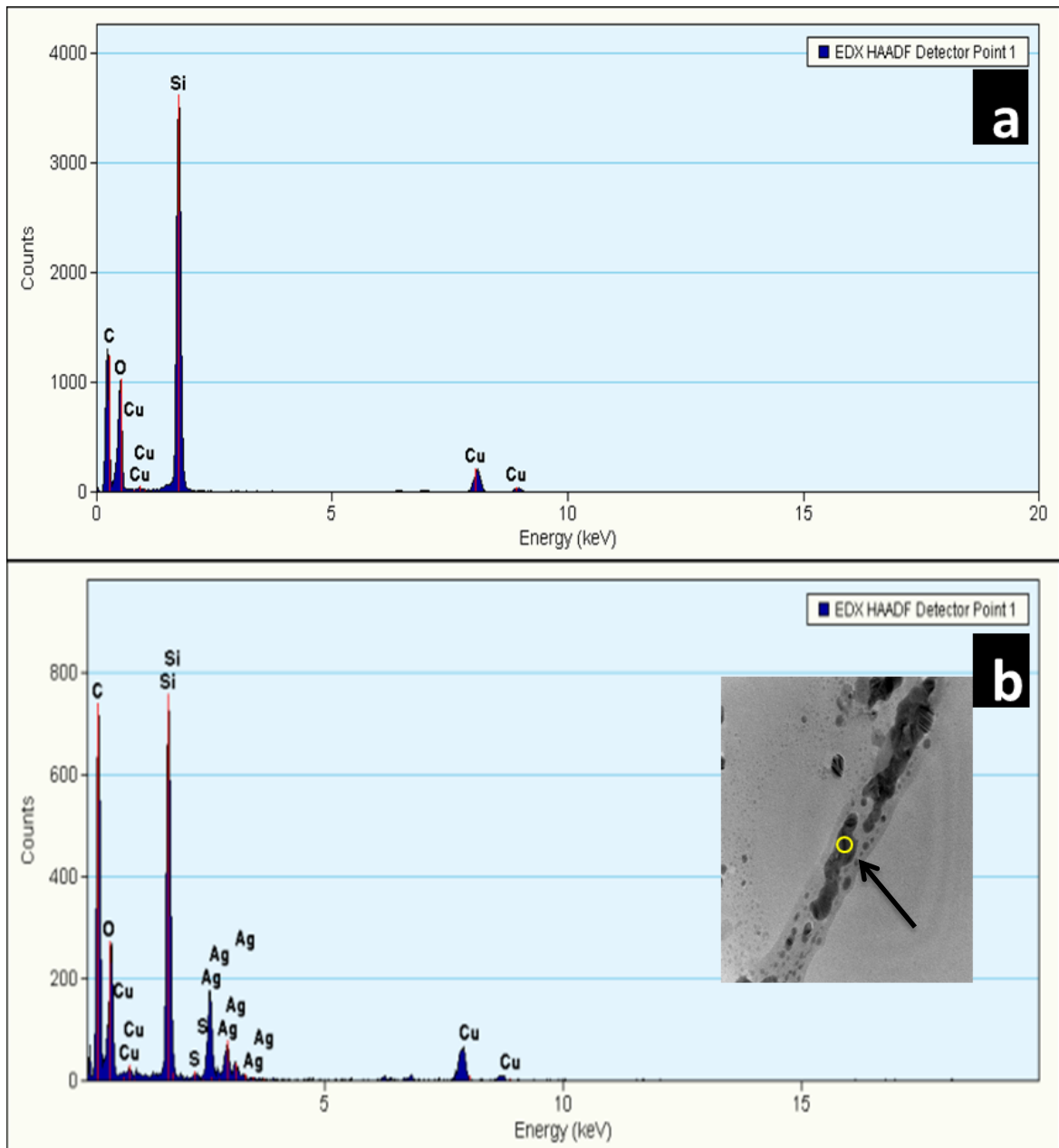


Figura 37. Análisis elemental de las nanoestructuras VP6-Ag.

- a) espectro de la rejilla de cobre sin muestra.
- b) espectro del punto marcado en la imagen del inserto.

Se analizaron las nanoestructuras mediante microscopía de alta resolución (HRTEM) y aplicando transformadas rápidas de Fourier (FFT) sobre las imágenes (**Figura 38**) para corroborar el estado metálico de la plata. Los análisis mostraron que las distancias interplanares está dentro del intervalo típico de este metal [12, 13] y que el arreglo atómico, del tipo fcc (face-centered cubic), es el característico de los cristales de plata (Ag^0), el cual les ofrece la configuración de mínima energía [12, 150].

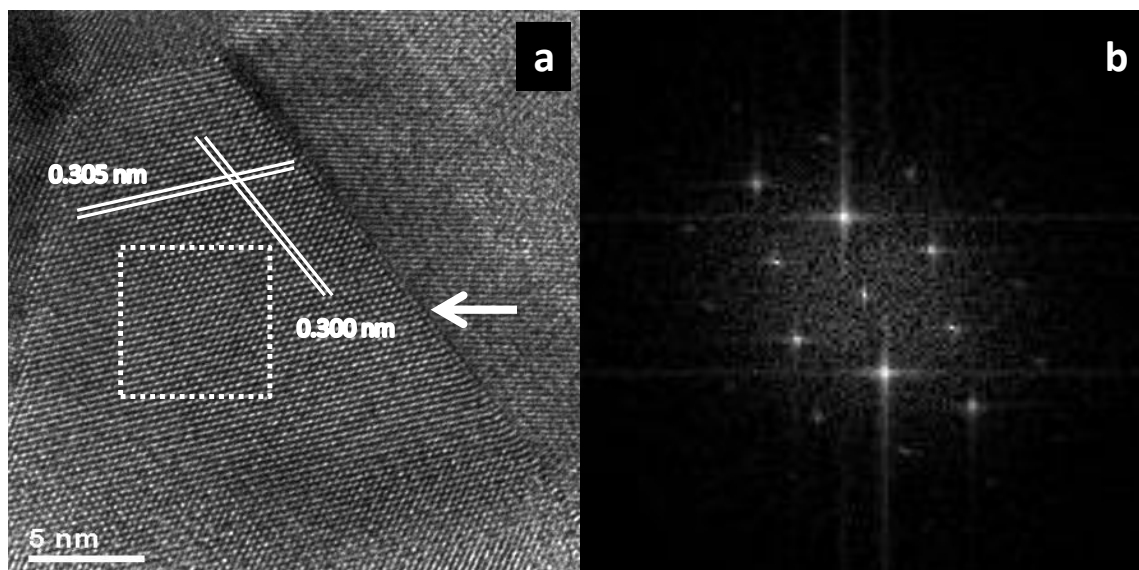


Figura 38. Estructura cristalina de las nanoestructuras de plata.
a) imagen de HRTEM. b) FFT aplicada sobre el área seleccionada en la imagen de la izquierda. La flecha muestra un gemelamiento en la nanopartícula

Las imágenes de HRTEM también mostraron gemelamientos o twins (**Figura 38a**, marcado con una flecha), los cuáles se han asociado con la liberación de energía producida durante la formación de cristales y el crecimiento de estructuras unidimensionales [151-153]. De acuerdo con Canizal y colaboradores [153], el crecimiento de estructuras unidimensionales como NR, se produce por la coalescencia de NP pequeñas. La **Figura 39** muestra que dicho proceso de coalescencia de NP produjo la formación de los NR y NW encontrados dentro de VP6. En este sentido, es claro que los nanotubos de VP6 permitieron la estabilización de los iones de plata y moldearon la formación de dichas estructuras.

Todo lo anterior sugiere el siguiente mecanismo de formación de nanoestructuras dentro de VP6: los iones de plata introducidos por la sonicación son estabilizados por ciertos residuos en la pared del tubo, el agente reductor induce la formación de NP que crecen de la pared del tubo hacia el lumen y finalmente, la coalescencia de varias NP produce la formación y crecimiento de los NR y MW.

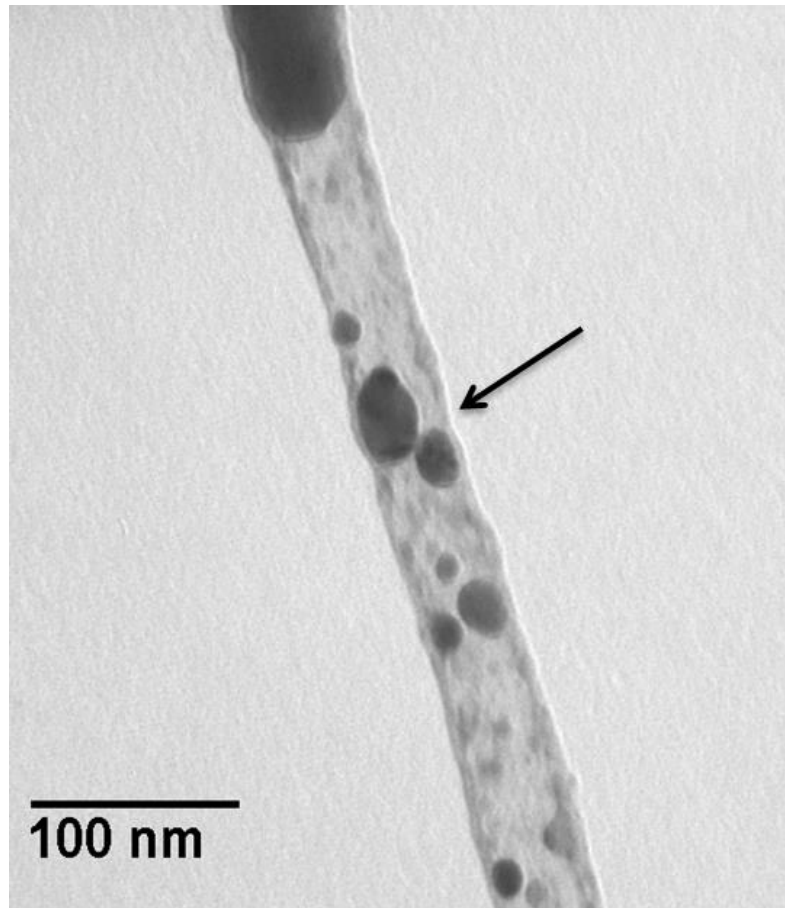


Figura 39. Coalescencia de NP dentro de los nanotubos de VP6. La flecha señala dos NP en proximidad coalesciendo.

El análisis por HAADF-STEM se usó para corroborar la localización de las reducciones de plata. En este tipo de análisis las imágenes producidas muestran diferentes contrastes dependiendo del número atómico (Z) de los elementos presentes. En la **Figura 40** se muestran alambres de plata con un alto contraste, rodeados por un material de elementos más ligeros, correspondientes a la proteína. Estos análisis junto con los EDS confirman que los NW y NR se formaron dentro del tubo proteico.

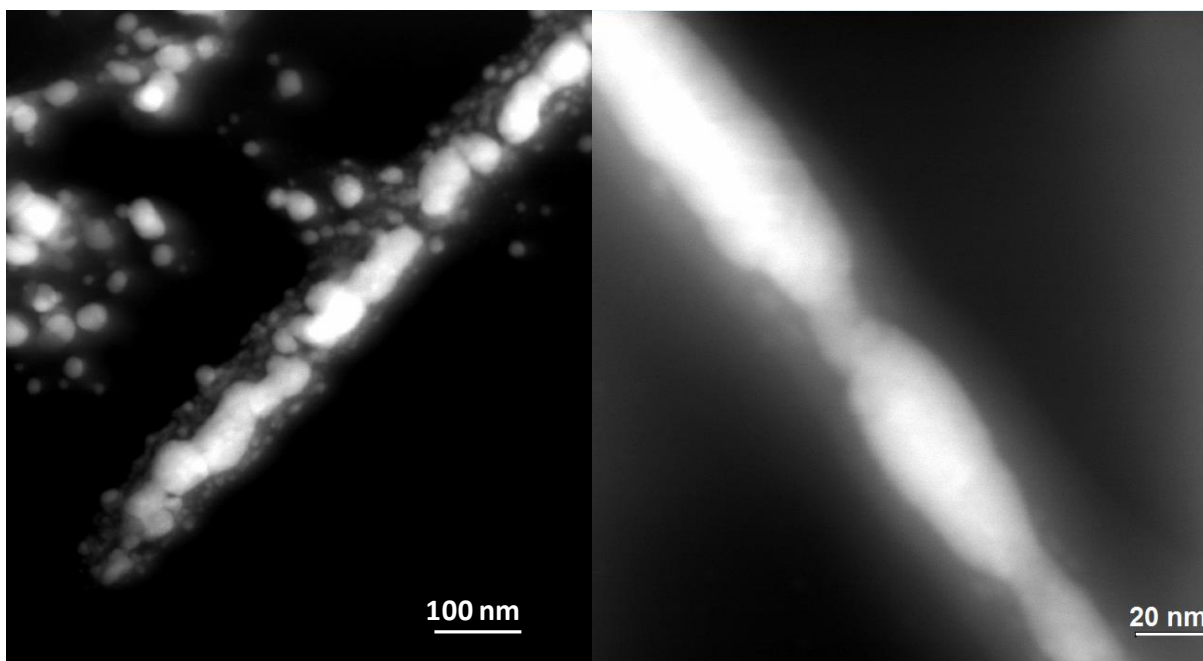


Figura 40. Localización de NW y NR de Ag en VP6. HAADF-STEM. La señal más intensa proviene del elemento más pesado, Ag, rodeado por un material más ligero.

Para identificar la capacidad del interior de los nanotubos de VP6 para estabilizar otros iones, se realizó el proceso de funcionalización descrito usando ácido cítrico como reductor y HAuCl_4 y K_2PdCl_4 como precursores metálicos, los cuales en solución se disocian en los aniones $[\text{AuCl}_4]^-$ y $[\text{PdCl}_4]^{2-}$. El análisis por TEM de los nanocomplejos obtenidos se muestra en la **Figura 41** y se puede observar que ninguno de estos precursores produjo la formación de estructuras dentro de VP6, tal como se consiguió con Ag.

El uso de ácido tricloroaurico (**Figura 41a**) produjo la formación de NP y pequeños agregados en la pared externa de los nanotubos. Sin embargo, si se compara con los nanocomplejos formados sin la aplicación de sonicación, como los que se describen en el capítulo anterior (5.2) (ver **Figura 20**), la cantidad aparente de NP reducidas es mucho menor, por lo que es posible que un número considerable de iones adheridos a la superficie de la proteína fueron desprendidos durante los ciclos de ultrasonido. Por otra parte, el flujo turbulento producido por la sonicación, pudo favorecer el crecimiento de los agregados formando estructuras similares a rodillos o "gusanos", fenómeno que ya había sido reportado previamente [154]. Estos fenómenos pueden representar una ventaja adicional del proceso de sonicación pues harían posible modular la estructura de las NP reducidas sobre la superficie de VP6.

Por otra parte, cuando se usó la sal de paladio como precursor, se redujeron NP discretas sobre la superficie externa de VP6. Estas NP se organizaron en un arreglo similar al observado en los nanotubos de VP6 desnudos cuando se tiñen negativamente con acetato de uranilo (**Figura 15**), el cual se introduce en los diferentes canales del nanotubo que son accesibles al solvente, permitiendo ver el arreglo hexagonal de los trímeros que forman el nanotubo. Esto sugiere que los iones Pd(II) se estabilizan y forman NP en dichos canales, manteniendo la estructura tubular y permitiendo la visualización de las nanoestructuras.

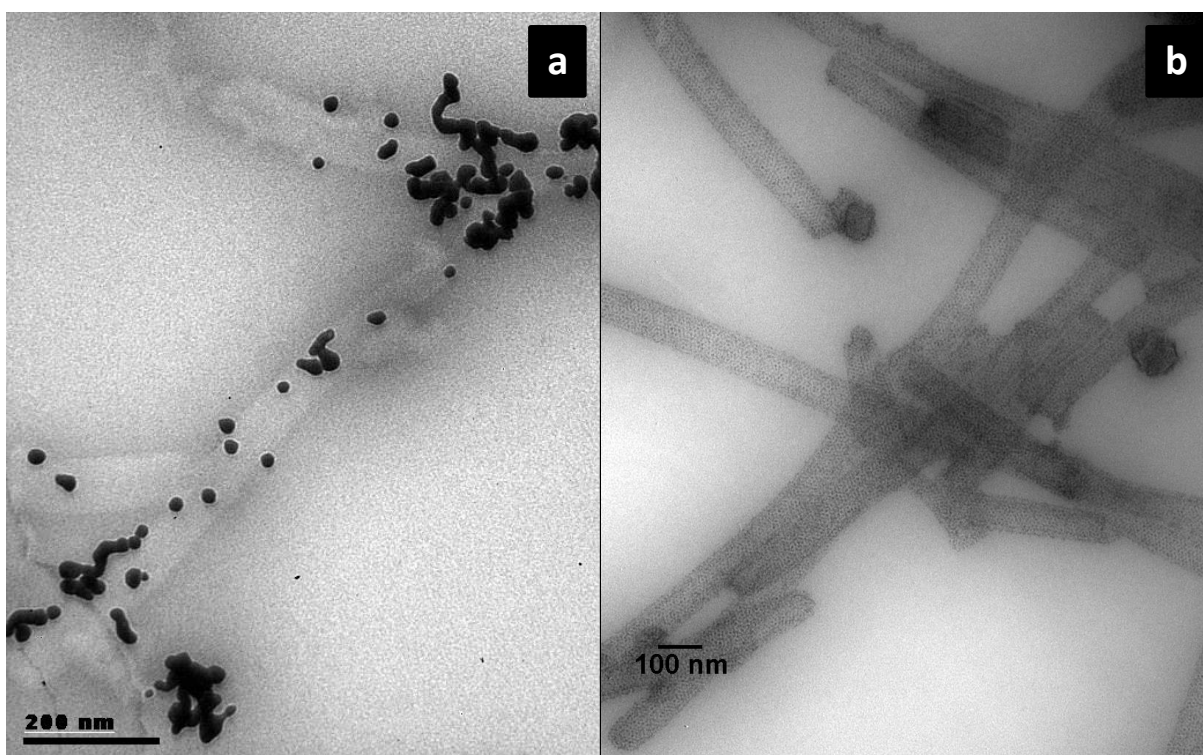


Figura 41. Estructuras con a) oro y b) paladio en los nanotubos de VP6. La metodología de funcionalización fue la misma que la empleada para Ag, incluyendo los ciclos de sonicación.

Con los resultados obtenidos se infiere que la funcionalización de VP6 es un proceso específico que involucra la estabilización de cationes en residuos con potencial negativo localizados en la superficie interna de los nanotubos.

Para determinar los posibles sitios de unión de los iones metálicos con el interior de VP6, se realizaron simulaciones computacionales de las interacciones entre los iones Ag^+ y Au(III) , con la parte baja del trímero de VP6, la cual forma la pared interna de

los nanotubos. Pese a que la simulación del acoplamiento molecular “docking” es una herramienta muy empleada para determinar las posibilidades de unión de ligandos e inhibidores a sus receptores, muy pocos trabajos, incluyendo el presente, han reportado el uso de este método para la identificación de sitios de unión de metales a proteínas [155]. El “docking” se realizó considerando el estado de protonación de los residuos de la proteína y las cargas de las especies iónicas, ya que como aquí se postula y en otros trabajos se ha reportado, las interacciones electrostáticas son fundamentales para la unión de iones metálicos en las superficies biológicas [156, 157]. Experimentalmente, las reacciones de funcionalización con AgNO_3 y HAuCl_4 tienen un pH de 7 y 5, respectivamente, por lo que el cálculo de las cargas de la proteína se realizó a estos pH. Dichas interacciones se muestran en la **Figura 42** y la Tabla 3.

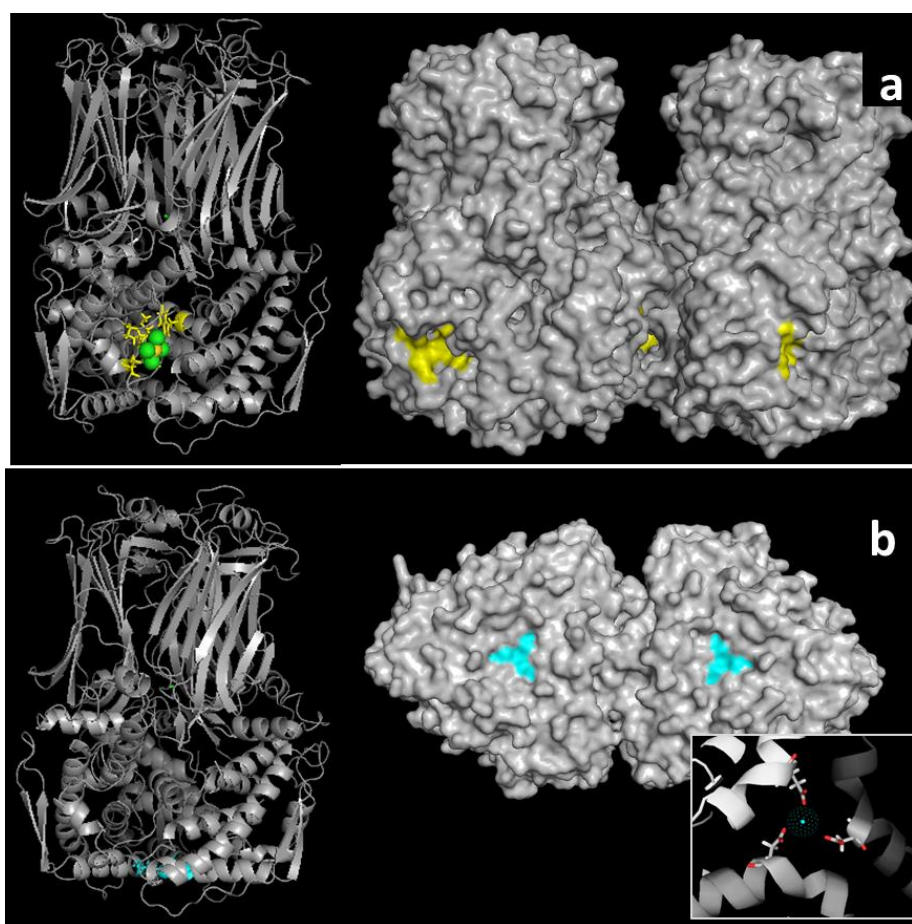


Figura 42. Simulación del acoplamiento entre el trimero de VP6 y los iones metálicos.

En a) se muestra los sitios de unión (amarillo) de los iones Au(III) con VP6, mientras que en b) se muestra la interacción de VP6 (cian) y los iones de Ag . En el inserto se muestra un acercamiento de la parte inferior del trímero donde se encuentran los Asp29 de cada monómero estabilizando al Ag^+ .

Tabla 3. Comparación de los resultados del acoplamiento molecular para Ag⁺ y Au(III).

Especie	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal mol⁻¹)	K_i (mM)	Residuos de unión
Ag ⁺	-3.65	2.12	Asp29
[AuCl ₄] ⁻	-2.2	23.55	Met1, Asp2, Pro111, Ser120, Trp139

$\Delta G_{\text{unión}}$ = energía libre de unión estimada

K_i = constante de inhibición estimada (supone que el ion es un inhibidor)

Comparando los parámetros $\Delta G_{\text{unión}}$ y K_i , calculados por el programa para ambas especies, se observa que la unión más favorable es la interacción del catión de plata con la proteína.

En cuanto a los sitios de unión predichos, en el caso de Au(III) la simulación indica que la interacción de este ion con VP6 se produce en residuos que tienen poco o nulo acceso al solvente y que en el ensamblaje tubular, están implicados en las uniones inter-trímero [76]. Por lo tanto, es poco probable que suceda esta interacción. En caso contrario, se observa que la interacción entre Ag⁺ y la proteína se produce en un solo aminoácido de cada monómero, en el Asp29, el cual está localizado en el centro del trímero, con su cadena lateral hacia el lumen del nanotubo y formando un arreglo espacial, que asemeja al que forman las His153 que coordinan al ion Zn²⁺, que estabiliza al trímero [76, 85].

Estos resultados confirman que la estabilización de los iones de plata se da en la zona con potencial electrostático negativo reportada por [76], la cual está formada por los Asp29 de cada monómero, además demuestran la capacidad intrínseca de VP6 para unir cationes metálicos.

Otros reportes muestran que proteínas o péptidos que contienen residuos de aspártico, tienen la capacidad de promover la formación de NP de plata y titanio [158-163]. La importancia de la carga producida por la presencia de Asp o Glu en el interior de TMV, fue reportada por Dujardin y colaboradores [164], quienes cambiaron los aspárticos y glutámicos del interior de la partícula viral por residuos no cargados y encontraron una menor nucleación de iones de plata. Por otra parte, el

grupo de Belcher [70] demostró que desplegando hexámeros de Asp o Glu sobre la superficie de levaduras se favorece la unión y reducción de iones de plata para formar nanopartículas, y más aún, demostraron que la conformación plegada de uno de los péptido produce un mayor número de NP, en comparación con el péptido lineal. Kasyutich y colaboradores reportaron la estructura de la ferritina de *P. furiosus* cristalizada en presencia de plata y encontraron que tiene dos sitios que coordinan a los iones de Ag(I), uno de los cuáles contiene residuos de aspártico y glutámico [165]. Estos reportes indican que el arreglo espacial de los residuos es importante para promover la unión de los cationes. En nuestro caso, es posible que el arreglo espacial que presentan los Asp29 en el trímero de VP6 también favorezca la unión de Ag⁺. El conocimiento de esta configuración de aspárticos ofrece la posibilidad de diseñar y desarrollar racionalmente nuevas biomoléculas con afinidad a cationes.

Las características intrínsecas de VP6 hacen de ella un andamio versátil para la construcción de nanomateriales, ya que ofrecen la posibilidad de utilizar a los nanotubos de esta proteína como moldes para la síntesis *in situ* de diferentes tipos de nanoestructuras, ya sea NW, explotando su canal central, o nanotubos decorados con NP en su superficie externa. Todo lo anterior sin modificar a la proteína, sino simplemente modificando el proceso de funcionalización.

5.3.2. Funcionalización interna de VP6: proteína encapsulando NP

En los capítulos anteriores se ha demostrado que los nanotubos de VP6 son un molde versátil para la construcción de diferentes nanomateriales. Un factor determinante a considerar en su utilización, es que la integridad estructural de VP6 debe ser suficiente para soportar la reacción de reducción y/o los ciclos de sonicación. Iozzin Ríos demostró en su tesis de licenciatura [91] que la sonicación es un buen método para determinar la calidad estructural de los nanotubos de VP6. Por ejemplo, encontró que los nanotubos reensamblados mostraron menor resistencia al rompimiento por sonicación que los nanotubos ensamblados recién purificados y por tanto, no son candidatos para funcionalizarse internamente. Es posible que estas diferencias de resistencia sean debidas a diferencias en el arreglo estructural de los trímeros de VP6 en los tubos reensamblados, fenómeno estudiado por Ready y

colaboradores [78], o por la pérdida de iones Zn^{2+} durante los procesos de diálisis, iones que son importantes para la estabilidad del trímero [85].

Como una alternativa para funcionalizar a VP6, independientemente de la calidad estructural de los nanotubos, se probó la capacidad de reensamblaje de VP6 [11] para recubrir NP metálicas prefabricadas.

En la literatura se han reportado diferentes partículas virales icosaédricas empleadas para encapsular material inorgánico, como las del BMV, CCMV, CPMV y RCNMV, explotando la propiedad natural de estas proteínas para autoensamblarse en ambientes controlados de pH, temperatura y fuerza iónica, y recubrir el material genético del virus [166].

Está descrito que el polimorfismo de VP6 depende de dos factores primordiales: el estado de protonación de la proteína, dictado por el pH del medio, y el contacto con otras proteínas de la cápside del rotavirus. VP6 es la proteína que forma la capa intermedia del virus, se encuentra recubriendo a la capa formada por VP2 y a su vez, está rodeada por la capa de VP7 [74]. Estas interacciones dirigen el ensamblaje de VP6 hacia la estructura icosaédrica, independientemente del pH o la fuerza iónica del medio [75]. Está descrito que los residuos de VP6 que interactúan con VP2 se localizan en el asa $\beta b-\alpha c$, principalmente en los residuos 69-73 [74, 167], cuya secuencia es TLLNL, por lo que las interacciones con VP2 son del tipo hidrofóbicas. En este trabajo se estudió la posibilidad de que VP6 se ensamblara alrededor de NP inorgánicas bajo diferentes condiciones de pH. Con base en los antecedentes, se emplearon NP de FeO_x (óxido de hierro) sin carga, de aproximadamente 70 nm de diámetro, para simular la capa de VP2; y NP de Au, con carga negativa, de aproximadamente 40 nm de diámetro (amablemente donadas por G. Plascencia-Villa, UTSA) para determinar la capacidad de VP6 de ensamblarse sobre materiales con carga.

Los ensayos se realizaron des-ensamblando los tubos de VP6 mediante su incubación con calcio, posteriormente, mezclando las nanopartículas con VP6 y dializando las muestras contra buffer a dos pH diferentes, 7.2 y 4.6, ya que de acuerdo con el diagrama de fases reportado por Lepault [11], a estos pH se forma tubos y esferas,

respectivamente. Las muestras se analizaron por microscopía electrónica usando acetato de uranilo como agente de tinción. En la **Figura 43** se muestran las estructuras obtenidas de los diferentes re-ensamblajes.

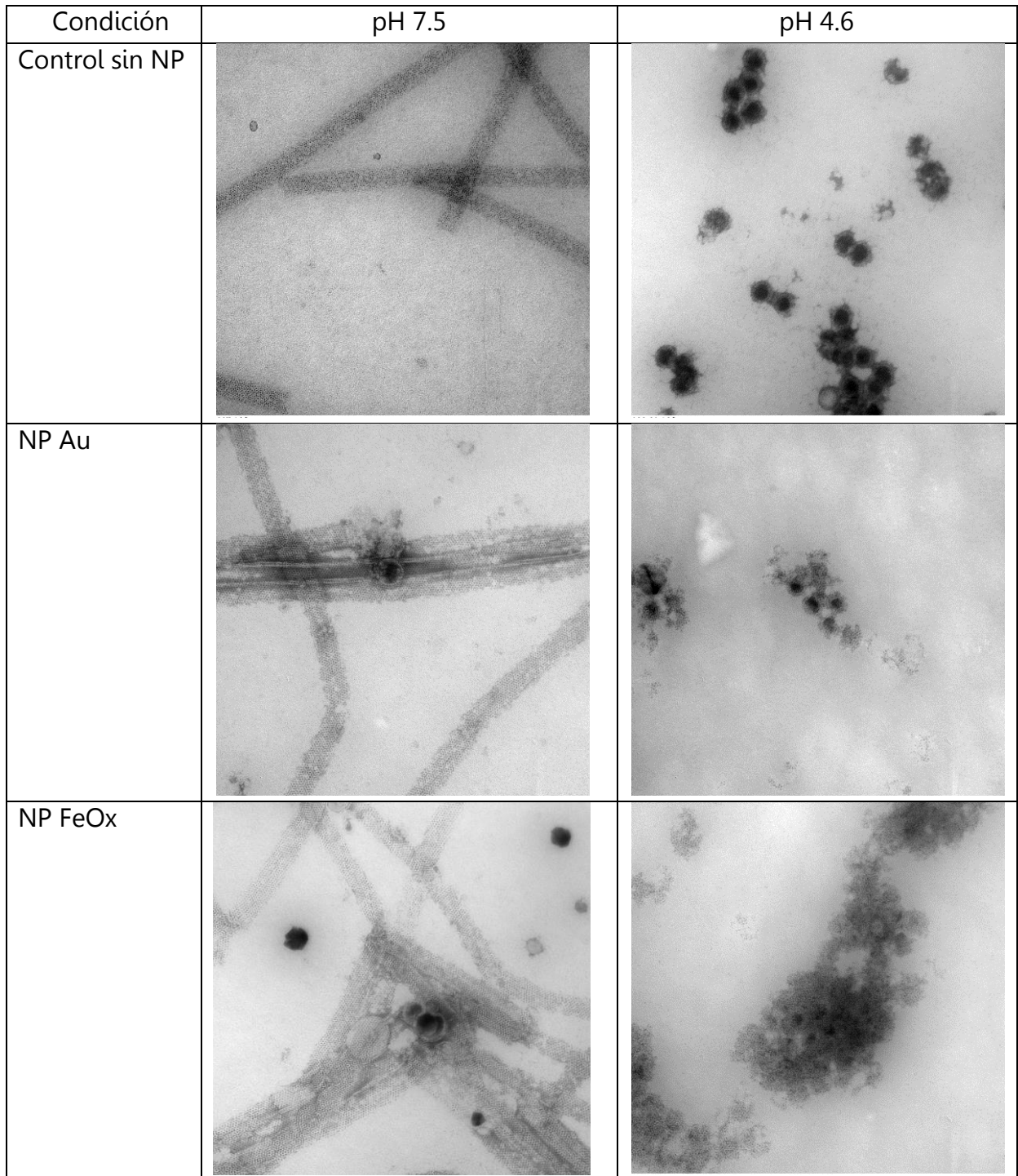


Figura 43. Estructuras formadas por el re-ensamblaje de VP6 sobre NP prefabricadas a diferentes pH.

Los controles sin NP fueron teñidos con acetato de uranilo para su visualización, lo que produce los centros electrodensos en los icosaedros de VP6. Las muestras con VP6 reensamblada en presencia de NP fueron teñidas con menor cantidad de acetato de uranilo, por lo que los centros electrodensos que se observan son debidos a la presencia de las NP metálicas y no al acetato.

Se observa que a pH 7.2 y 4.6, se ensamblaron tubos e icosaedros, respectivamente, en concordancia con lo reportado por Lepault [11]. Cuando la diálisis se llevó a cabo en presencia de NP, se encontraron estructuras electrodensas similares a esferas asociadas a los nanotubos e icosaedros; e incluso a pH 7.2 de manera inesperada, también se encontraron estructuras similares a icosaedros con zonas electrodensas en su interior (**Figura 44**).

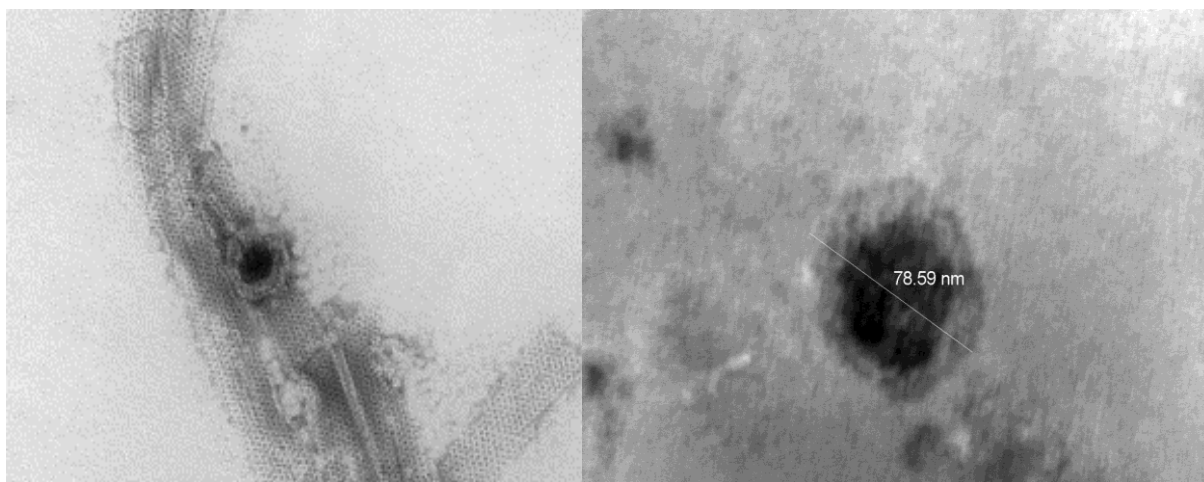


Figura 44. Estructuras formadas por el reensamblaje de VP6 a pH 7.2. A este pH solo está reportada la formación de nanotubos, sin embargo, la presencia de las NP inorgánicas durante el reensamblaje dirigió la formación de icosaedros, como se la micrografía de la derecha.

Para identificar si las zonas electrodensas observadas corresponden a la presencia de las NP, se realizaron análisis composicionales (EDX) sobre las muestras. En la **Figura 45** se muestran dos espectros obtenidos, en ellos se observa que en las estructuras observadas se encontraban presentes Au o Fe pertenecientes a las nanopartículas.

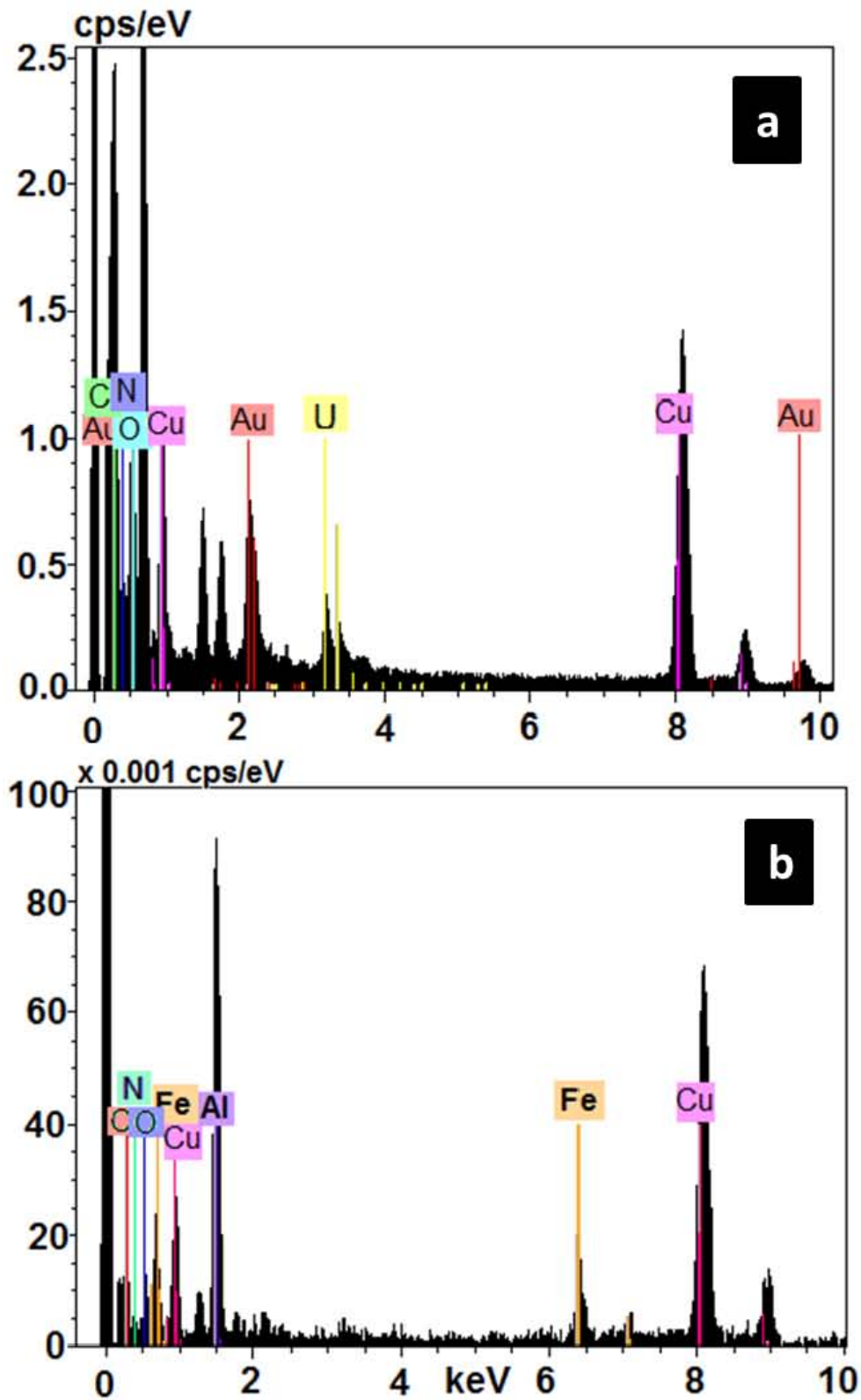


Figura 45. Análisis elemental (EDX) de las estructuras formadas por el reensamblaje de VP6.
a) VP6 incubadas con NP de oro y b) VP6 incubada con NP de FeOx.

Con base en los resultados, se observa que VP6 es capaz de asociarse con NP inorgánicas para formar estructuras tipo icosaedros, incluso bajo condiciones ambientales que dirigen el ensamblaje a estructuras tubulares. Estos resultados muestran por primera vez la posibilidad de encapsular NP en VP6 y dejan abierta la posibilidad de estudiar el fenómeno, siendo necesario determinar la eficiencia de encapsulamiento, el ordenamiento de VP6 y determinar el mecanismo por el cual ocurre. Esto ayudaría a entender tanto el ensamblaje de VP6, como a desarrollar nuevas tecnologías basadas en la versatilidad de funcionalización de VP6.

5.4. Formación de nanocomplejos multifuncionales

El objetivo final de este proyecto fue definir estrategias que permitieran construir nanocomplejos de VP6 en los que la funcionalización fuera controlada y dirigida, de tal manera que diferentes moléculas se pudieran ensamblar en VP6 con una localización específica. En el capítulo **5.2**, se aplicó una estrategia para obtener complejos de VP6 con doble funcionalización, NP de oro y agentes tiolados, con lo cual se logró modular las propiedades de los complejos y abrir la posibilidad de futuras aplicaciones. Las metodologías desarrolladas en este capítulo mostraron que es posible dirigir las funcionalizaciones hacia una superficie específica de los nanotubos de VP6, introduciendo una modificación en el proceso de funcionalización o explotando la capacidad de autoensamblaje de la proteína. Haciendo uso de estas metodologías podrían construirse complejos con diferentes materiales en localizaciones específicas. Queda como perspectiva de este trabajo el emplear estas metodologías propuestas para construir nanocomplejos multifuncionales y aplicarlos en el desarrollo nuevas tecnologías.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que los nanotubos formados por la proteína de VP6 de rotavirus pueden ser funcionalizados metálicamente en sus superficies interna y externa, mediante metodologías sencillas, en medio acuoso y bajo condiciones ambientales estándar (suaves).

Los nanotubos de VP6 fueron funcionalizados en su superficie externa con nanopartículas de oro, formando nanocomplejos VP6-Au. Las propiedades fisicoquímicas de los nanocomplejos, como el tamaño de partícula, la resonancia de los plasmones, la estabilidad coloidal e incluso su citotoxicidad, pudieron ser modificadas mediante el empleo de agentes estabilizadores como el MPS o el GlcC₅SH. Al variar la relación molar entre la molécula tiolada y el precursor metálico, fue posible sintetizar una amplia gama de nanocomplejos con propiedades específicas que podrían tener potenciales aplicaciones en diversos campos de la tecnología como el desarrollo de biosensores y la nanoelectrónica.

El mayor reto de este trabajo fue encontrar las condiciones de síntesis que permitieran la funcionalización del interior de los nanotubos de VP6. Las estrategias desarrolladas en este trabajo dirigieron de manera específica la funcionalización de plata hacia el lumen de los nanotubos, produciendo nanoalambres y nanorodillos de diámetro constante y longitudes entre las más largas reportadas con el uso de bio-andamios. Estos resultados muestran la versatilidad natural de VP6 para la construcción de diversas estructuras, ya que puede servir como molde para la síntesis de nanopartículas discretas, así como de estructuras 1-D. La metodología implementada permitió determinar que la funcionalización de VP6 fue específica para cationes de Ag, ya que los aniones de otros metales no produjeron estructuras dentro de VP6, sin embargo, se conserva la funcionalización exterior de VP6. Por otra parte, se predijo mediante simulación molecular que dicha especificidad se debe a las características naturales de VP6, ya que posee en la base del trímero, el que forma la pared interna de los nanotubos, un arreglo de residuos Asp que estabiliza y permite la nucleación de los cationes metálicos. Este sitio de interacción entre VP6 y

los cationes metálicos, podrá servir para diseñar y construir de manera racional, bio-andamios con afinidades específicas.

Los ensayos preliminares mostraron que es posible que VP6 encapsule nanopartículas inorgánicas prefabricadas, lo que permitiría la expansión de sus aplicaciones y el empleo de proteína VP6 no ensamblada o con la calidad estructural suficiente para ser funcionalizada mediante los procesos de síntesis descritos.

Todo lo anterior demostró que las propiedades intrínsecas de VP6 permiten definir la localización específica de las funcionalizaciones en los tubos de VP6 sin la necesidad de modificaciones químicas o genéticas de la proteína, lo que la convierte en un bio-templado de gran utilidad para la nanobiotecnología.

Las estrategias de funcionalización interna presentadas aquí, permiten asentar las bases para la futura construcción de diversos complejos bifuncionalizados y expandir la gama de potenciales aplicaciones nanobiotecnológicas de VP6.

7. PERSPECTIVAS

En este trabajo se mostró la versatilidad de VP6 como andamio y molde para la construcción de estructuras con interés nanotecnológico, además se propusieron metodologías para la construcción de nanocomplejos bi y multifuncionales, ya sea mediante la explotación de las dos superficies disponibles en los nanotubos de VP6 o mediante la conjugación de las NP estabilizadas con tioles. La perspectiva más importante de este trabajo es aplicar las metodologías propuestas para comprobar su efectividad y aplicar los nanocomplejos producidos en el desarrollo de tecnologías novedosas, como por ejemplo, para la construcción de biosensores, partículas de captura de células o moléculas o bien, agentes de incremento de señales para espectroscopía Raman (SERS).

Considerando la importancia de la bio-seguridad y bio-compatibilidad del empleo de los nanomateriales, es necesario abundar en el estudio de estos parámetros en nuestros nanocomplejos. Los ensayos de citotoxicidad mostrados en este trabajo muestran tendencias en los efectos de los nanocomplejos sobre dos líneas celulares, no obstante, es necesario estandarizar las metodologías empleadas de tal manera que se obtengan resultados menos variables. Por otra parte, queda por determinar si los efectos causados sobre la viabilidad celular fueron debidos a la internalización de los complejos, la liberación de iones o la carga de las partículas.

En este trabajo se caracterizaron algunas propiedades de los complejos formados por VP6. Otras propiedades reportadas para nanopartículas menores a 2 nm deben ser analizadas, tales como la luminiscencia, el magnetismo y la capacidad catalítica.

La asociación de nanopartículas prefabricadas con VP6 ha sido demostrada mediante técnicas de microscopía. Es necesario continuar con este estudio de encapsulación para determinar el arreglo de VP6 sobre las NP, la eficiencia de encapsulamiento y el mecanismo de encapsulación. Con ello, se ampliaría el conocimiento que se posee sobre el ensamblaje de VP6, así como también se abriría la posibilidad de diversificar las funcionalizaciones de VP6 sin necesidad de modificar a la proteína.

Por otra parte, podría determinarse las propiedades mecánicas de los nanocomplejos para poder determinar sus límites de empleo. Esto último puede ser realizado mediante nano-indentaciones con el microscopio de fuerza atómica (AFM).

8. PRODUCTOS GENERADOS

8.1. Artículos arbitrados

A. Carreño-Fuentes, L; Ascencio, JA; Medina, A; Aguila, S; Palomares, LA; Ramírez, OT. (2013) Strategies for specifically directing metal functionalization of protein nanotubes: constructing protein coated silver nanowires. *Nanotechnology*. 24: 235602.

B. Plascencia-Villa, G; **Carreño-Fuentes, L;** Bahena, D; José-Yacamán, M; Palomares, LA; and Ramírez, OT. Aberration-corrected STEM characterization of hybrid conductive nanobiomaterials derived from viral proteins. Sometido.

C. Carreño-Fuentes, L; Plascencia-Villa, G; Moya, S; Palomares, LA; Ramírez, OT. Modulating physicochemical properties of protein nanotubes-metal nanoparticles complexes through thiol surface modification. En preparación.

8.2. Solicitud de patente

A. Estrategias para dirigir la funcionalización metálica de ensamblados protéicos multiméricos. Inventores: Carreño-Fuentes, L; Palomares, LA; Ramírez, OT. (Por someterse)

B. Funcionalización de estructuras proteicas multiméricas con nanopartículas metálicas modificadas por tioles. Inventores: Carreño-Fuentes, L; Palomares, LA; Ramírez, OT. (Por someterse)

8.3. Trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales

A. Carreño-Fuentes, L; Medina, A; Ascencio, JA; Palomares, LA; Ramírez, OT. (2011) Empleo de nanotubos proteicos como templado para la biorreducción de nanoestructuras. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Querétaro, Querétaro. México. Póster.

B. Carreño-Fuentes, L; Medina, A; Ascencio, JA; Palomares, LA; Ramírez, OT. (2013) Production of silver nanowires inside rotavirus VP6 tubes. 245th American Chemical Society National Meeting and Exposition, New Orleans, USA. Póster.

C. Carreño-Fuentes, L; Plascencia-Villa, G; Moya, S; Palomares, LA; Ramírez, OT. (2013) Using rotavirus VP6 to produce protein coated inorganic nanoparticles. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cancún, Quintana Roo. México. Póster.

D. Ríos-de Anda, BI; Carreño-Fuentes, L; Ramírez-Reivich, OT.; Palomares, LA; Méndez-Méndez, JV; Martínez-Rivas, A. (2013) Study of mechanical properties and polymorphism of rotavirus VP6 nanotubes through ultrasonication and AFM. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cancún, Quintana Roo. México. Póster.

E. Carreño-Fuentes, L; Plascencia-Villa, G; Moya, S; Palomares, LA; Ramírez, OT. (2013) Tuning optical properties and aqueous solubility of protein-metal nanotubes by thiol surface modification. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cancún, Quintana Roo. México. Presentación oral.

8.4. Tesis dirigidas

Ríos de Anda, Beatriz Iotzin (2012) Estudio de las propiedades mecánicas y polimorfismo de VP6 de rotavirus mediante ultrasonicación. Facultad de Química, UNAM.

9. REFERENCIAS

1. Tel-Vered, R., Yehezkeili, O., and Willner, I., *Biomolecule/nanomaterial hybrid systems for nanobiotechnology*. Adv Exp Med Biol, 2012. **733**: p. 1-16.
2. Yamashita, I., *Biosupramolecules for nano-devices: biomineralization of nanoparticles and their applications*. J Mater Chem, 2008. **18**(32): p. 3813-3820.
3. Mirkin, C.A., *The beginning of a small revolution*. Small, 2005. **1**(1): p. 14-6.
4. Roco, M.C., Mirkin, C.A., and Hersam, M.C., *Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020*. Science Policy Reports, ed. M.C. Roco, C.A. Mirkin, and M.C. Hersam. 2011: Springer.
5. Zhang, S., *Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(10): p. 1171-8.
6. Koopmans, R.J. and Aggeli, A., *Nanobiotechnology--quo vadis? Current opinion in microbiology*, 2010. **13**(3): p. 327-34.
7. Tomczak, M.M., Slocik, J.M., Stone, M.O., and Naik, R.R., *Bio-based approaches to inorganic material synthesis*. Biochemical Society transactions, 2007. **35**(Pt 3): p. 512-5.
8. Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A.K., Schulten, K., and Baneyx, F., *Molecular biomimetics: nanotechnology through biology*. Nat Mater, 2003. **2**(9): p. 577-85.
9. Singh, P., Gonzalez, M.J., and Manchester, M., *Viruses and their uses in nanotechnology*. Drug Develop Res, 2006. **67**(1): p. 23-41.
10. Douglas, T. and Young, M., *Viruses: Making friends with old foes*. Science, 2006. **312**(5775): p. 873-875.
11. Lepault, J., Petitpas, I., Erk, I., Navaza, J., Bigot, D., Dona, M., Vachette, P., Cohen, J., and Rey, F.A., *Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus*. EMBO J, 2001. **20**(7): p. 1498-507.
12. Plascencia-Villa, G., Medina, A., Palomares, L.A., Ramirez, O.T., and Ascencio, J.A., *Structural Characterization of Rotavirus-Directed Synthesis and Assembly of Metallic Nanoparticle Arrays*. J Nanosci Nanotechno, 2013. **13**(8): p. 5572-5579.
13. Plascencia-Villa, G., *Desarrollo de nanopartículas mediante la funcionalización de proteínas virales de rotavirus*. Tesis, Doctorado. 2010. Instituto de Biotecnología, UNAM
14. Plascencia-Villa, G., Mena, J.A., Castro-Acosta, R.M., Fabian, J.C., Ramirez, O.T., and Palomares, L.A., *Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011. **879**(15-16): p. 1105-11.

15. Ascencio, J.A., *Simulación de procesos de agregación de nanopartículas y su análisis mediante microscopía electrónica de alta resolución*. Tesis, Doctor 2000. Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México
16. Kumart, S.A. and Khan, M.I., *Heterofunctional nanomaterials: fabrication, properties and applications in nanobiotechnology*. J Nanosci Nanotechnol, 2010. **10**(7): p. 4124-34.
17. Nie, Z., Petukhova, A., and Kumacheva, E., *Properties and emerging applications of self-assembled structures made from inorganic nanoparticles*. Nat Nanotechnol, 2010. **5**(1): p. 15-25.
18. Shi, W., Zeng, H., Sahoo, Y., Ohulchanskyy, T.Y., Ding, Y., Wang, Z.L., Swihart, M., and Prasad, P.N., *A general approach to binary and ternary hybrid nanocrystals*. Nano Letters, 2006. **6**(4): p. 875-81.
19. Jutz, G. and Boker, A., *Bionanoparticles as functional macromolecular building blocks - A new class of nanomaterials*. Polymer, 2011. **52**(2): p. 211-232.
20. Mirkin, C.A. and Tuominen, M., *Synthesis, Processing, and Manufacturing of Components, Devices, and Systems, in Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020: Retrospective and Outlook, Science Policy Reports 1*, M.C. Roco, C.A. Mirkin, and M.C. Hersam, Editors. 2011, Springer.
21. Sotiropoulou, S., Sierra-Sastre, Y., Mark, S.S., and Batt, C.A., *Biotemplated nanostructured materials*. Chem Mater, 2008. **20**(3): p. 821-834.
22. Biswas, A., Bayer, I.S., Biris, A.S., Wang, T., Dervishi, E., and Faupel, F., *Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: techniques, applications & future prospects*. Adv Colloid Interface Sci, 2012. **170**(1-2): p. 2-27.
23. Gates, B.D., Xu, Q., Stewart, M., Ryan, D., Willson, C.G., and Whitesides, G.M., *New approaches to nanofabrication: molding, printing, and other techniques*. Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1171-96.
24. Flachs, B., Asano, S., Dhong, S.H., Hofstee, H.P., Gervais, G., Kim, R., Le, T., Liu, P., Leenstra, J., and al., E., *Microarchitecture and implementation of the synergistic processor in 65-nm and 90-nm SOI*. IBM Journal of Research and Development, 2007. **51**(5): p. 529-543.
25. *Product Brief Intel® Itanium® Processor 9500 Series* 2012, Intel Corporation.
26. Maynor, B.W., Li, J., Lu, C., and Liu, J., *Site-specific fabrication of nanoscale heterostructures: local chemical modification of GaN nanowires using electrochemical dip-pen nanolithography*. J. Am. Chem. Soc., 2004. **126**(20): p. 6409-13.
27. Kong, J., Cao, J., Dai, H., and Anderson, E., *Chemical profiling of single nanotubes: Intramolecular p-n-p junctions and on-tube single-electron transistors*. Appl. Phys. Lett., 2002. **80**: p. 73-75.

28. Bretagnol, F., Sirghi, L., Mornet, S., Sasaki, T., Gilliland, D., Colpo, P., and Rossi, F., *Direct fabrication of nanoscale bio-adhesive patterns by electron beam surface modification of plasma polymerized poly ethylene oxide-like coatings*. *Nanotechnology*, 2008. **19**(12): p. 125306.
29. Niemeyer, C.M., *Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science*. *Angew Chem Int Edit*, 2001. **40**(22): p. 4128-4158.
30. Tran, T.H. and Nguyen, T.D., *Controlled growth of uniform noble metal nanocrystals: aqueous-based synthesis and some applications in biomedicine*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011. **88**(1): p. 1-22.
31. Jung, Y., Lee, S.H., Ko, D.K., and Agarwal, R., *Synthesis and characterization of Ge₂Sb₂Te₅ nanowires with memory switching effect*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006. **128**(43): p. 14026-7.
32. Xing, Y.C., *Synthesis and electrochemical characterization of uniformly-dispersed high loading Pt nanoparticles on sonochemically-treated carbon nanotubes*. *J Phys Chem B*, 2004. **108**(50): p. 19255-19259.
33. Bhirde, A.A., Patel, V., Gavard, J., Zhang, G., Sousa, A.A., Masedunskas, A., Leapman, R.D., Weigert, R., Gutkind, J.S., and Rusling, J.F., *Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery*. *ACS Nano*, 2009. **3**(2): p. 307-16.
34. Yuan, J.Y. and Muller, A.H.E., *One-dimensional organic-inorganic hybrid nanomaterials*. *Polymer*, 2010. **51**(18): p. 4015-4036.
35. Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H., and Car, H., *Nanoparticles as drug delivery systems*. *Pharmacol Rep*, 2012. **64**(5): p. 1020-37.
36. Rodriguez-Yanez, Y., Munoz, B., and Albores, A., *Mechanisms of toxicity by carbon nanotubes*. *Toxicol Mech Methods*, 2013. **23**(3): p. 178-95.
37. Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M.L., Stroeve, P., and Mahmoudi, M., *Toxicity of nanomaterials*. *Chemical Society Reviews*, 2012. **41**(6): p. 2323-43.
38. Mai, Y. and Eisenberg, A., *Selective localization of preformed nanoparticles in morphologically controllable block copolymer aggregates in solution*. *Acc Chem Res*, 2012. **45**(10): p. 1657-66.
39. Hamidi, M., Azadi, A., and Rafiei, P., *Hydrogel nanoparticles in drug delivery*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(15): p. 1638-49.
40. Mann, S., *Self-assembly and transformation of hybrid nano-objects and nanostructures under equilibrium and non-equilibrium conditions*. *Nat Mater*, 2009. **8**(10): p. 781-92.
41. Wang, H., Patil, A.J., Liu, K., Petrov, S., Mann, S., Winnik, M.A., and Manners, I., *Fabrication of Continuous and Segmented Polymer/Metal Oxide Nanowires Using Cylindrical Micelles and Block Copolymer Micelles as Templates*. *Adv. Mater.*, 2009. **21**: p. 1805-1808.

42. Klefenz, H., *Nanobiotechnology: From molecules to systems*. Eng Life Sci, 2004. **4**(3): p. 211-218.
43. Whitesides, G.M., *The 'right' size in nanobiotechnology*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(10): p. 1161-5.
44. Willner, I., Baron, R., and Willner, B., *Integrated nanoparticle-biomolecule systems for biosensing and bioelectronics*. Biosens Bioelectron, 2007. **22**(9-10): p. 1841-52.
45. Dickerson, M.B., Sandhage, K.H., and Naik, R.R., *Protein- and Peptide-Directed Syntheses of Inorganic Materials*. Chemical Reviews, 2008. **108**(11): p. 4935-4978.
46. Gazit, E., *Use of biomolecular templates for the fabrication of metal nanowires*. FEBS J, 2007. **274**(2): p. 317-22.
47. Wang, R., Nuckolls, C., and Wind, S.J., *Assembly of heterogeneous functional nanomaterials on DNA origami scaffolds*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012. **51**(45): p. 11325-7.
48. de la Rica, R. and Matsui, H., *Applications of peptide and protein-based materials in bionanotechnology*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(9): p. 3499-3509.
49. Kumar, S.A. and Khan, M.I., *Heterofunctional nanomaterials: fabrication, properties and applications in nanobiotechnology*. J Nanosci Nanotechnol, 2010. **10**(7): p. 4124-34.
50. Slocik, J.M. and Naik, R.R., *Biologically programmed synthesis of bimetallic nanostructures*. Advanced Materials, 2006. **18**(15): p. 1988-+.
51. Kane, R.S. and Stroock, A.D., *Nanobiotechnology: protein-nanomaterial interactions*. Biotechnol Prog, 2007. **23**(2): p. 316-9.
52. Fischlechner, M. and Donath, E., *Viruses as building blocks for materials and devices*. Angew Chem Int Edit, 2007. **46**(18): p. 3184-3193.
53. Ludwig, C. and Wagner, R., *Virus-like particles-universal molecular toolboxes*. Curr Opin Biotechnol, 2007. **18**(6): p. 537-45.
54. Lee, S.Y., Lim, J.S., and Harris, M.T., *Synthesis and application of virus-based hybrid nanomaterials*. Biotechnol Bioeng, 2012. **109**(1): p. 16-30.
55. Manchester, M. and Steinmetz, N., *Viruses and nanotechnology*. Current topics in microbiology and immunology, ed. M. Manchester and N. Steinmetz. 2009: Springer.
56. Soto, C.M. and Ratna, B.R., *Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology*. Curr Opin Biotechnol, 2010. **21**(4): p. 426-38.

57. Strable, E. and Finn, M.G., *Chemical modification of viruses and virus-like particles*. Current topics in microbiology and immunology, 2009. **327**: p. 1-21.
58. Douglas, T. and Young, M., *Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages*. Nature, 1998. **393**(6681): p. 152-155.
59. Shenton, W., Douglas, T., Young, M., Stubbs, G., and Mann, S., *Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus*. Advanced Materials, 1999. **11**(3): p. 253-+.
60. Knez, M., Bittner, A.M., Boes, F., Wege, C., Jeske, H., Maiss, E., and Kern, K., *Biotemplate synthesis of 3-nm nickel and cobalt nanowires*. Nano Letters, 2003. **3**(8): p. 1079-1082.
61. Knez, M., Sumser, M., Bittner, A.M., Wege, C., Jeske, H., Martin, T.P., and Kern, K., *Spatially selective nucleation of metal clusters on the tobacco mosaic virus*. Adv Funct Mater, 2004. **14**(2): p. 116-124.
62. Aljabali, A.A.A., Barclay, J.E., Lomonossoff, G.P., and Evans, D.J., *Virus templated metallic nanoparticles*. Nanoscale, 2010. **2**(12): p. 2596-2600.
63. Tsukamoto, R., Muraoka, M., Seki, M., Tabata, H., and Yamashita, I., *Synthesis of CoPt and FePt₃ nanowires using the central channel of tobacco mosaic virus as a biotemplate*. Chem Mater, 2007. **19**(10): p. 2389-2391.
64. Mbindyo, J.K., Mallouk, T.E., Mattzela, J.B., Kratochvilova, I., Razavi, B., Jackson, T.N., and Mayer, T.S., *Template synthesis of metal nanowires containing monolayer molecular junctions*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(15): p. 4020-6.
65. Douglas, T., Strable, E., Willits, D., Aitouchen, A., Libera, M., and Young, M., *Protein engineering of a viral cage for constrained nanomaterials synthesis*. Advanced Materials, 2002. **14**(6): p. 415-+.
66. Kobayashi, M., Seki, M., Tabata, H., Watanabe, Y., and Yamashita, I., *Fabrication of aligned magnetic nanoparticles using tobamoviruses*. Nano Letters, 2010. **10**(3): p. 773-6.
67. Mao, C.B., Solis, D.J., Reiss, B.D., Kottmann, S.T., Sweeney, R.Y., Hayhurst, A., Georgiou, G., Iverson, B., and Belcher, A.M., *Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires*. Science, 2004. **303**(5655): p. 213-217.
68. Smith, G.P. and Petrenko, V.A., *Phage Display*. Chemical reviews, 1997. **97**(2): p. 391-410.
69. Lee, Y.J., Yi, H., Kim, W.J., Kang, K., Yun, D.S., Strano, M.S., Ceder, G., and Belcher, A.M., *Fabricating genetically engineered high-power lithium-ion batteries using multiple virus genes*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1051-5.
70. Nam, K.T., Lee, Y.J., Krauland, E.M., Kottmann, S.T., and Belcher, A.M., *Peptide-mediated reduction of silver ions on engineered biological scaffolds*. ACS Nano, 2008. **2**(7): p. 1480-6.

71. Tarascon, J.M., *Nanomaterials: Viruses electrify battery research*. Nat Nanotechnol, 2009. **4**(6): p. 341-2.
72. Glass, R.I., Parashar, U., Patel, M., Gentsch, J., and Jiang, B., *Rotavirus vaccines: Successes and challenges*. The Journal of infection, 2013.
73. Affranchino, J.L. and Gonzalez, S.A., *Deletion mapping of functional domains in the rotavirus capsid protein VP6*. The Journal of general virology, 1997. **78 (Pt 8)**: p. 1949-55.
74. Li, Z., Baker, M.L., Jiang, W., Estes, M.K., and Prasad, B.V., *Rotavirus architecture at subnanometer resolution*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 1754-66.
75. Libersou, S., Siebert, X., Ouldali, M., Estrozi, L.F., Navaza, J., Charpilienne, A., Garnier, P., Poncet, D., and Lepault, J., *Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: a potential regulatory switch of viral particle transcription activity*. J Virol, 2008. **82**(6): p. 2844-2852.
76. Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V., Cohen, J., and Rey, F.A., *Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion*. EMBO J, 2001. **20**(7): p. 1485-97.
77. Mena, J.A., Ramirez, O.T., and Palomares, L.A., *Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system*. J Biotechnol, 2006. **122**(4): p. 443-52.
78. Ready, K.F., Buko, K.M., Whippey, P.W., Alford, W.P., and Bancroft, J.B., *The structure of tubes of bovine rotavirus nucleocapsid protein (VP6) assembled in vitro*. Virology, 1988. **167**(1): p. 50-5.
79. Ready, K.F. and Sabara, M., *In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein*. Virology, 1987. **157**(1): p. 189-98.
80. Ready, K.F., Sabara, M.I., and Babiuk, L.A., *In vitro assembly of the outer capsid of bovine rotavirus is calcium-dependent*. Virology, 1988. **167**(1): p. 269-73.
81. Estes, M.K. and Cohen, J., *Rotavirus gene structure and function*. Microbiological reviews, 1989. **53**(4): p. 410-49.
82. Lawton, J.A., Estes, M.K., and Prasad, B.V., *Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles*. Nature structural biology, 1997. **4**(2): p. 118-21.
83. Crawford, S.E., Labbe, M., Cohen, J., Burroughs, M.H., Zhou, Y.J., and Estes, M.K., *Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 5945-52.
84. Plascencia-Villa, G., Saniger, J.M., Ascencio, J.A., Palomares, L.A., and Ramirez, O.T., *Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals*. Biotechnol Bioeng, 2009. **104**(5): p. 871-81.

85. Erk, I., Huet, J.C., Duarte, M., Duquerroy, S., Rey, F., Cohen, J., and Lepault, J., *A zinc ion controls assembly and stability of the major capsid protein of rotavirus*. *J Virol*, 2003. **77**(6): p. 3595-601.
86. Palomares, L.A., Estrada-Mondaca, S., and Ramirez, O.T., *Principles and applications of the insect cell baculovirus expression vector system*, in *Cell culture technology for pharmaceutical and cellular therapies*, S. Ozturk and W.S. Hu, Editors. 2006, Marcel-Dekker: New York.
87. Mena, Y.A., *Desarrollo de estrategias racionales de producción de pseudo-partículas virales en el sistema de células de insecto-baculovirus*. Tesis, Doctorado. 2007. Instituto de Biotecnología, UNAM
88. Rodriguez, M., Wood, C., Sanchez-Lopez, R., Castro-Acosta, R.M., Ramirez, O.T., and Palomares, L.A., *Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine*. *Arch. Virol*, 2013.
89. Romero, G., Estrela-Lopis, I., Castro-Hartmann, P., Rojas, E., Llarena, I., Sanz, D., Donath, E., and Moya, S.E., *Stepwise surface tailoring of carbon nanotubes with polyelectrolyte brushes and lipid layers to control their intracellular distribution and "in vitro" toxicity*. *Soft Matter*, 2011. **7**: p. 6883–6890.
90. Carreno-Fuentes, L., Ascencio, J.A., Medina, A., Aguila, S., Palomares, L.A., and Ramirez, O.T., *Strategies for specifically directing metal functionalization of protein nanotubes: constructing protein coated silver nanowires*. *Nanotechnology*, 2013. **24**(23): p. 235602.
91. Rios de Anda, I., *Estudio de las propiedades mecánicas y polimorfismo de VP6 de rotavirus mediante ultrasonificación*. Tesis, Licenciatura. 2012. Instituto de Biotecnología, UNAM
92. Mena, J.A., Ramirez, O.T., and Palomares, L.A., *Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay*. *Biotechniques*, 2003. **34**(2): p. 260-2, 264.
93. Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D., and Karplus, K., *Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8*. *Proteins*, 2009. **77 Suppl 9**: p. 114-22.
94. Dolinsky, T.J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J.E., Jensen, J.H., Klebe, G., and Baker, N.A., *PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(Web Server issue): p. W522-5.
95. Chen, J.Z., Settembre, E.C., Aoki, S.T., Zhang, X., Bellamy, A.R., Dormitzer, P.R., Harrison, S.C., and Grigorieff, N., *Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(26): p. 10644-8.
96. Huey, R., Morris, G.M., Olson, A.J., and Goodsell, D.S., *A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation*. *J Comput Chem*, 2007. **28**(6): p. 1145-52.

97. Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., and Olson, A.J., *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function*. *J Comput Chem*, 1998. **19**(14): p. 1639-1662.
98. Young, M., Willits, D., Uchida, M., and Douglas, T., *Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology*. *Annu Rev Phytopathol*, 2008. **46**: p. 361-84.
99. Sardar, R., Funston, A.M., Mulvaney, P., and Murray, R.W., *Gold nanoparticles: past, present, and future*. *Langmuir*, 2009. **25**(24): p. 13840-51.
100. Liu, S., Zhu, T., Hu, R., and Liu, Z., *Evaporation-induced self-assembly of gold nanoparticles into a highly organized two-dimensional array*. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2002. **4**: p. 6059-6062.
101. Negishi, Y., Kurashige, W., Niihori, Y., and Nobusada, K., *Toward the creation of stable, functionalized metal clusters*. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013. **15**(43): p. 18736-51.
102. Hakkinen, H., *The gold-sulfur interface at the nanoscale*. *Nat Chem*, 2012. **4**(6): p. 443-55.
103. Sakamoto, N., Ohtsuka, H., Ikeda, T., Maeda, K., Lu, D.L., Kanehara, M., Teramura, K., Teranishi, T., and Domen, K., *Highly dispersed noble-metal/chromia (core/shell) nanoparticles as efficient hydrogen evolution promoters for photocatalytic overall water splitting under visible light*. *Nanoscale*, 2009. **1**(1): p. 106-109.
104. Huang, T. and Murray, R.W., *Visible luminescence of water-soluble monolayer-protected gold clusters*. *J Phys Chem B*, 2001. **105**(50): p. 12498-12502.
105. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D.J., and Whyman, R., *Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System*. *J Chem Soc Chem Comm*, 1994(7): p. 801-802.
106. Leff, D.V., Ohara, P.C., Heath, J.R., and Gelbart, W.M., *Thermodynamic Control of Gold Nanocrystal Size - Experiment and Theory*. *J Phys Chem-Us*, 1995. **99**(18): p. 7036-7041.
107. Hostetler, M.J., Wingate, J.E., Zhong, C.J., Harris, J.E., Vachet, R.W., Clark, M.R., Londono, J.D., Green, S.J., Stokes, J.J., Wignall, G.D., Glish, G.L., Porter, M.D., Evans, N.D., and Murray, R.W., *Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size*. *Langmuir*, 1998. **14**(1): p. 17-30.
108. Yonezawa, T., Sutoh, M., and Kunitake, T., *Practical preparation of size-controlled gold nanoparticles in water*. *Chem Lett*, 1997(7): p. 619-620.
109. Templeton, A.C., Wuelfing, M.P., and Murray, R.W., *Monolayer protected cluster molecules*. *Accounts Chem Res*, 2000. **33**(1): p. 27-36.

110. Negishi, Y., Nobusada, K., and Tsukuda, T., *Glutathione-protected gold clusters revisited: bridging the gap between gold(I)-thiolate complexes and thiolate-protected gold nanocrystals*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(14): p. 5261-70.
111. Daniel, M.C. and Astruc, D., *Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. Chem. Rev., 2004. **104**(1): p. 293-346.
112. Jin, R.C., *Quantum sized, thiolate-protected gold nanoclusters*. Nanoscale, 2010. **2**(3): p. 343-362.
113. Burt, J.L., Gutierrez-Wing, C., Miki-Yoshida, M., and Jose-Yacaman, M., *Noble-metal nanoparticles directly conjugated to globular proteins*. Langmuir, 2004. **20**(26): p. 11778-83.
114. Shivhare, A., Chevrier, D.M., Purves, R.W., and Scott, R.W.J., *Following the Thermal Activation of Au₂₅(SR)₁₈ Clusters for Catalysis by X-ray Absorption Spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry C. **117**: p. 20007–20016.
115. Krommenhoek, P.J., Wang, J., Hentz, N., Johnston-Peck, A.C., Kozek, K.A., Kalyuzhny, G., and Tracy, J.B., *Bulky adamantanethiolate and cyclohexanethiolate ligands favor smaller gold nanoparticles with altered discrete sizes*. ACS Nano, 2012. **6**(6): p. 4903-11.
116. Wuelfing, W.P., Gross, S.M., Miles, D.T., and Murray, R.W., *Nanometer gold clusters protected by surface-bound monolayers of thiolated poly(ethylene glycol) polymer electrolyte*. J Am Chem Soc, 1998. **120**(48): p. 12696-12697.
117. Templeton, A.C., Chen, S.W., Gross, S.M., and Murray, R.W., *Water-soluble, isolable gold clusters protected by tiopronin and coenzyme A monolayers*. Langmuir, 1999. **15**(1): p. 66-76.
118. Chen, S.W. and Murray, R.W., *Arenethiolate monolayer-protected gold clusters*. Langmuir, 1999. **15**(3): p. 682-689.
119. Negishi, Y., Takasugi, Y., Sato, S., Yao, H., Kimura, K., and Tsukuda, T., *Kinetic stabilization of growing gold clusters by passivation with thiolates*. J Phys Chem B, 2006. **110**(25): p. 12218-12221.
120. Moores, A. and Goettmann, F., *The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications*. New J Chem, 2006. **30**(8): p. 1121-1132.
121. Faraday, M., *Experimental relations of gold (and other metals) to light*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1857. **147**: p. 145-181.
122. Tan, Y., Li, Y., and Zhu, D., *Noble metal nanoparticles*, in *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, H.S. Nalwa, Editor. 2004, American Scientific Publishers. p. 9-40.

123. Petryayeva, E. and Krull, U.J., *Localized surface plasmon resonance: nanostructures, bioassays and biosensing--a review*. Anal Chim Acta, 2011. **706**(1): p. 8-24.
124. Qian, H., Zhu, Y., and Jin, R., *Atomically precise gold nanocrystal molecules with surface plasmon resonance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(3): p. 696-700.
125. Slocik, J.M. and Wright, D.W., *Biomimetic mineralization of noble metal nanoclusters*. Biomacromolecules, 2003. **4**(5): p. 1135-41.
126. Schaaff, T.G., Shafiqullin, M.N., Khoury, J.T., Vezmar, I., Whetten, R.L., Cullen, W.G., First, P.N., GutierrezWing, C., Ascensio, J., and JoseYacaman, M.J., *Isolation of smaller nanocrystal au molecules: Robust quantum effects in optical spectra*. J Phys Chem B, 1997. **101**(40): p. 7885-7891.
127. Alvarez, M.M., Khoury, J.T., Schaaff, T.G., Shafiqullin, M.N., Vezmar, I., and Whetten, R.L., *Optical absorption spectra of nanocrystal gold molecules*. J Phys Chem B, 1997. **101**(19): p. 3706-3712.
128. Fermin, D. and Riley, J., *Charge in colloidal systems*, in *Colloid Science. Principles, methods and applications*, T. Cosgrove, Editor. 2010, John Wiley and Sons, LTD.
129. Lyklema, J., *Solid-Liquid interfaces*, in *Fundamentals of interface and colloid science*. 1995, Academic Press.
130. *Zeta Potential theory*. Zetasizer Nano Series User Manual (Man0317). 2004: Malvern Instruments Ltd.
131. Stoeva, S.I., Smetana, A.B., Sorensen, C.M., and Klabunde, K.J., *Gram-scale synthesis of aqueous gold colloids stabilized by various ligands*. J Colloid Interface Sci, 2007. **309**(1): p. 94-8.
132. Moyano, D.F., Duncan, B., and Rotello, V.M., *Preparation of 2 nm gold nanoparticles for in vitro and in vivo applications*. Methods Mol Biol, 2013. **1025**: p. 3-8.
133. Lee, Y.J., Lee, Y., Oh, D., Chen, T., Ceder, G., and Belcher, A.M., *Biologically activated noble metal alloys at the nanoscale: for lithium ion battery anodes*. Nano letters, 2010. **10**(7): p. 2433-40.
134. Marradi, M., Chiodo, F., Garcia, I., and Penades, S., *Glyconanoparticles as multifunctional and multimodal carbohydrate systems*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(11): p. 4728-4745.
135. Yu, Y., Yao, Q.F., Luo, Z.T., Yuan, X., Lee, J.Y., and Xie, J.P., *Precursor engineering and controlled conversion for the synthesis of monodisperse thiolate-protected metal nanoclusters*. Nanoscale, 2013. **5**(11): p. 4606-4620.
136. Yen, H.J., Hsu, S.H., and Tsai, C.L., *Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes*. Small, 2009. **5**(13): p. 1553-1561.

137. Lewinski, N., Colvin, V., and Drezek, R., *Cytotoxicity of nanoparticles*. *Small*, 2008. **4**(1): p. 26-49.
138. Murphy, C.J., Gole, A.M., Stone, J.W., Sisco, P.N., Alkilany, A.M., Goldsmith, E.C., and Baxter, S.C., *Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging*. *Acc Chem Res*, 2008. **41**(12): p. 1721-30.
139. Moyano, D.F. and Rotello, V.M., *Nano meets biology: structure and function at the nanoparticle interface*. *Langmuir*, 2011. **27**(17): p. 10376-85.
140. Garcia, I., Marradi, M., and Penades, S., *Glyconanoparticles: multifunctional nanomaterials for biomedical applications*. *Nanomedicine (Lond)*, 2010. **5**(5): p. 777-92.
141. Plascencia-Villa, G., Saniger, J.M., Ascencio, J.A., Palomares, L.A., and Ramirez, O.T., *Use of Recombinant Rotavirus VP6 Nanotubes as a Multifunctional Template for the Synthesis of Nanobiomaterials Functionalized With Metals*. *Biotechnol Bioeng*, 2009. **104**(5): p. 871-881.
142. Jayaraman, K., Okamoto, K., Son, S.J., Lockett, C., Gopalani, A.H., Lee, S.B., and English, D.S., *Observing capillarity in hydrophobic silica nanotubes*. *J Am Chem Soc*, 2005. **127**(49): p. 17385-17392.
143. Murphy, C.J., Gole, A.M., Hunyadi, S.E., and Orendorff, C.J., *One-dimensional colloidal gold and silver nanostructures*. *Inorg. Chem.*, 2006. **45**(19): p. 7544-54.
144. Mieszawska, A.J., Jalilian, R., Sumanasekera, G.U., and Zamborini, F.P., *The synthesis and fabrication of one-dimensional nanoscale heterojunctions*. *Small*, 2007. **3**(5): p. 722-756.
145. Scheibel, T., Parthasarathy, R., Sawicki, G., Lin, X.M., Jaeger, H., and Lindquist, S.L., *Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition*. *P Natl Acad Sci USA*, 2003. **100**(8): p. 4527-4532.
146. Reches, M. and Gazit, E., *Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes*. *Science*, 2003. **300**(5619): p. 625-627.
147. Feldheim, D.L. and Eaton, B.E., *Selection of biomolecules capable of mediating the formation of nanocrystals*. *ACS Nano*, 2007. **1**(3): p. 154-159.
148. Lim, J.S., Kim, S.M., Lee, S.Y., Stach, E.A., Culver, J.N., and Harris, M.T., *Quantitative study of Au(III) and Pd(II) ion biosorption on genetically engineered Tobacco mosaic virus*. *J Colloid Interface Sci*, 2010. **342**(2): p. 455-61.
149. Huang, Y.Y., Knowles, T.P.J., and Terentjev, E.M., *Strength of Nanotubes, Filaments, and Nanowires From Sonication-Induced Scission*. *Advanced Materials*, 2009. **21**(38-39): p. 3945-+.
150. Tavera-Davila, L., Liu, H.B., Herrera-Becerra, R., Canizal, G., Balcazar, M., and Ascencio, J.A., *Analysis of Ag Nanoparticles Synthesized by Bioreduction*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2009. **9**(3): p. 1785-1791.

151. Ajayan, P.M. and Marks, L.D., *Quasimelting and phases of small particles*. Phys Rev Lett, 1988. **60**(7): p. 585-587.
152. Brown, S., Sarikaya, M., and Johnson, E., *A genetic analysis of crystal growth*. J Mol Biol, 2000. **299**(3): p. 725-735.
153. Canizal, G., Ascencio, J.A., Gardea-Torresday, J., and Yacaman, M.J., *Multiple twinned gold nanorods grown by bio-reduction techniques*. J Nanopart Res, 2001. **3**(5-6): p. 475-481.
154. Radziuk, D., Grigoriev, D., Zhang, W., Su, D.S., Mohwald, H., and Shchukin, D., *Ultrasound-Assisted Fusion of Preformed Gold Nanoparticles*. J Phys Chem C, 2010. **114**(4): p. 1835-1843.
155. Wang, H., Liu, P., and Xie, H., *An empirical molecular docking study of a di-iron binding protein with iron ions*. J Zhejiang U-Sci C, 2013. **14**(2): p. 118-124.
156. Chen, H., Su, X., Neoh, K.G., and Choe, W.S., *Probing the interaction between peptides and metal oxides using point mutants of a TiO₂-binding peptide*. Langmuir, 2008. **24**(13): p. 6852-7.
157. Nakamura, H., *Roles of electrostatic interaction in proteins*. Q Rev Biophys, 1996. **29**(1): p. 1-90.
158. Bassindale, A.R., Codina-Barrios, A., Frascione, N., and Taylor, P.G., *An improved phage display methodology for inorganic nanoparticle fabrication*. Chem Commun (Camb), 2007(28): p. 2956-8.
159. Belser, K., Vig Slenters, T., Pfumbidzai, C., Upert, G., Mirolo, L., Fromm, K.M., and Wennemers, H., *Silver nanoparticle formation in different sizes induced by peptides identified within split-and-mix libraries*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(20): p. 3661-4.
160. Naik, R.R., Stringer, S.J., Agarwal, G., Jones, S.E., and Stone, M.O., *Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles*. Nat Mater, 2002. **1**(3): p. 169-72.
161. Sano, K., Sasaki, H., and Shiba, K., *Specificity and biomineralization activities of Ti-binding peptide-1 (TBP-1)*. Langmuir, 2005. **21**(7): p. 3090-5.
162. Xie, J., Lee, J.Y., Wang, D.I., and Ting, Y.P., *Silver nanoplates: from biological to biomimetic synthesis*. ACS Nano, 2007. **1**(5): p. 429-39.
163. Naik, R.R., Jones, S.E., Murray, C.J., McAuliffe, J.C., Vaia, R.A., and Stone, M.O., *Peptide templates for nanoparticle synthesis derived from polymerase chain reaction-driven phage display*. Adv Funct Mater, 2004. **14**(1): p. 25-30.
164. Dujardin, E., Peet, C., Stubbs, G., Culver, J.N., and Mann, S., *Organization of metallic nanoparticles using tobacco mosaic virus templates*. Nano Letters, 2003. **3**(3): p. 413-417.
165. Kasyutich, O., Ilari, A., Fiorillo, A., Tatchev, D., Hoell, A., and Ceci, P., *Silver Ion Incorporation and Nanoparticle Formation inside the Cavity of Pyrococcus*

furiosus Ferritin: Structural and Size-Distribution Analyses. J Am Chem Soc, 2010. **132**(10): p. 3621-3627.

166. Aniagyei, S.E., Dufort, C., Kao, C.C., and Dragnea, B., *Self-assembly approaches to nanomaterial encapsulation in viral protein cages*. J Mater Chem, 2008. **18**(32): p. 3763-3774.
167. Charpilienne, A., Lepault, J., Rey, F., and Cohen, J., *Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity*. J Virol, 2002. **76**(15): p. 7822-31.

ANEXO

Strategies for specifically directing metal functionalization of protein nanotubes: constructing protein coated silver nanowires

This article has been downloaded from IOPscience. Please scroll down to see the full text article.

2013 Nanotechnology 24 235602

(<http://iopscience.iop.org/0957-4484/24/23/235602>)

View [the table of contents for this issue](#), or go to the [journal homepage](#) for more

Download details:

IP Address: 132.248.32.3

The article was downloaded on 21/05/2013 at 23:46

Please note that [terms and conditions apply](#).

Strategies for specifically directing metal functionalization of protein nanotubes: constructing protein coated silver nanowires

Liliana Carreño-Fuentes¹, Jorge A Ascencio², Ariosto Medina³, Sergio Aguila⁴, Laura A Palomares¹ and Octavio T Ramírez¹

¹ Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 510-3, CP 62250, Cuernavaca, Morelos, Mexico

² Grupo de Materiales, Instituto de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

³ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio U, C. U., Morelia, Michoacán. C. P. 58000, Mexico

⁴ Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ensenada, Baja California, Mexico

E-mail: tonatiuh@ibt.unam.mx

Received 12 February 2013, in final form 18 April 2013

Published 15 May 2013

Online at stacks.iop.org/Nano/24/235602

Abstract

Biological molecules that self-assemble in the nanoscale range are useful multifunctional materials. Rotavirus VP6 protein self-assembles into tubular structures in the absence of other rotavirus proteins. Here, we present strategies for selectively directing metal functionalization to the lumen of VP6 nanotubes. The specific *in situ* metal reduction in the inner surface of nanotube walls was achieved by the simple modification of a method previously reported to functionalize the nanotube outer surface. Silver nanorods and nanowires as long as 1.5 μm were formed inside the nanotubes by coalescence of nanoparticles. Such one-dimensional structures were longer than others previously obtained using bioscaffolds. The interactions between silver ions and the nanotube were simulated to understand the conditions that allowed nanowire formation. Molecular docking showed that a naturally occurring arrangement of aspartate residues enabled the stabilization of silver ions on the internal surface of the VP6 nanotubes. This is the first time that such a spatial arrangement has been proposed for the nucleation of silver nanoparticles, opening the possibility of using such an array to direct functionalization of other biomolecules. These results demonstrate the natural capabilities of VP6 nanotubes to function as a versatile biotemplate for nanomaterials.

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

The use of nanometric materials for the development and fabrication of innovative electrical and biomedical devices is a challenging task, owing to difficulties of producing building blocks with controlled size and morphology [1]. Such difficulties can be overcome by using biological molecules

that self-assemble in the nanoscale. Various biological molecules have been used successfully as templates for the production of nanomaterials; through them it has been possible to control the formation of nanoparticles, nanowires, nanotubes, and nanocages, among others [2].

Metal nanowires are of great interest since they can enable the electrical connection between different structures

in a device [3]. This and other desirable applications completely depend on the ability to fine tune the morphology and chemical composition of the nanomaterials [1]. The need to control the structure of nanowires has led to the development of diverse strategies for their fabrication. There are many reports that employ biomolecules, such as DNA, proteins, amyloid polymers, viruses, and virus-like particles (VLPs), as scaffolds for the formation of nanowires [4–7]. To date, the most common practice is to coat the surface of the biological scaffold with nanoparticles, whereas the inner spaces of the scaffolds have been less frequently exploited for molding nanowires with specific diameters and lengths. For instance, Knez *et al* [8] used the central channel of tobacco mosaic virus (TMV) for the formation of nickel and cobalt nanowires via activation of the virus inner surface with Pd(II). Likewise, the central channel of the tomato mosaic virus (ToMV) VLP was used by Kobayashi *et al* [9] for reduction and alignment of magnetic nanoparticles by introducing positive charges in the protein scaffold through genetic modification. Furthermore, Tsukamoto *et al* [10] reduced metal nanowires inside TMV through the use of bimetallic precursors. These approaches have proven the possibility of forming nanostructures on different surfaces of the same biotemplate. However, the direction of functionalization to specific sites and ultimately nanowire formation has been possible only when preparatory processes, such as genetic modification or chemical activation of the scaffold surfaces, are completed prior to the reactions. Such processes can be laborious and not always result in wires of high aspect ratio. Selective functionalization of different zones in the biotemplate can produce material with novel properties.

We have previously proposed the use of recombinant rotavirus VP6 as a nanomaterial that can be efficiently functionalized with various metals [6]. VP6 is the major structural protein in the capsid of rotavirus. It is formed by 397 amino acid residues and trimerizes to form an elongated molecule [11]. An important feature of VP6 is that, in the absence of other structural rotavirus proteins, the trimer self-assembles into different types of structures. Depending on the environmental conditions, particularly on pH and ionic strength, VP6 trimers can assemble into spherical particles with a diameter of 75 nm, or into hollow nanotubes with diameters of 45 or 75 nm and lengths of several micrometers [12, 13]. These structures can be used to produce nanomaterials, avoiding the risk and manufacturing complications of using virus particles with genetic material. Another attractive characteristic of VP6 nanotubes is that they can be produced in the insect cell–baculovirus expression system, which yields high levels of recombinant protein, is simple and can be easily scaled if the demand of protein nanostructures increases [14]. In this report we implemented a strategy to specifically direct metal reduction to the inner channel of VP6 nanotubes and shape the growth of silver nanowires by modifying the functionalization process previously proposed for the functionalization of the nanotube outer surface. VP6 has been shown to be an efficient and versatile alternative for the construction of hybrid nanocomposites, allowing the reduction on its outer surface

of silver, gold, platinum, and palladium clusters [15]. In addition, various extents of coverage can be obtained if different reaction conditions are employed [6]. Herein, we introduce an additional step to the methodology previously reported [6] in order to direct functionalization to the inner channel of VP6 nanotubes. Nanowires were produced by facilitating the introduction of reaction precursors through the liquid motion generated by ultrasound and reducing the ions with a mild agent. The resulting silver nanowires had an average diameter of 42 nm and were over 1.5 μm in length, the greatest length that has been obtained using proteins as templates. The platform presented here avoids the need for additional complicated operations prior to functionalization, and offers the possibility of selecting which particular surface of the scaffold, either external or internal, is decorated. The identification of the one-dimensional nanostructures obtained and their structural arrays and elemental composition was performed by transmission electron microscopy techniques. To understand the characteristics of VP6 that allowed the bioreduction and growth of nanostructures inside the inner channel of nanotubes, computational docking between VP6 and the silver and gold ions was performed. The simulation suggested that an array of three aspartate residues in the inner surface of VP6 nanotubes, oriented in a specific spatial pattern with their side chains towards the solvent, was the site of interaction and nucleation of silver. This aspartate array has not been previously reported and can be useful for the rational design of bioscaffolds with specific properties.

2. Experimental methods

2.1. Production of VP6 nanotubes

High Five cells (Invitrogen, CA, USA) were grown in ExCell[®] 405 serum-free medium (Sigma-Aldrich) in shake flasks maintained at 27 °C and stirred at 110 rpm. Upon reaching a cell concentration of 1×10^6 cell ml^{-1} , cultures were infected at a multiplicity of infection of 0.1 pfu/cell with a recombinant baculovirus (AcMNPV, *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus) carrying the gene of rotavirus VP6 (strain SA11) under the *polh* promoter, kindly donated by Dr S López (IBT-UNAM). 96 h postinfection, when cell viability was below 80%, cultures were harvested and the supernatant was recovered to purify VP6 nanotubes as described previously [16]. The purity of VP6 was analyzed by SDS-PAGE. The integrity of nanotubes was analyzed by transmission electron microscopy (TEM) at 80 kV in a Zeiss EM900 microscope after staining with 2% uranyl acetate.

2.2. Synthesis of metallic nanowires

VP6 nanotubes were diafiltered with deionized water prior to functionalization. 1 ml of VP6 nanotubes, with a final concentration of 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, was transferred to a 1.5 ml conical tube, then AgNO_3 , $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ or K_2PdCl_4 solutions in deionized water were added in three cycles of sonication, as reported previously [10], until a final concentration of 0.5–0.75 mM was reached. VP6 nanotubes

and metallic ions were allowed to interact for 3 h in the dark. Sodium borohydride or citric acid was added before each of three additional sonication cycles to a final concentration of 0.5–0.75 mM or 2–3.0 mM, respectively. After 12 h of reaction, functionalized nanotubes were washed with deionized water. For external functionalization we followed the procedure described previously [6].

2.3. Characterization of nanoparticles and nanowires

Nanocomposites were observed in a Zeiss EM900 transmission electron microscope operating at 80 kV or a JEOL JEM-1011 transmission electron microscope operating at 120 kV. Elemental composition analysis was performed on a Phillips Tecnai F20 microscope, operating at 200 kV, through high angle annular dark field scanning transmission electron microscopy (HAADF-STEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS) techniques. Structure analysis was carried out by high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) in the Phillips Tecnai F20 microscope. The sizes of nanostructures were measured in TEM images using ImageJ 1.44o software (National Institutes of Health, USA).

2.4. Computational aspects

2.4.1. Preparation of protein. For *in silico* simulations, the VP6 trimer was modeled from the structure reported by Mathieu *et al* [11], PDB entry 1QHD, in PyMOL 1.2r1 (Schrödinger, USA), and optimized in the YASARA server to reach a state of equilibrium [17]. To simulate experimental conditions, the protonation state of residues at pH of 5 and 7 was calculated using the PDB2PQR web server [18]. The two VP6 trimer assembly was modeled in PyMOL using PDB entry 3GZU [19] obtained from the VIPERdb server, removing the inner VP2 protein layer.

2.4.2. Quantum mechanics calculation of ligands. The ligands used for docking were Ag^+ and $[\text{AuCl}_4]^-$. Ligands were optimized at the b3lyp/lacv3p**++ level of theory using the Jaguar program (Schrödinger, USA). The lacv3p**++ basis set is a combination of the 6-311G**++ basis set and lanl2tz effective core basis set [20].

2.4.3. Binding site prediction. Docking of ligand–receptor (VP6–metal salts) was studied using the AutoDock 4.0 package [21, 22], embedding the target protein in a grid box and determining the potential interaction sites through the use of a semi-empirical free energy force field free energy with a Lamarckian genetic algorithm. Ligand and receptor atoms are represented by heavy atoms and polar hydrogen atoms. The maximum grid box size allowed by the software with a grid spacing of 0.375 Å was set for covering the entire bottom of the trimer. Default program parameters were used, employing the maximum number of evaluations, with a population size of 150 and 50 GA runs. The final structures were clustered and ranked according to the AutoDock scoring function. The metal to protein binding constant was calculated as the inverse of the K_i obtained from the docking results.

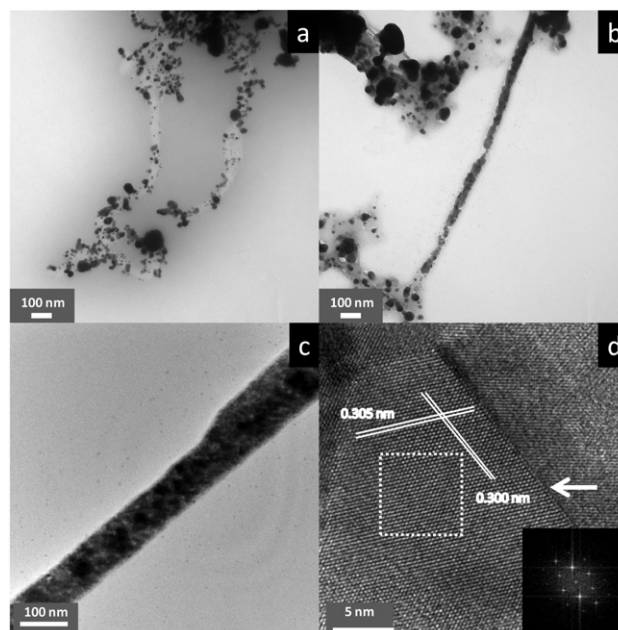


Figure 1. Silver nanostructure formed in VP6 nanotubes by different reducing agents. (a) Sodium borohydride, (b), (c) citric acid, (d) HRTEM and FFT (of the selected area) images of a silver nanowire produced with citric acid showing an FCC structure. Electrodense structures correspond to the synthesized metallic composites as no heavy metal staining was applied for protein visualization under TEM.

3. Results and discussion

3.1. Formation of metallic nanostructures inside VP6 nanotubes

In order to investigate the capacity of recombinant VP6 nanotubes to allow the formation of silver nanostructures in their lumen, we tested AgNO_3 as metallic precursor with two different reductants: sodium borohydride and citric acid. A VP6 nanotube suspension was sonicated in three cycles in the presence of the silver salt with the intention of inducing the entry of the metal ions to the lumen of nanotubes. The reaction was stored for three hours in the dark to allow the interaction between VP6 and the metal ions. Afterwards, three more sonication cycles were performed with the addition of the chosen reductant at the beginning of each cycle.

Each reducing agent led to the formation of different nanostructures in VP6. When sodium borohydride was used, an immediate change in the color of the reaction mixture occurred, changing from transparent to gray and followed by the precipitation of particles. Observation of the obtained structures by TEM (figure 1(a)) showed the formation of nanoparticles in the external wall of VP6 nanotubes, but no nanoparticles inside nanotubes were detected. Formation of metallic nanoparticles on biological assemblies, such as proteins, initiates with the binding and stabilization of metallic ions on amino acid residues, followed by their reduction upon addition of reducing agents. We hypothesized that the addition of the strong reductant sodium borohydride resulted in immediate metal reduction and formation of silver

nanoparticles before sonication, not allowing the reductant to reach the lumen of the tube, leaving the stabilized silver ions inside the VP6 channel in their ionic form. This can explain why nanoparticles were only observed on the outer surface of the nanotubes (figure 1(a)).

Also, compared with the functionalized nanotubes obtained without sonication [6], fewer nanoparticles were reduced in the surface of VP6, probably because of silver ion detachment from the nanotube surface caused by sonication. To avoid the fast reduction of ions and allow the transport of the reductant into the lumen of VP6 tubes, a weak reducing agent such as citric acid was used instead of sodium borohydride. This resulted in the reduction of silver ions inside the lumen of VP6 nanotubes and the concomitant production of silver nanowires and nanorods (figures 1(b), (c)). The lengths of the obtained nanowires and nanorods ranged from 0.3 to 1.5 μm , the majority of the structures being between 0.4 and 0.5 μm . Such sizes are longer than those previously obtained using other biotemplates, such as TMV [8, 10], M13 [7], or peptide nanotubes [23]. The nanowires and nanorods formed had an average diameter of 42 nm. Such a diameter is close to the expected inner diameter of VP6 nanotubes, 56 nm (calculated from data in [11]). These nanotubes had only a few or no nanoparticles in their external surface, probably because of the release of silver ions during the sonication cycles.

The atomistic array of the synthesized metal structures were analyzed on HRTEM images, confirming that the internal one-dimensional structures were formed by the aggregation of metal nanoparticles, generating a polycrystalline material. Analysis of a selected area (figure 1(d)) by applying fast Fourier transformation (FFT) showed that the atomistic structure was characteristic of a Ag FCC crystal, observed in a [0, 1, 1] orientation associated with the lattice spacing of (111) planes [24]. The HRTEM image showed a series of small domains that denoted a well defined twin (marked with the arrow). This type of defect has been associated with energy strain release during crystal formation [25, 26] and growth of one-dimensional structures [27], a process that is metastable until the lowest energy is reached, which is favored in our case by the VP6 nanotube and its partial flexibility.

Earlier stages of nanowire formation were observed in lower resolution TEM images (figure 2(a)) that showed how nanoparticles grew from the inner wall of a protein nanotube to the free space in its lumen. We hypothesize that silver seeds were stabilized by the residues of the protein, and that coalescence of nanoparticles contributed to nanowire elongation, as identified in the production of metal nanorods by other biosynthetic processes [27].

When functionalization with silver and citric acid was performed without sonication, no nanoparticles were detected in the cavity of VP6 tubes. In this case, nanoparticles were only formed on the outer surface of the VP6 nanotubes, as reported previously [6], indicating that naturally driving forces are not sufficient to lead the precursors inside the channel. Accordingly, it was necessary to apply energy in the form of sonication to achieve the desired transport of precursors, a phenomenon also observed by Tsukamoto

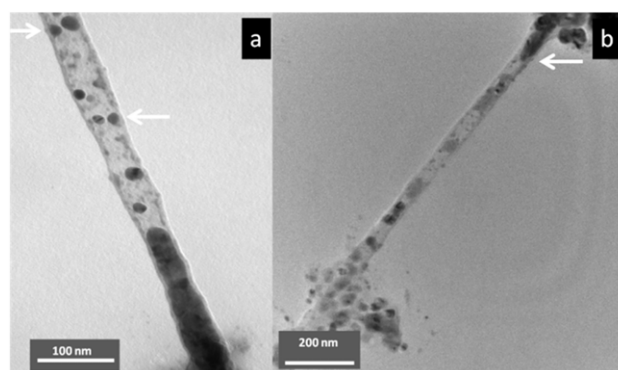


Figure 2. (a) Growth of silver nanoparticles from the internal wall of VP6 nanotubes (arrow). (b) Meniscus produced by the movement of precursors through the VP6 channel.

et al [10]. The formation of a meniscus inside the protein nanotube (figure 2(b)) suggests how precursor flux started in an extreme of the nanotube and continued in a single direction, ultimately leading to the formation of long nanowires inside the nanotube. It was also found that when reductants were excluded from the reaction mixture but keeping the sonication cycles during the process, silver ion reduction was reached, which was observed by the formation of nanoparticles over the outer surface of protein nanotubes (data not shown). It is possible that nanoparticles were formed as a result of sonication, as other groups have reported the formation of nanoparticles by using ultrasound instead of a reducing agent [28]. Nevertheless, the formation of nanowires inside the VP6 nanotubes required the addition of citric acid. Other reductants, such as UV light, may also be suitable for the synthesis of metal nanowires inside VP6 nanotubes, but this remains to be tested.

HAADF-STEM and EDS were employed to determine the elemental composition and the localization of the elements in the produced nanostructures (figure 3).

HAADF-STEM is a technique with very strong compositional sensitivity, in which the intensity in the images is a function of the atomic number and the sample thickness [29]. Such a technique was used here to prove that the nanorods and nanowires produced were localized in the inner channel of VP6 nanotubes. Figure 3(b) shows that the highly intense signal belonging to heavier atoms is surrounded by a material with lower density that corresponds to the protein, which is formed by lighter atoms. EDS analysis was applied, confirming that the nanowires were mainly composed of silver (figure 3(c)). Such results demonstrate that nanorods and nanowires were formed inside the protein nanotubes and that they are Ag metallic structures.

Previous reports have demonstrated the utility of peptides, proteins and viruses as templates for the formation of silver nanowires [23, 30–34]. However, the platform presented here represents an advantageous alternative, as it produced continuous silver nanowires *in situ* without the traditional prerequisite of forming reactive groups in the protein scaffold through genetic or chemical modifications [35]. In addition, nanowires with very high

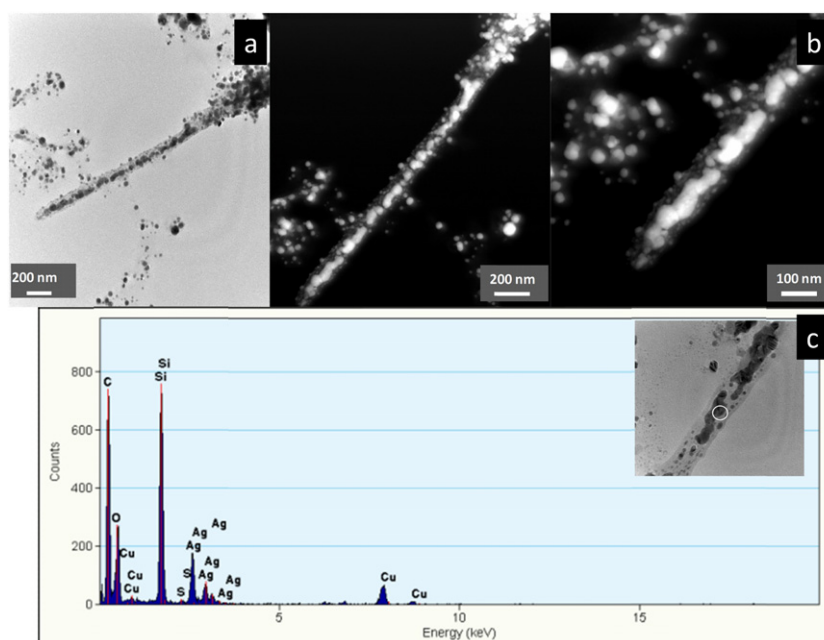


Figure 3. (a) TEM image of a silver nanowire inside a VP6 nanotube. (b) HAADF images showing intensity differences between the denser nanowire and the surrounding less heavy material. (c) EDS spectrum of the selected area shown in the inset.

aspect ratios and lengths as long as $1.5 \mu\text{m}$ were obtained through a simple method that was carried out under ambient conditions in water. Also, the method proposed here allowed the possibility of controlling the site of silver reduction over the VP6 nanotubes simply by introducing an additional step to the previously reported functionalization protocol [6].

The capacity of the internal surface of VP6 to allow nucleation and growth of nanowires of two other metals, gold and palladium, was also tested. Following the aforementioned methodology with sonication, but using trichloroauric acid as metallic precursor and citric acid as reducing agent, no wires were produced inside VP6 nanotubes. In this case, some nanoparticles and rod-like aggregates were only observed on the external wall of the nanotubes, indicating that gold ions were not reduced in the nanotube lumen (figure 4(a)).

However, comparing with the number of nanoparticles formed without sonication (figure 4(a) inset), the number of nanoparticles reduced was smaller, so it is possible that a considerable number of these ions attached to the residues on the outer surface of the protein were removed during the sonication cycles. Also, it is possible that the turbulent flow produced during sonication favored the growth of rod-like aggregates instead of individual spherical clusters, a phenomenon that has been reported previously for gold nanoparticles [36]. When potassium tetrachloropalladate (II) was used as precursor, discrete nanoparticles were reduced in a regular pattern all over the outer surface of VP6 nanotubes (figure 4(b)). Such metallic decoration resembled the patterns of the naked nanotubes observed after negative staining with uranyl acetate, that delineate the structure of the protein tubes by filling their water accessible channels [12]. Accordingly, it can be hypothesized that the Pd(II) ions also entered these channels and were reduced to form small nanoparticles that

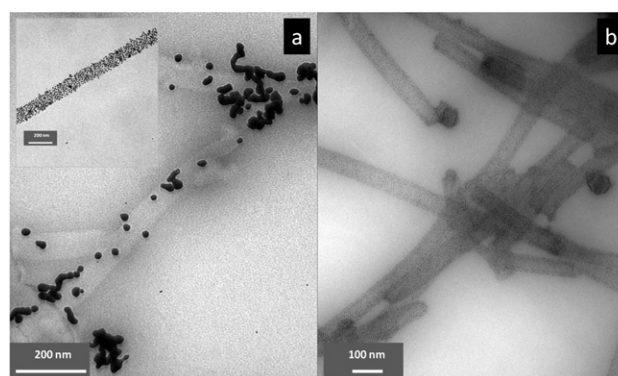


Figure 4. Nanotubes of VP6 with (a) gold and (b) palladium particles formed after reduction with citric acid and sonication. The inset in (a) shows a nanotube functionalized with gold without sonication, showing how nanoparticles covered the entire external surface of the nanotube, in contrast with the results obtained after ultrasound steps.

maintained the architecture of the protein nanotube, allowing its visualization.

3.2. Molecular docking simulation for metallic ions and VP6 nanotubes

To gain an insight into why only silver precursor produced nanowires within the VP6 lumen, molecular simulations were performed comparing the possible interactions of Ag^+ or $[\text{AuCl}_4]^-$ and the bottoms of the VP6 trimers, that are the structural unit of the nanotubes. Docking simulation has allowed chemists to determine the ability of ligands and inhibitors to bind to their receptors, and in this way, for example, to rationally design new drugs [22]. However,

Table 1. Results of docking runs for the metallic ions, Ag^+ and $[\text{AuCl}_4]^-$, with the bottom area of the VP6 trimer ($T = 298.15 \text{ K}$).

Ion	$\Delta G_{\text{bind}}^{\text{a}}$ (kcal mol $^{-1}$)	K_{i}^{b} (mM)	K_{b}^{c} (mM)	Binding residues
Ag^+	-3.65	2.12	0.47	D29
$[\text{AuCl}_4]^-$	-2.2	23.55	0.04	M1, D2, P111, S120, W139

^a ΔG_{bind} = estimated free energy of binding.

^b K_{i} = estimated inhibition constant.

^c $K_{\text{b}} = 1/K_{\text{i}}$.

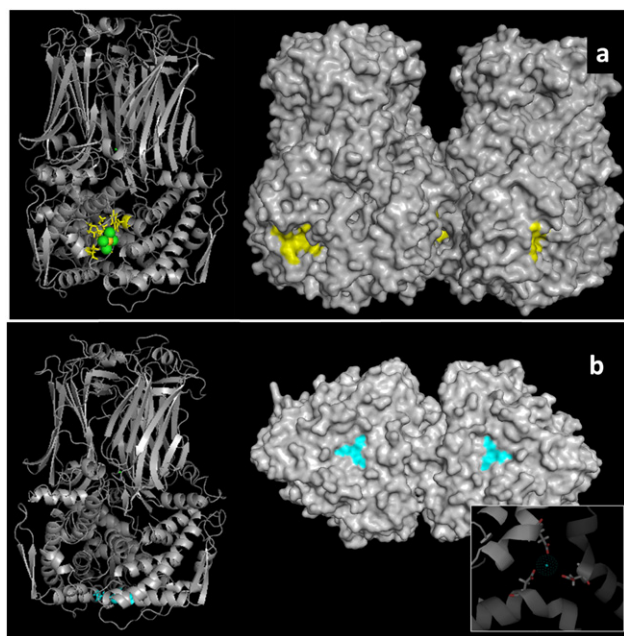


Figure 5. Ligand binding site prediction. VP6 trimer was colored in gray and predicted sites for $[\text{AuCl}_4]^-$ (a) in yellow and cyan for Ag^+ (b) ions. Predicted residues for gold ion binding were located in the intra- and intertrimer regions, making less probable the union of the ion, as observed in experimental results. In contrast, residues for silver binding are located at the bottom of the trimer, which forms the internal surface of the nanotube. Such an exposed area is fully accessible to the solvent and metal ion precursors. Inset in (b): bottom of VP6 showing the aspartic residues stabilizing the silver ion (cyan).

docking simulation has been used by very few research groups to predict the binding site of noble metal ions to a protein [37]. For the simulations performed here, the protonation state of the protein residues and the charges of the silver and tetrachloroaurate ions were considered, as the importance of electrostatic interactions in the binding of metallic ions to biological surfaces has been reported previously [38, 39]. In this sense, two pH values, 5 and 7, were used to calculate the protonation state of protein residues since these values were obtained after addition of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ or AgNO_3 solutions to the reaction mix. According to the simulation results, under the docking conditions tested here, each metal ion was attracted to a different site in the lower part of the trimer, as summarized in table 1.

In the case of gold, the predicted binding residues (figure 5(a)), according to the geometry of the nanotube [11], are situated in a zone with limited or no solvent access located

on the intertrimer region as shown in figure 5(a). Therefore, the entrance and nucleation of $[\text{AuCl}_4]^-$ in such a zone has a low probability.

Also, the estimated ΔG and K_{i} were not as favorable for binding as those obtained for the silver ion. In the case of the silver ion, the only suitable site for Ag^+ nucleation lies on the bottom of the solvent trimer channel and was formed by three aspartate residues, D29, of each monomer (figure 5(b)). These residues are negatively charged, so Ag^+ ions are attracted to this site while negatively charged ions, such as $[\text{AuCl}_4]^-$, are repulsed. In addition, these residues are arranged in such a way that the carboxylate group of their side chains faces towards the solvent, stabilizing the silver ion in the center by the side chains. Such a pattern is similar to the one formed by the H153 of each subunit that coordinate the zinc in the VP6 trimer [11], which is very important for the structural stability of the quaternary structure [40] of the native rotavirus capsid, and similar to other coordination structures of metalloproteins [41].

The simulation results shown here are in accordance with other reports that have demonstrated the capacity of aspartate residues to promote silver nanoparticle nucleation. The binding of silver ions with the carboxylate group of different molecules [42] has been previously documented. In addition, it has been demonstrated that sequestration of positively charged ions by negatively charged amino acid residues allows the nucleation and reduction of silver nanoparticles [43]. Peptides and proteins with aspartic acids in their sequences have allowed the reduction of silver or titanium and formation of nanoparticles in many different studies [44–48]. Xie *et al* observed the important role of aspartate residues in an algal protein to direct the anisotropic growth of silver nanoparticles [49]. Such findings highlight the need for aspartic acid lateral chains for binding with metal surfaces. More recently, a yeast was modified to display aspartic or glutamic hexamer peptides in its surface to allow the formation of a coat of silver nanoparticles [33]. Other groups have shown that a folded configuration of aspartic residues acts as a better reducer than a linear configuration [33]. We propose that the spatial arrangement of aspartate residues found in this work is fundamental for silver ion nucleation. To the best of our knowledge, this is the first work to identify such a structural configuration among aspartic residues and silver ions, which can be exploited for the design and development of future bioscaffolds.

4. Conclusions

The platform proposed here offers the possibility to decide and control the localization (either external or internal

surface) of the metallic reduction over a protein nanotube without large or tedious modifications of the protein scaffold, while allowing the production of nanorods and nanowires with a well controlled diameter. The intrinsic capacity of VP6 nanotubes to nucleate silver ions and form high aspect ratio nanowires in its inner channel was demonstrated. An important advantage of using protein nanotubes is that their flexibility tolerates the release of energy caused by the coalescence of smaller metal particles that occurs during the formation of long one-dimensional nanostructures. Characterization of the mechanical properties of the materials obtained utilizing atomic force microscopy is currently ongoing. Molecular docking simulation predicted an arrangement of aspartic residues that explain the capacity of the VP6 trimer to nucleate silver ions. The selective binding to this arrangement showed that the sequence and charge of amino acids in a protein alone are not sufficient for ion stabilization, but a specific tridimensional configuration is also required. The spatial pattern identified here for the first time can be used for the rational design of other protein scaffolds for silver functionalization. Other strategies for producing metal filled protein structures, such as assembly of proteins over metal cores, are being explored in our research group. The entire platform developed by our group opens the possibility of assembling bi-functionalized structures, exploiting both surfaces of the protein nanotubes, with the same element or even different metals, just by applying the reported methodologies in the same scaffold, forming materials with new and desirable properties with precise controlled structure and composition.

Acknowledgments

The authors thank G Zavala, A N Lecona and V Hernández for their technical assistance, as well as electron microscopy units of IBT-UNAM, INSP and UMSNH. The computer analysis was performed using the cluster of the Instituto de Biotecnología-UNAM. This work was financially supported by SEP-CONACYT 101847. LCF was supported by a doctoral scholarship from CONACYT.

References

- [1] Xia Y N *et al* 2003 One-dimensional nanostructures: synthesis, characterization, and applications *Adv. Mater.* **15** 353–89
- [2] Dickerson M B, Sandhage K H and Naik R R 2008 Protein- and peptide-directed syntheses of inorganic materials *Chem. Rev.* **108** 4935–78
- [3] Scheibel T *et al* 2003 Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100** 4527–32
- [4] Gazit E 2007 Use of biomolecular templates for the fabrication of metal nanowires *FEBS J.* **274** 317–22
- [5] Jones M R *et al* 2011 Templated techniques for the synthesis and assembly of plasmonic nanostructures *Chem. Rev.* **111** 3736–827
- [6] Plascencia-Villa G *et al* 2009 Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals *Biotechnol. Bioeng.* **104** 871–81
- [7] Mao C B *et al* 2004 Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires *Science* **303** 213–7
- [8] Knez M *et al* 2003 Biotemplate synthesis of 3-nm nickel and cobalt nanowires *Nano Lett.* **3** 1079–82
- [9] Kobayashi M *et al* 2010 Fabrication of aligned magnetic nanoparticles using tobamoviruses *Nano Lett.* **10** 773–6
- [10] Tsukamoto R *et al* 2007 Synthesis of CoPt and FePt₃ nanowires using the central channel of tobacco mosaic virus as a biotemplate *Chem. Mater.* **19** 2389–91
- [11] Mathieu M *et al* 2001 Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion *EMBO J.* **20** 1485–97
- [12] Lepault J *et al* 2001 Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus *EMBO J.* **20** 1498–507
- [13] Mena J A, Ramirez O T and Palomares L A 2006 Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system *J. Biotechnol.* **122** 443–52
- [14] Palomares L A, Estrada-Mondaca S and Ramirez O T 2006 Principles and applications of the insect cell-baculovirus expression vector system *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies* ed S S Ozturk (Boca Raton, FL: CRC Press) pp 627–92
- [15] Plascencia-Villa G *et al* 2013 Structural characterization of rotavirus-directed synthesis and assembly of metallic nanoparticle arrays *J. Nanosci. Nanotechnol.* at press
- [16] Plascencia-Villa G *et al* 2011 Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials *J. Chromatogr. B* **879** 1105–11
- [17] Krieger E *et al* 2009 Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8 *Proteins* **77** (Suppl. 9) 114–22
- [18] Dolinsky T J *et al* 2007 PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations *Nucl. Acids Res.* **35** W522–5
- [19] Chen J Z *et al* 2009 Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106** 10644–8
- [20] Hay P J and Wadt W R 1985 Abinitio effective core potentials for molecular calculations—potentials for K to Au including the outermost core orbitals *J. Chem. Phys.* **82** 299–310
- [21] Huey R *et al* 2007 A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation *J. Comput. Chem.* **28** 1145–52
- [22] Morris G M *et al* 1998 Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function *J. Comput. Chem.* **19** 1639–62
- [23] Reches M and Gazit E 2003 Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes *Science* **300** 625–7
- [24] Ascencio J A *et al* 1998 Structure determination of small particles by HREM imaging: theory and experiment *Surf. Sci.* **396** 349–68
- [25] Ajayan P M and Marks L D 1988 Quasimelting and phases of small particles *Phys. Rev. Lett.* **60** 585–7
- [26] Brown S, Sarikaya M and Johnson E 2000 A genetic analysis of crystal growth *J. Mol. Biol.* **299** 725–35
- [27] Canizal G *et al* 2001 Multiple twinned gold nanorods grown by bio-reduction techniques *J. Nanopart. Res.* **3** 475–81
- [28] Shchukin D G, Radziuk D and Mohwald H 2010 Ultrasonic fabrication of metallic nanomaterial and nanoalloys *Annu. Rev. Mater. Res.* **40** 345–62
- [29] Kubel C *et al* 2005 Recent advances in electron tomography: TEM and HAADF-STEM tomography for materials science and semiconductor applications *Microsc. Microanal.* **11** 378–400

- [30] Behrens S *et al* 2004 Silver nanoparticle and nanowire formation by microtubule templates *Chem. Mater.* **16** 3085–90
- [31] Lee S Y *et al* 2005 Improved metal cluster deposition on a genetically engineered tobacco mosaic virus template *Nanotechnology* **16** S435–41
- [32] Malisauskas M, Meskys R and Morozova-Roche L A 2008 Ultrathin silver nanowires produced by amyloid biotemplating *Biotechnol. Prog.* **24** 1166–70
- [33] Nam K T *et al* 2008 Peptide-mediated reduction of silver ions on engineered biological scaffolds *ACS Nano* **2** 1480–6
- [34] Ostrov N and Gazit E 2010 Genetic engineering of biomolecular scaffolds for the fabrication of organic and metallic nanowires *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* **49** 3018–21
- [35] Knez M *et al* 2004 Spatially selective nucleation of metal clusters on the tobacco mosaic virus *Adv. Funct. Mater.* **14** 116–24
- [36] Radziuk D *et al* 2010 Ultrasound-assisted fusion of preformed gold nanoparticles *J. Phys. Chem. C* **114** 1835–43
- [37] Wang H, Liu P and Xie H 2013 An empirical molecular docking study of a di-iron binding protein with iron ions *J. Zhejiang Univ. Sci. C* **14** 118–24
- [38] Chen H B *et al* 2008 Probing the interaction between peptides and metal oxides using point mutants of a TiO₂-binding peptide *Langmuir* **24** 6852–7
- [39] Nakamura H 1996 Roles of electrostatic interaction in proteins *Q. Rev. Biophys.* **29** 1–90
- [40] Erk I *et al* 2003 A zinc ion controls assembly and stability of the major capsid protein of rotavirus *J. Virol.* **77** 3595–601
- [41] DeGrado W F *et al* 1999 De novo design and structural characterization of proteins and metalloproteins *Annu. Rev. Biochem.* **68** 779–819
- [42] Joly S *et al* 2000 Multilayer nanoreactors for metallic and semiconducting particles *Langmuir* **16** 1354–9
- [43] Rafey A *et al* 2011 Growth of Ag-nanoparticles using aspartic acid in aqueous solutions *J. Colloid Interface Sci.* **354** 190–5
- [44] Naik R R *et al* 2002 Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles *Nature Mater.* **1** 169–72
- [45] Naik R R *et al* 2004 Peptide templates for nanoparticle synthesis derived from polymerase chain reaction-driven phage display *Adv. Funct. Mater.* **14** 25–30
- [46] Bassindale A R *et al* 2007 An improved phage display methodology for inorganic nanoparticle fabrication *Chem. Commun.* 2956–8
- [47] Sano K I, Sasaki H and Shiba K 2005 Specificity and biomineralization activities of Ti-binding peptide-1 (TBP-1) *Langmuir* **21** 3090–5
- [48] Belser K *et al* 2009 Silver nanoparticle formation in different sizes induced by peptides identified within split-and-mix libraries *Angew. Chem. Int. Edn* **48** 3661–4
- [49] Xie J P *et al* 2007 Silver nanoplates: from biological to biomimetic synthesis *ACS Nano* **1** 429–39