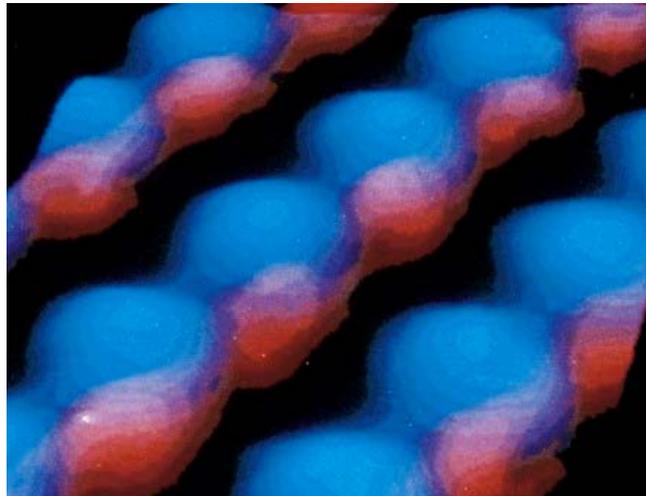


**Microscopía de Barrido de Tunelaje de las Proteínas Virales  
Depositadas sobre las Superficies de Grafito Pírolítico Altamente  
Ordenado**

Por:  
Andrés Rodríguez Galván

Vladimir Basiuk Evdokimenko  
(Tutor Principal)



2007 - 2008



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a mi director de tesis Dr. Vladimir Basiuk Evdokimenko por sus enseñanzas, y a los sinodales Biol. Héctor Barrera Escorcía, Dra. Laura Colín Bareanque, Dr. Eduardo Barrera Escorcía y Dr. Ricardo Mejía Zepeda por sus comentarios.

Agradecemos a los Drs. Ramírez, Palomares y Mena por el material que nos proporcionaron muy amablemente.

Agradezco a la UNAM por permitirme ser parte de los proyectos DGAPA-IN100303 y DGAPA-IN100107.

Gracias al ICN por los apoyos prestados para la realización de la presente tesis.

## *A la memoria de mi abuela MARTINA y mi tía LUPITA*

Un agradecimiento muy especial para *Vladimir Basiuk* por permitirme haber trabajado en su equipo, por su paciencia, y por los *Bichos y demás parientes*.

A mi papá y mamá que me han dado todo su apoyo, a mi hermano y hermanas que han estado conmigo todo su tiempo.

Estoy seguro que este trabajo mejoró mucho gracias a las sugerencias de Alejandro Heredia-Barbero, a quien le debo mi primera asistencia a un congreso.

Agradezco a Flavio Contreras por sus múltiples comentarios que mejoraron la redacción.

A los amigos: Susana Carolina, Virginia López, Janina Aguilar, Martín Gonzáles, Marcos Mora, Miguel Herrera, Edgar Gómez, Martín Díaz, Adriana, Neli, Sharon, Atziri, Alberto Barajas, Anaid, Julieta, Hugo, Fernando Peralta, Olinca, Jesús, Lupita Guerrero, Joel Demetrio, Areli, Adriana, Fernando Ramírez, Alejandro Arzate, Hiram Fernando, Oscar Amelines, Nora Icela, y en especial a Lizbet Hernández y a la *via lactea*.

A mis excelentes profesores Martín y Alina.



# Índice

## 1. Introducción

## 2. Microscopio de barrido de efecto túnel (STM)

- 2.1 Efecto de túnel
- 2.2 Principio de operación del STM
- 2.3 Piezoelectricidad
- 2.4 Modos de operación
- 2.5 Imágenes
- 2.6 Puntas
- 2.7 Aplicaciones

## 3. STM en sistemas biológicos

- 3.1 Primeros experimentos
- 3.2 STM de ADN
- 3.3 STM de proteínas
- 3.4 STM de alta resolución

## 4. Rotavirus

- 4.1 Estructura de la capsida
- 4.2 Proteína VP6
- 4.3 Ensamblaje de las proteínas de la capsida de los rotavirus
- 4.4 Polimorfismo de la proteína VP6 (bionanoestructuras tubulares y esféricas)
- 4.5 Estructura de los tubos y esferas de la proteína VP6

## 5. Objetivos del trabajo

## 6. Materiales y Métodos

## 7. Resultados y Discusión

- 7.1 Caracterización de la superficie del grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG)
- 7.2 Optimización de las muestras
- 7.3 Imágenes de proteínas depositadas en las superficies de HOPG
  - 7.3.1 Nanoesferas de proteínas vírales
  - 7.3.2 Nanotubos de proteínas vírales

## 8. Conclusiones

## 9. Bibliografía

## 10. Anexos

## Resumen

Las aplicaciones de las proteínas virales no se restringen a las ciencias biológicas. Por propiedades como auto-ensamblaje, intrínseca simetría, el vasto repertorio de formas que muestran, y por su ensamblaje específico y selectivo bajo condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, fuerza iónica) establecidas han irrumpido como materiales candidatos para diversas aplicaciones en bionanotecnología. El avance en la generación de nuevos materiales requiere estudios en la detección, identificación y caracterización de bionanoestructuras que puedan ser usadas para la fabricación de nuevos materiales. Por tal motivo en este trabajo se empleó la **microscopia de barrido de efecto túnel (STM)**, por ser una herramienta ampliamente usada para estudiar muestras biológicas a nivel molecular (y en ocasiones atómico), para el estudio de las bionanoestructuras esféricas y tubulares de la proteína VP6 depositadas en las superficies atómicamente planas de grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG). Los resultados obtenidos mostraron que la microscopia de STM en condiciones ambientales es capaz de resolver las nanoestructuras orgánicas tubulares y esféricas de la proteína VP6, así como, sus bloques de construcción (trímeros de VP6). Con las imágenes obtenidas se demostró que el grafito no cuenta con defectos que en su morfología pueden confundirse con las bionanoestructuras, pero sí para los nanotubos. Los nanotubos orgánicos pueden diferenciarse de los de carbono, observando los efectos que se producen en la imagen al variar el voltaje y la corriente. De igual forma se mostró que las nanoestructuras no tienen un arreglo definido y que la absorción es más probable que ocurra en el plano basal hidrofóbico. Este trabajo es de gran valor ya que sirve como referencia para estudios posteriores de nuevos materiales híbridos “proteínas—nanotubos de carbono”.

Palabras clave: Microscopia de barrido de efecto túnel (STM), proteínas virales, bionanoestructuras esféricas y tubulares, grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG).

## 1. Introducción

Los sistemas biológicos son altamente complejos, las células vivas continuamente toman decisiones como vivir o morir, diferenciarse o proliferar, permanecer o migrar, y estas son ejecutadas por moléculas como ADN y proteínas en redes bioquímicas. Así, las biomoléculas interactúan química y físicamente unas con otras, como en las conocidas redes que regulan la síntesis de proteínas (*Wolde y Tanase-Nicola, 2006*). En este proceso el movimiento e interacción de las moléculas en las células son extremadamente complejos, pero siempre orquestados para resultar en un orden, típico de los sistemas biológicos. Por otro lado, esta dinámica puede ser desequilibrada por actores exógenos como los virus (ver Figura 1), los cuales son capaces de destruir la dinámica celular de los organismos más complejos. Cuando el virus infecta a una célula se apropia de la maquinaria de expresión génica, y sólo se sintetizan las proteínas que conformarán los nuevos viriones, dando un resultado catastrófico para la célula huésped (*Grenfell et al., 2006*).

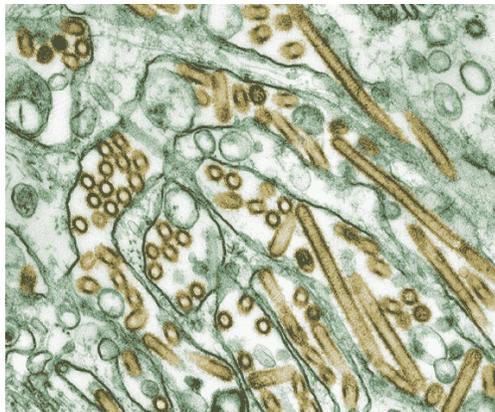


Figura 1. Imagen coloreada de TEM del Virus de la influenza (color oro) en células de perro (contornos en color verde) (*Grenfell et al., 2006*).

Los virus son actores básicos en el drama de la vida del hombre. A pesar de la mejora en los tratamientos farmacológicos la población sigue siendo susceptible a sufrir enfermedades virales como sarampión, influenza, VIH, entre otras. El conocimiento molecular de las proteínas y los factores que participan en el proceso de ensamblaje de la capsida de los virus pueden conducirse a través de dos caminos i) el intrínseco, que llevaría a una búsqueda y generación racional de drogas eficaces (*Hung et al., 2007*), y ii) el extrínseco, donde las cápsidas *per se* y partículas virales (VLPs) han irrumpido como materiales candidatos para diversas aplicaciones en bionanotecnología (*Knez et al., 2006; Petty et al., 2007*). En la actualidad, las partículas virales se emplean en la fabricación de materiales a escala nanométrica (*Nam et al., 2006*) debido a su intrínseca simetría, al vasto repertorio de formas que muestran y por su ensamble

específico y selectivo bajo condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, fuerza iónica) establecidas (Ryadnov y Woolfson, 2004).

Haciendo uso de las habilidades de la tecnología del ARN recombinante se pueden obtener bionanoestructuras proteicas tubulares y esféricas (Mena et al., 2006). Bionanoestructuras que ofrecen superficies internas y externas que pueden ser modificadas (Martin y Kohli, 2003). La mayoría de los estudios se han enfocado en el empleo de la superficie de la cápside como nucleador de nanopartículas, como por ejemplo la cápside del virus mosaico de brome (VMB) se ha empleado como nucleador de nanopartículas de oro o CdSe/ZnS, generando materiales híbridos que tendrán aplicación en biomedicina (ver Figura 2; Dixit et al., 2006; Chen et al., 2006). Sin embargo, una de las aplicaciones más interesantes es la posibilidad de fabricar nanoalambres usando nanotubos de proteína como plantillas para metalización, donde una vez removida la plantilla orgánica se obtiene un alambre conductivo inmovilizado en una superficie (Shuguang, 2003; Chen et al., 2006). Knez y colaboradores en el 2006 decoraron la superficie externa del virus de mosaico del tabaco (VMT) con capas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ó  $\text{TiO}_2$  (Figura 2). Otros investigadores han sintetizado y ensamblado nanoalambres de óxido de cobalto, oro / óxido de cobalto, buscando desarrollar baterías mas pequeñas y flexibles (Nam et al., 2006).

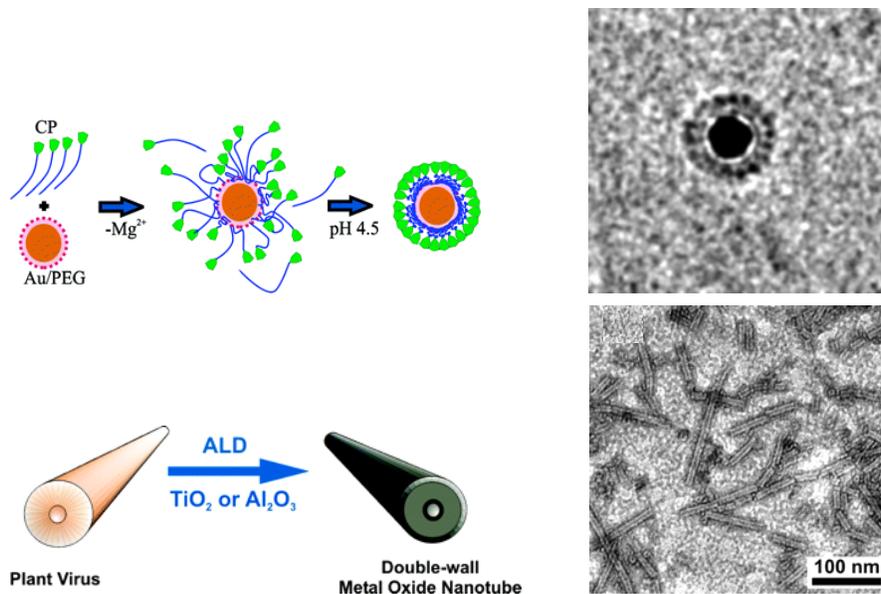


Figura 2. Las partículas virales han surgido como candidatos para aplicaciones en bionanotecnología. En la Imagen superior se esquematiza un mecanismo propuesto para nucleación de nanopartículas de oro con VLP de VMB y su microfotografía electrónica, el diámetro de la estructura es de 12 nm, las nanopartículas de oro son evidentes (disco negro) (Chen et al., 2006). Imagen inferior, esquematiza la decoración de la superficie exterior del VMT con películas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  o  $\text{TiO}_2$  y su imagen TEM después de la decoración (Knez et al., 2006).

El avance en la generación de nuevos materiales requiere estudios en la detección, identificación (*Brehm et al., 2006*) y caracterización de bionanoestructuras que puedan ser usadas para la fabricación de nuevos materiales. Por tal motivo este trabajo se enfoca en la caracterización del arreglo y el estudio morfológico sobre la superficies de grafito pirolítico altamente ordenado de las bionanoestructuras tubulares y esféricas de la proteína VP6. Para la caracterización empleamos la **microscopia de barrido de efecto túnel** porque es una herramienta ampliamente usada para estudiar muestras biológicas a nivel molecular y en ocasiones atómico, y que permite observar directamente las nanoestructuras con una resolución superior a otras técnicas de microscopia como la electrónica y de transmisión (*Cap. 1 Bai, 2000*).

El avance en la generación de nuevos materiales requiere estudios en la detección, identificación (*Brehm et al., 2006*) y caracterización de bionanoestructuras que puedan ser usadas para la fabricación de nuevos materiales. Por tal motivo este trabajo se enfoca en la caracterización del arreglo y el estudio morfológico sobre la superficies de grafito pirolítico altamente ordenado de las bionanoestructuras tubulares y esféricas de la proteína VP6. Para la caracterización empleamos la **microscopía de barrido de efecto túnel** porque es una herramienta ampliamente usada para estudiar muestras biológicas a nivel molecular y en ocasiones atómico, y que permite observar directamente las nanoestructuras con una resolución superior a otras técnicas de microscopía como la electrónica y de transmisión (*Cap. 1 Bai, 2000*).

## 2. Microscopio de barrido de efecto túnel (STM)

La búsqueda de mejores técnicas para la caracterización de superficies propició la invención del microscopio de barrido de efecto túnel (STM). Desarrollado en los años 80 y alcanzando su madurez casi 10 años después, el STM es el producto del trabajo de los Drs. Gerald Binning (1947-), Heinrich Rohrer (1933-), Ernst Ruska (1906-1988) y Max Knoll (1897-1969; *Barbero, 2006*). En 1986, se les otorgó el premio Nobel de Física por la invención de los microscopios electrónico y de barrido de efecto túnel (ver Figura 3).

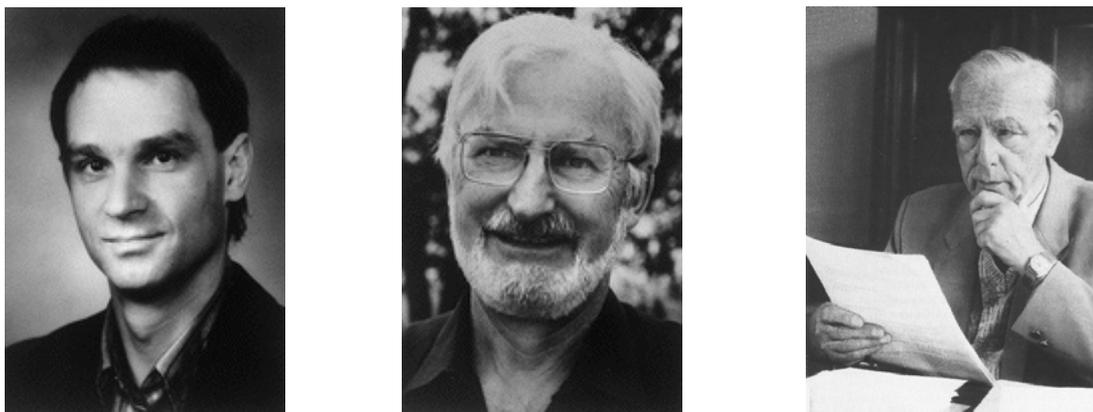


Figura 3. Fotografía de Gerald Binning (izquierda), Heinrich Rohrer (centro) inventores del STM y Ernst Ruska (derecha) inventor del microscopio electrónico ([http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1986/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/))

El STM puede alcanzar una resolución lateral y vertical de 0.1 nm y 0.01 nm, respectivamente. Esto hace posible detectar el arreglo de los átomos (*Venema, 2006*) de la superficie de los materiales conductores. Permite estudiar las propiedades físicas y químicas relacionadas con el comportamiento de los electrones de la superficie en espacio real (*Cap. 1 Bai, 2000*). De igual forma, el STM hace posible apreciar una nueva realidad en la que las moléculas pueden ser individualmente dirigidas, ordenadas y ensambladas una a una. Finalmente, permite estudiar todo tipo de propiedades a nanoescala (*Wood, 2006*). Una de sus principales características que lo distingue de las demás técnicas convencionales de microscopía (con excepción del microscopio de fuerza atómica, AFM) es que el STM puede desempeñarse en diferentes ambientes, es decir, puede trabajar en alto y ultra alto vacío, aire; a bajas o altas temperaturas o en condiciones ambientales de temperatura y presión. De igual forma, se tiene reportado que puede trabajar en medios acuosos (*Cap. 1 Bai, 2000; Tao et al., 2000*). El principio del funcionamiento del STM es complicado, y se basa en el fenómeno físico del “**efecto túnel**”.

## 2.1 Efecto de túnel

Este fenómeno físico relaciona la capacidad que tienen las partículas subatómicas como los electrones, para pasar, en ciertas circunstancias, a través de barreras de energía aparentemente impenetrables (ver Figura 4). Imaginemos que estamos en un juego de tenis. Supongamos que colocamos una red muy resistente entre los jugadores. En esta cancha podemos llevar la pelota de un lado a otro sin mucho esfuerzo y si intentamos ponerla encima de la red necesariamente caerá de un lado u otro de la cancha. Así, el efecto túnel es como si un jugador, con la fuerza normal con la que ejecuta su disparo, pudiera hacer que la bola atravesara la red. Aun en contra de nuestro sentido común, una naturaleza intrínseca del mundo de las partículas subatómicas. Si la barrera de energía (red) es lo suficientemente fuerte, un electrón (bola) disparado a ella se limitará a rebotar. Sin embargo, a diferencia de una pelota de tenis, un electrón parece reaccionar a cuantas limitaciones que supone el obstáculo al cual se acerca y sobre todo, lo supera. Este efecto tiene consecuencias mensurables en el plano de la vida diaria. Por ejemplo puede ser utilizado para amplificar ciertas señales electrónicas, es causante también de la radioactividad nuclear (el núcleo actúa como barrera que aprisiona a las partículas en su interior pero que estas logran escapar mediante el efecto túnel).

La fusión nuclear que se produce en los núcleos de los átomos de hidrógeno generando la energía en el interior del sol también es explicada a través del efecto túnel. Este fenómeno responde a una ecuación exponencial. Esto quiere decir que pequeños cambios en uno de sus parámetros generará un cambio en la respuesta que es altamente detectable. Así, la corriente que se genera a partir de la interacción de estas dos partes (punta-muestra), y que es denominada efecto túnel, tiene dos variables a medir: la modificación de la distancia de interacción, y el flujo de corriente. Resulta que la corriente de electrones se modifica enormemente al haber cambios muy pequeños en la distancia punta-muestra. Debido a que la corriente en este túnel es una función exponencial de la distancia de separación, entonces un cambio en el 10% de la distancia (si la separación es de 10 Å el 10% es 1 Å) generará un cambio de un orden de magnitud (*Heredia-Barbero, 2006*).

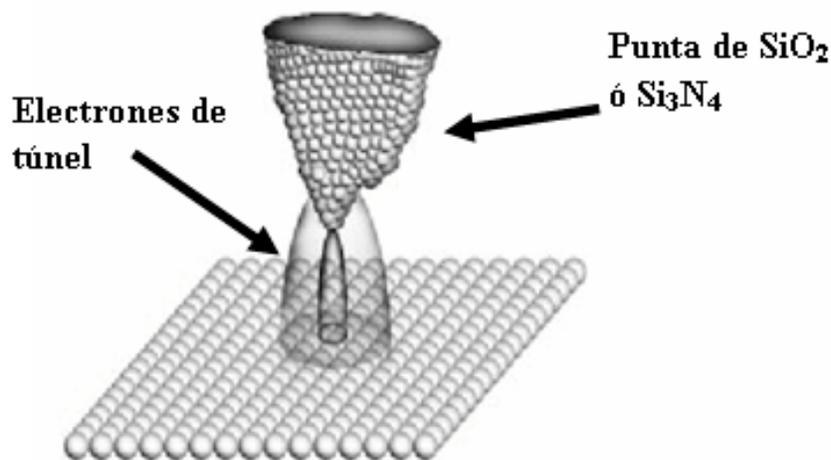


Figura 4. Cuando la punta de nuestro microscopio es conductora de electrones, como un cable de cobre, y la muestra también, electrones de la muestra o de la punta pueden atravesar una barrera de energía y salen de los átomos, generando una corriente (Heredia-Barbero, 2006).

## 2.2 Principio de operación de STM

El funcionamiento del STM es algo complicado. Para entenderlo, de manera mas sencilla, puede colocar diferentes objetos sobre una superficie, el dedo índice de forma vertical con respecto a la superficie manteniendo una distancia (dedo-superficie) de 1 a 2 cm. Desplazemos el dedo horizontalmente en dirección de los objetos; al encontrarlos intentemos evadirlos tratando de mantener la distancia (1 a 2 cm) con respecto a la superficie de los objetos. Así, en el STM, la punta al igual que el dedo, tiene que modular la distancia (punta-superficie) con respecto a las variaciones que encuentra al desplazarse sobre la superficie de la muestra tratando siempre de conservar la misma distancia ( $10\text{--}0.2 \text{ \AA}$ ) punta-muestra,  $s$  (Figura 5).

El STM se basa en el control de la corriente de túnel,  $J_T$ , que atraviesa la barrera de energía entre la superficie de la muestra y la punta (Figura 5). Cuando se realiza un barrido a través de una barrera de túnel plana y de altura constante, una masa de electrones libres podrá fluir a través de la muestra generando una corriente de túnel constante. Sin embargo si hay un cambio en la altura de la barrera, como un pequeño escalón de 2 a  $5 \text{ \AA}$  de altura, la corriente de túnel variará, generando un cambio de hasta tres ordenes de magnitud. El cambio en este parámetro es registrado y un sistema de realimentación es usado para reajustar la posición,  $z$ , para mantener una función de trabajo constante (voltaje), que en

consecuencia mantendrá la corriente del túnel y la distancia (punta-muestra) constante (Binnig *et al.*, 1982).

Las piezas conductoras  $P_x$  y  $P_y$  desplazan la punta a través de la superficie del material. La unidad de control CU aplica el voltaje apropiado  $V_p$  a la pieza conductora  $P_z$  para mantener una corriente de túnel  $J_T$  y un voltaje de túnel  $V_T$  constante. Los voltajes aplicados a las piezas conductoras  $P_x$ ,  $P_y$ , y  $P_z$  son traducidos para producir la topografía de la superficie del material (Binnig *et al.*, 1982).

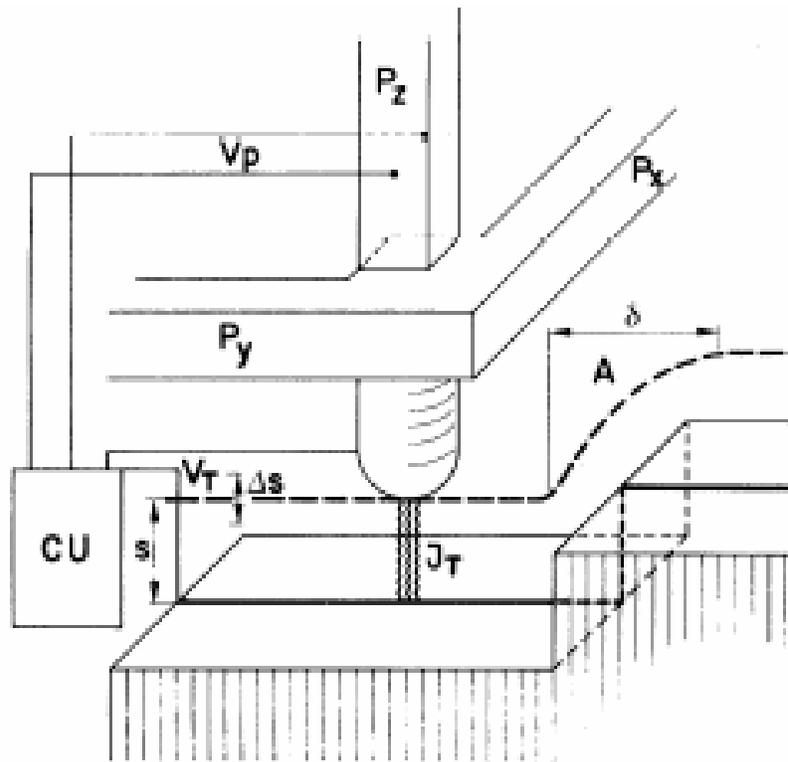


Figura 5. Esquema del principio de operación del microscopio de efecto de túnel. Las líneas punteadas indican el desplazamiento de la punta en dirección de  $A$  donde hay una variación de altura de la barrera (a través de un escalón; Binnig *et al.*, 1982). Las abreviaturas indican: corriente de túnel ( $J_T$ ), piezas conductoras que desplazan la punta en las diferentes direcciones ( $P_x$ ,  $P_y$ , y  $P_z$ ), unidad de control (CU), voltaje apropiado ( $V_p$ ), distancia punta-superficie ( $s$ ).

### 2.3 Piezoelectricidad

El descubrimiento por los hermanos Paul Jacques y Pierre Curie de la piezoelectricidad se dio alrededor del año 1880. Gracias a este fenómeno, se pueden hacer circuitos digitales. Ellos descubrieron que algunos cristales, (e.j. cuarzo) generan una carga eléctrica cuando se les aplica una presión. Inversamente, se obtienen variaciones mecánicas al aplicar oscilaciones eléctricas a estos cristales. El efecto piezoeléctrico permaneció como una curiosidad de laboratorio por más de tres décadas. Una de las aplicaciones masivas de estos materiales fue en la construcción de sonares para detectar submarinos durante la primera guerra mundial por el año de 1917 por P. Langevin en Francia. Estos sólidos deben sus propiedades a que cuando se les aplica una fuerza, los electrones de los átomos modifican sus nubes electrónicas haciendo que generen un potencial en el sólido. Al contrario, si se le aplica un potencial al sólido, modifican su estructura generando cambios en la geometría de la muestra (Heredia-Barbero, 2006).

La alta resolución del STM se debe en gran medida a los materiales piezoeléctricos (Figura 6). Este tipo de materiales se ocupan para desplazar la punta a través de la superficie de la muestra ( $x, y$ ) y para controlar la separación punta-muestra ( $z$ ). El STM original, inventado por Binnig y Rohrer, contaba con tres barras piezoeléctricas ortogonales fijadas a un soporte. El movimiento independiente de las tres barras lo realizaban en las tres direcciones ( $x, y, z$ ). Sin embargo, rápidamente fue sustituido por un simple tubo que en la actualidad es el sistema más empleado por diversas ventajas (Bhikkaji *et al.*, *en prensa*). Los piezoeléctricos por lo general son de titanato de zirconio [ $\text{Pb}(\text{Ti}, \text{Zr})\text{O}_3$ ] o de titanato de bario, y se manufacturan de distintas formas como en cintas, placas y tubos.

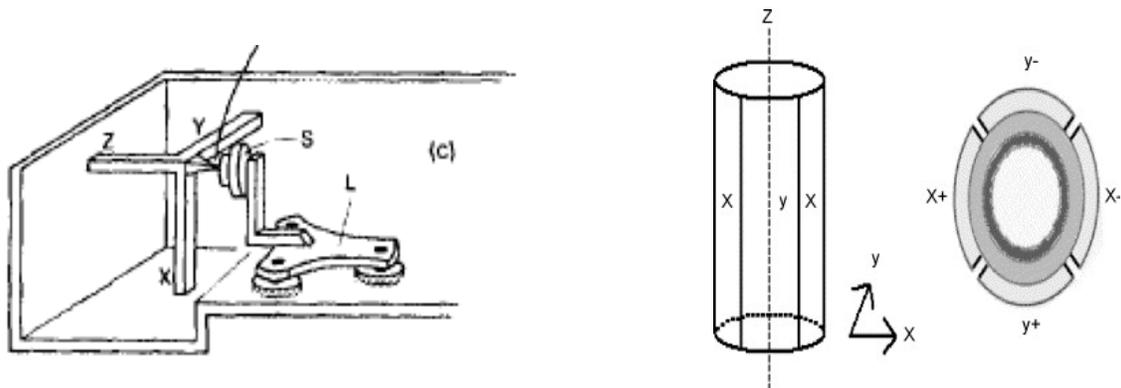


Figura 6. Esquema del primer escáner empleado por el primer STM (izquierda), que rápidamente fue sustituido por un simple tubo (derecha; Cap. 1 Bai, 2000; Bhikkaji *et al.*, *en prensa*).

## 2. 4 Modos de operación

La microscopía de barrido de tunelaje puede operar en distintas modalidades:

a) *Corriente constante.*- Cuando la punta y la superficie están lo bastante cerca, genera un espacio tan estrecho ( $10\text{--}0.2 \text{ \AA}$ ) que al aplicar un voltaje apropiado ( $2\text{--}2000 \text{ mV}$ ) la corriente de túnel  $J_T$  (de igual forma en el texto se emplea el símbolo  $I$ ) puede fluir y ser monitoreada (Figura 7). La punta se desplaza a través de la superficie realizando el barrido, y la corriente  $J_T$  es sensible a los cambios de la barrera. Un sistema de realimentación ajusta la altura del piezo  $P_z$  para tratar de mantener una corriente constante, la cual varía exponencialmente con respecto al espacio,  $s$ , entre la punta y la superficie, permitiendo mantener constante la distancia. La imagen consiste en un mapa de  $z(x-y)$ , la altura de  $z$  se grafica contra la posición lateral de  $x$ , y la imagen se construye por los múltiples desplazamientos en  $y$ , dirección .

b) *Altura constante.*- En este modo de operación se mantiene a la altura y al voltaje constantes. La corriente de túnel es monitoreada (Figura 7). En este caso, la red de realimentación responde lo bastante rápido para mantener la corriente constante, y las variaciones en la corriente debido al paso de la punta sobre las características de la superficie como los átomos, son graficadas contra la posición del barrido. La imagen consiste en un mapa de  $J_T(x-y)$ , las variaciones de  $J_T$  se grafican contra  $x$ , y los múltiples desplazamientos laterales en  $y$ .

En el modo de altura constante es también posible mantener la altura y la corriente constantes, donde el voltaje es monitoreado. En este caso la realimentación ocurre para mantener un voltaje constante. Las rápidas variaciones en el voltaje son debido al paso de la punta sobre las características de la superficie como átomos, y lo que se grafica es el voltaje contra la posición en  $x, y$ .

Ambos modos de operación poseen sus ventajas. Históricamente el modo de corriente constante fue el primero en desarrollarse, y se usa en superficies que no son atómicamente planas, generalmente en topografías entre  $1.0 \text{ nm}$ . El modo de altura constante es más apropiado para superficies planas ya que únicamente la corriente o voltaje responden a las características de la superficie y no el piezo  $z$ , haciendo que su velocidad de barrido sea mucho más rápida. La desventaja en altura constante es que requiere la calibración de la altura del piezo  $z$ .

La velocidad de barrido es importante ya que podría permitir el estudio de procesos dinámicos en superficies, reducir el tiempo de recolección de datos, y la distorsión en las imágenes causada por la

interacción (arrastre o colisión) de la punta con la muestra, suprimiendo o reduciendo la histéresis y variaciones termales (Hansman y Tersoff, 1986).

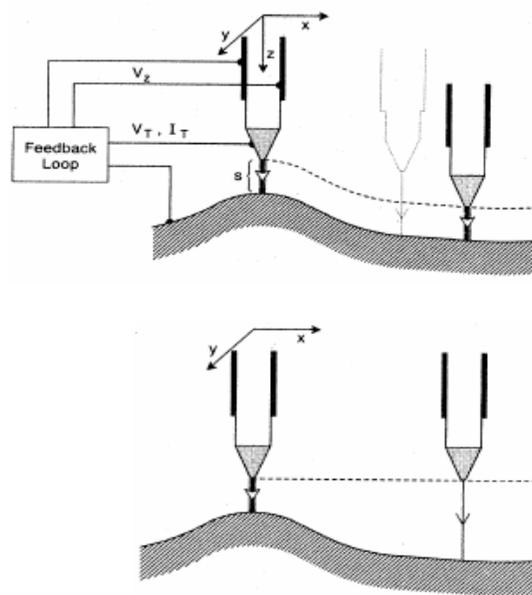


Figura 7. La microscopía de tunelaje puede operar en el modo de corriente constante (superior) o altura constante (inferior) (Cap. 1 Bai, 2000).

## 2. 5 Imágenes

La imagen representa la estructura electrónica de la superficie, que generalmente está relacionada con la topografía de la superficie (Pong y Durkan, 2005). Las imágenes consisten en un mapa que resulta de graficar la altura  $z$ , o la corriente  $J_T$ , o el voltaje  $V$ , contra los múltiples desplazamientos en  $x$ ,  $y$ . Idealmente, el STM sólo revela la estructura de las superficies en tanto que el interior permanece invisible. Las imágenes se presentan en una escala de color que sirve como referencia para describir las características de la topografía de la superficie. Los colores claros representan las zonas más altas o las regiones de mayor conductividad, y entre más oscuro la zona es baja o menos conductora. El STM muestra en tercera dimensión la estructura de las superficies con una gran resolución (Wiesendanger y Güntherodt, 1995). El entendimiento y formación de las imágenes es una de las áreas de mayor actividad para la física teórica, debido a que el STM en algunos casos no muestra el arreglo atómico de las superficies. Un típico ejemplo, es el grafito donde el STM sólo muestra los átomos de carbono  $\beta$ , en tanto que los  $\alpha$  permanecen ocultos (Pong y Durkan, 2005).

## 2.6 Puntas

Las propiedades de la punta son de gran importancia en el STM (Figura 8). Una punta atómicamente aguda (un átomo, idealmente) y estable es necesaria para la resolución atómica. Los diámetros de las puntas oscilan entre los 10 nm. Se han realizado estudios teóricos de la estructura electrónica ideal para las puntas con lo que se pretende obtener imágenes que reflejen óptimamente la información de la muestra. Las puntas se fabrican de distintos materiales como tungsteno (W), oro (Au), platino (Pt), o aleaciones como platino/iridio (Pt/Ir). Generalmente son preparadas por métodos electrolíticos (electroquímico) pulido/etching y cortadoras mecánicas entre otros. El desarrollo de técnicas para la producción de puntas con geometrías adecuadas y reproducibles es importante ya que ningún método es aplicable para todos los materiales de interés (*Melmed, 1991*). La forma de la punta puede contribuir a la distorsión de las imágenes (*Park et al., 1987*). El caso más usual es la formación de minipuntas que ocurre frecuentemente como resultado de los métodos de preparación. Si diferentes átomos o pequeños grupos de átomos actúan independientemente durante el barrido, la imagen resultante será una superposición de imágenes que reflejará diferencias con respecto a la muestra (imágenes de diferentes periodos en el grafito; *Colton et al., 1988*). Así, la forma y arreglo de las minipuntas son factores que pueden afectar la estabilidad de la imagen, Durante el barrido de la muestra la estructura electrónica de la punta es modificada lo que repercute en la imagen (*Li et al., 2004*). La identidad química de los átomos de la punta es también importante. En estudios con varios tipos de átomos (Na y Ca) mostraron que el grafito es sensible a estos átomos. El entendimiento de las anomalías así como su origen, ayudará para poder descartar propiedades que no son de la muestra.

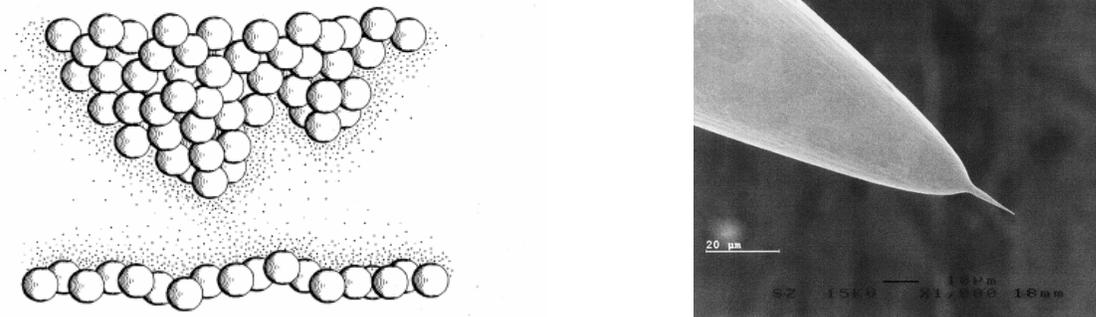


Figura 8. Esquema de una punta de STM (Izquierda), su terminación en simples átomos es necesaria para obtener resolución atómica. (Derecha) Imagen SEM de punta preparada por método electroquímico (*Szcutnik et al., 2000*).

## 2.7 Aplicaciones

La invención del STM resultó ser un evento crucial en la historia de la nanociencia y nanotecnología. Originalmente se diseñó sólo para obtener imágenes de la superficie de distintos materiales, pero debido a su eficiencia se empleó rápidamente para la representación de superficies a escala atómica (*Pizzagalli y Baratoff, 2003*). Se han obtenido imágenes hermosas y en ocasiones hasta dramáticas del arreglo atómico de un gran número de superficies metálicas y semiconductores. Sin duda la más espectacular en la historia de la ciencia de superficies fue la visualización de la estructura geométrica de la reconstrucción ( $7\times 7$ ) de la superficie del Si (111). La compleja reconstrucción ayudó en la controversia acerca de la estructura del Si (*Rosei y Rosei, 2002*). El STM juega un rol esencial en el estudio del arreglo atómico y estructura electrónica de los nanotubos de carbono ya que simultáneamente se pueden monitorear su quiralidad y propiedades electrónicas (*Ago, et al 2004; Odom et al. 2002*). En 1990 Eigler y Schweizer lograron escribir con el STM el logotipo de IBM con 35 átomos de xenón en una superficie de níquel (Figura 9). Poco después, Manoharan, Lutz y Eigler en el 2000, hicieron un corral cuántico con átomos de hierro en una superficie de cobre (Figura 9). Así, se ha mostrado el enorme potencial del STM para manipular átomos individuales (*Gerber y Lang, 2006*).

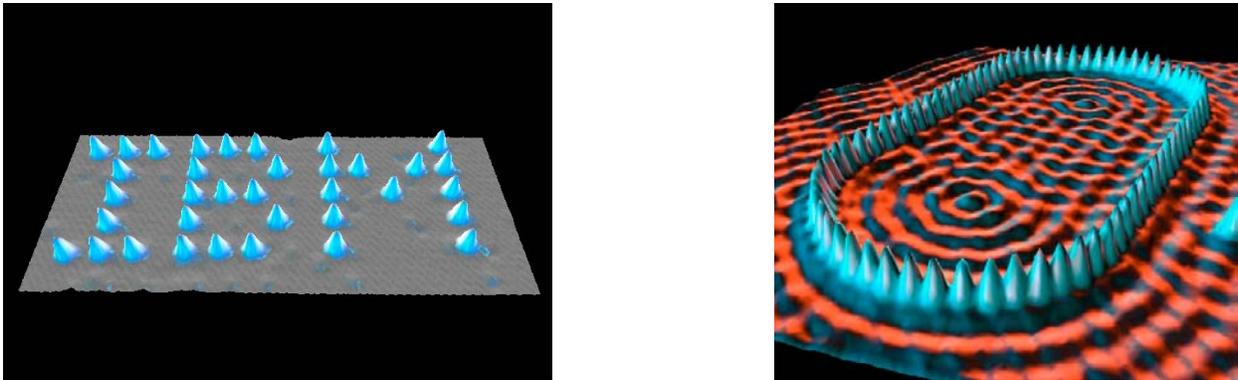


Figura 9. Imagen de escrito de logotipo de IBM (izquierda), imagen de corral cuántico de hierro en superficie de cobre (derecha; [www.almaden.ibm.com/vis/stm/library.html#ref2](http://www.almaden.ibm.com/vis/stm/library.html#ref2)).

Finalmente, el STM puede ser usado para caracterizar y manipular moléculas orgánicas en superficies sólidas y de simples cristales bajo condiciones bien controladas de ultra alto vacío. En este tipo de estudios el STM presenta ventajas sobre otras técnicas convencionales de microscopía y espectroscopía. La manipulación ha revelado nuevas oportunidades para fabricar nanoestructuras arreglando átomos o moléculas una por una, como bloques de construcción (*Otero., et al 2006*). De igual forma el STM ha incursionado en muchas disciplinas que van desde física, química, computación cuántica y en las ciencias de la vida como en **biología** (*Gerber y Lang, 2006*).

### 3. STM en sistemas biológicos

Se tenía pensado que la microscopía de tunelaje estaba limitada a superficies conductoras y semiconductoras (Feyter y Schryver, 2003), sin embargo, durante más de dos décadas se ha demostrado que es posible obtener imágenes de muestras eléctricamente aislantes como biomoléculas. A pesar de que diferentes grupos han reportando el empleo del STM en estudios estructurales de biomoléculas (Campbell et al., 2007). La formación e interpretación de las imágenes continúa generando controversia, debido a que el mecanismo que controla la corriente de túnel a través de los sistemas biológicos no es totalmente conocido, independientemente de éste, la mayor dificultad que se ha encontrado al trabajar con biomoléculas en los distintos ambientes, estriba en la baja conductividad y la resistencia eléctrica que presentan (resistencias de  $10^{15}$ - $10^{18}$   $\Omega$ m). El hecho de trabajar en el modo de corriente constante puede ocasionar que la punta se hunda en la molécula hasta que la corriente de túnel fluya entre los dos electrodos, o que al realizar el barrido la retracción de la punta no sea suficiente para evitar la colisión con la muestra, ocasionando imágenes donde no es posible discriminar sus propiedades de las inducidas por los efectos de la punta (Alliata et al., 2004).

Debido a la pobre conductividad de las biomoléculas, su altura en el STM es fundamentalmente baja comparándola con los datos obtenidos por cristalografía (Alliata et al., 2004). Para compensar la pobre conductividad de las biomoléculas, los primeros estudios se enfocaron en cubrir las muestras con películas conductoras (Pt/C o Pt/Ir/C) de aprox. 1 nm de espesor, proceso que, sin duda, evita la visualización directa de su estructura nativa y limita la alta resolución de la imagen (Davis y Hill, 2002). Algunos autores manejan el criterio de que únicamente en muestras orgánicas y delgadas (de 1 nm), la corriente puede atravesar la muestra, pudiendo así obtener una buena resolución (incluso cercana a la atómica). Otros estudios se han enfocado en analizar las muestras en condiciones de alta resistencia de túnel. Algunos autores sostienen que las imágenes son más fáciles de obtener con microscopía de alta humedad (HSTM), como el trabajo realizado con la proteína de membrana de la bacteria *Deinococcus radiodurans* sobre un sustrato aislante (mica) a niveles de humedad del 40 % (Heim et al., 1997). En estos experimentos, se ha observado una película de agua muy tenue (0.3- 0.6 nm entre 60-80 % de humedad) que muestra una alta conductividad eléctrica, lo que se cree que facilita la formación de las imágenes. De igual forma, algunas evidencias en condiciones ambientales indican la presencia de una película de agua en la superficie de las muestras; así mismo, se supone que actúa como cubierta conductora facilitando la formación de las imágenes de muestras hidrofílicas aislantes en condiciones ambientales. Esta interfase o película de agua (siempre presente) puede interferir en el proceso de transferencia de electrones, distorsionando la estructura de la muestra, así como el mecanismo de formación de la imagen. El

ordenamiento de la interfase y orientación de las cargas de las moléculas de agua afectan también la barrera de túnel. La capa de agua influye a su vez en la densidad de estados electrónicos adyacentes a la superficie (*Contera et al., 2003*).

A pesar de estos inconvenientes, el STM abrió la posibilidad de realizar estudios de alta resolución de biomoléculas. De 1983 a la fecha, el número de publicaciones de microscopia de tunelaje y biomoléculas ha incrementado rápidamente, se triplicaron a partir de 1987 lo que probablemente está relacionado con una mayor comercialización del equipo. En general, se ha mostrado la viabilidad de la microscopia de tunelaje para estudios de la superficie de materiales biológicos cercanos a la resolución atómica. Un desarrollo crucial en las aplicaciones del STM y que resulta relevante para los sistemas biológicos, radica en que las muestras pueden ser analizadas en solución, lo que representa la posibilidad de observar la respuesta de macromoléculas a estímulos físicos y químicos (*Leggett et al., 1994*)

### **3.1 Primeros experimentos**

Entre los primeros trabajos se encuentra el realizado por Binnig y Röhrer (casi inmediatamente después de la invención del STM), quienes se dieron a la tarea de obtener imágenes de ácido desoxirribonucleico con escaso éxito y enfatizando la dificultad que implicaba. Poco después, se demostró que el STM podía resolver la topografía del bacteriófago  $\phi 29$  y algunos de sus componentes (como su collar proteico). Los resultados mostraron que su estructura no era alterada. El estudio se realizó a presión atmosférica y temperatura controlada, y donde el acierto que tuvieron fue el empleo de una superficie conductora como el grafito pirolítico. Compararon las imágenes obtenidas del STM con las de microscopia electrónica convencional y encontraron similitudes morfológicas para el fago en ambas técnicas. Mencionan que la formación del relieve del bacteriófago pudo deberse a la hidratación retenida ya que la muestra se depositó en solución (*Baro et al., 1985*). Un año después Binnig y Röhrer en 1986 obtuvieron una de las primeras imágenes de ADN depositado sobre una película de carbono. Comentaron que las imágenes del ADN parecen más bien depresiones que elevaciones (debido a que no es conductivo), y que la cadena de ADN se hunde en el grafito y no sobresale de la superficie de carbono. De su trabajo concluyeron que el STM puede trabajar a decenas de ángstrom ( $50 \text{ \AA}$ ) de separación de la superficie y no tocar las moléculas de ADN (*Hansman y Tersoff, 1986*).

### 3.2 STM de ADN

El ADN se considera como una molécula relativamente simple, sumamente estable, de estructura simétrica y armoniosa que impresiona con una mezcla de sencillez y complejidad. Fue la primera molécula en ser estudiada y continua siendo el modelo más empleado por los investigadores en estudios con STM. El ADN representa un buen parámetro para comparar la calidad y fidelidad de las imágenes obtenidas del STM con los datos conocidos por cristalografía de rayos X y las distintas técnicas de microscopia. Algunos fragmentos de entre 2.0, 2.5 y 3.5 nm de longitud de ADN han sido estudiados a través de STM, donde se ha podido resolver su estructura bicatenaria. En fragmentos más grandes se ha podido apreciar la periodicidad de la torsión de la doble hélice, con valores cercanos a 3.5 nm y el surco menor con una longitud entre 1.2 y 1.5 nm. Los valores obtenidos a través del STM están muy cercanos a los propuestos por Watson y Crick para el ADN "B". La doble hélice completa un giro cada diez pares de bases (3.4 nm) donde los pares de bases (pb) adyacentes se encuentran separadas 0.34 nm. En la parte externa del ADN, los espacios entre las hebras entrelazadas forman dos hendiduras helicoidales de distinto ancho descritas como surco mayor y surco menor que funcionan como zonas de unión para otras moléculas.

Las estructuras adicionales de ADN "Z y A" también han sido estudiadas por STM empleando distintos tipos de sustrato. En un estudio realizado en ultra alto vacío se observó un fragmento de 550 pb de ADN "A" resolviéndose la periodicidad de los giros de la doble hélice (Figura 10), el surco mayor y menor. La anchura del surco menor fue de 1.0 nm y de 0.3 nm para el surco mayor. Los resultados obtenidos son consistentes con los conocidos por cristalografía de rayos X. La sección transversal resolvió la superficie de las pares de bases del surco menor (figura 10). Los perfiles mostraron una excelente correlación con los modelos atómicos de la superficie del ADN derivados de cristalografía de rayos X. Según los autores, los resultados sugieren la posibilidad de realizar estudios de la estructura atómica de la superficie de los ácidos nucleicos (*Driscoll et al., 1990*).

De igual forma se han realizado estudios de plásmidos linealizados sobre mica, como el realizado por Heim y colaboradores (1997) donde un vector con ADN del virus AAV2 de 6,617 pb se linealizó con las enzimas de restricción HindIII. La muestra se observó a 68 % de humedad atmosférica relativa. Las imágenes mostraron fragmentos de 1.595 nm de longitud, por lo que los pb estarían separadas 0.24 nm, (valores que corresponden con lo reportado para el ADN tipo "A" (0.23 y 0.29 nm/pb) a 75 % de humedad). La altura de las cadenas fue de 0.65 nm y la anchura de 3.0 nm, esta última corresponde con lo

reportado (2.55 nm) para el tipo “A”, demostrando que la alta resolución puede ser obtenida con el STM (Heim et al., 1997).

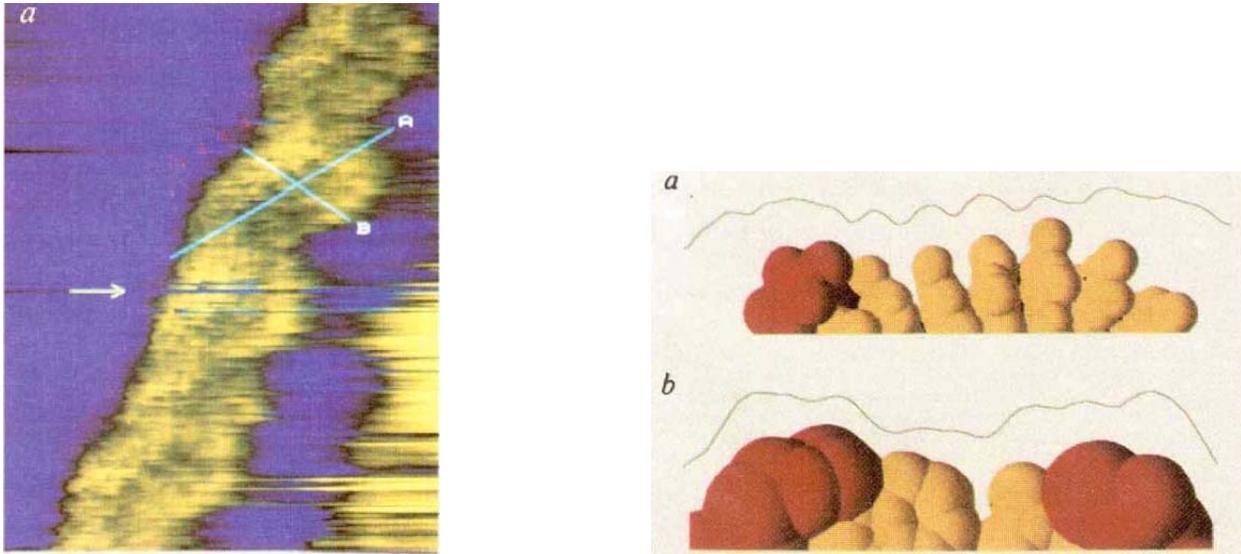


Figura 10. Imagen de STM de ADN-A al vacío, la imagen STM mostró cuatro giros de la doble hélice y el surco mayor. Las dimensiones de la imagen *a* son de  $3.5 \times 5.5$  nm. *A*. Corte de la sección transversal de la superficie de las pares de bases del surco menor. *B*. la columna de la cadena (fosfato-azúcar) y una base (Driscoll et al., 1990)..

### 3.3 STM de Proteínas

La estructura de las proteínas ha sido estudiada a través de distintas técnicas convencionales como microscopía electrónica, de transmisión y de difracción de rayos X. En la microscopía electrónica la deshidratación de las muestras es requerida. Lo último impide la conservación de la estructura nativa de la molécula. Las técnicas de difracción requieren muestras cristalinas, sin embargo cerca del 99% de las moléculas conocidas no forman cristales. El STM es una herramienta útil en la caracterización de proteínas, ya que permite observar tanto muestras cristalinas como no cristalinas conservando su estructura nativa. El STM se ha empleado en el estudio de  $\alpha$ -macroglobulina de tortuga sobre HOPG. Las imágenes muestran un surco en la superficie del tetrámero que corre al centro de las dos primeras moléculas. Este surco es característico en macroglobulinas, y las dimensiones para la molécula fue de 22 x 22 nm. Comparando los resultados con los obtenidos por AFM y TEM, el tetrámero resulta más ancho (AFM, 16 x 22 nm; TEM, 14 x 18 nm). La altura por STM fue de 3.4 nm y la depresión del surco de 0.9 nm; en tanto, 6.1 nm de altura y 2.4 nm de depresión para las medidas con AFM. (Arakawa et al., 1992).

Los anticuerpos pertenecen a una clase de proteínas denominadas inmunoglobulinas, constituyen alrededor del 20 % de las proteínas sanguíneas. El tipo de anticuerpo más común es la inmunoglobulina G (IgG) que ha sido bastante estudiado a través de microscopia electrónica y cristalografía de rayos X. La IgG se compone de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas de aprox. 50 KDa cada una y dos cadenas livianas de 25 KDa cada una. Las cadenas presentan un arreglo en forma de T ó Y con dos brazos idénticos “Fab” y un brazo “Fc”. Cada brazo mide aprox. 8.5 nm de largo, aprox. 6.0 nm de ancho y aprox. 4.0 nm de altura (datos de largo y ancho por difracción de rayos X y altura de TEM). Imágenes de STM han mostrado moléculas de IgG arregladas en forma de Y; los tres dominios fueron claramente diferenciados, cada brazo midió aprox. 7 nm de largo, aprox. 9 nm de ancho y aprox. 4 nm de alto valores cercanos a los mencionados (*Tang y McGhie, 1996*).

La Chaperona (Hsp 60) es una proteína que se pega a las cadenas polipeptídicas no plegadas facilitando su plegamiento mediante una reacción dependiente de ATP. Se compone de 14 polipéptidos idénticos de 547 residuos cada uno. Las 14 subunidades se encuentran arregladas en dos capas de 7 subunidades cada una, con forma de un anillo de aprox. 13.7 nm y 4.5 nm de diámetro externo e interno respectivamente. La altura de las dos capas es de aprox. 14.6 nm. A través de STM sus dimensiones resultan un tanto elevadas. Los diámetros fueron aprox. 18 nm y aprox. 9 para el externo e interno respectivamente. En tanto que la altura resultó baja aprox. 5 nm comparando con el conocido (*Tang y McGhie, 1996*).

CuNIR (nitrito reductaza multi-cobre) es una enzima clave en la respiración anaerobia en bacterias. Es un homotrímero con dos tipos de átomos de cobre (Cu I y II), uno en cada monómero. En STM se ha encontrado que cuando se deposita (la proteína en solución) en una baja concentración sobre una superficie de oro, la estructura trimérica se desnaturaliza. No obstante, es posible distinguirla del sustrato, su altura es relativamente baja (1.0 nm o menos). En alta concentración sobre la superficie de oro la proteína pierden su estructura trimérica y forma capas de monómeros. Así, cada unidad revela una forma redondeada de 6 nm de tamaño, sobre HOPG la capa de CuNIR es más ordenada, el tamaño de los monómeros coincide con el tamaño de las muestras en oro. El trabajo demostró la influencia del sustrato en la interacción proteína-proteína (*Contera et al., 2003*).

Azurin (proteína tipo I) es una pequeña metaloproteína con un átomo de cobre en el centro (hidrofílico) de la molécula aproximadamente a 7 nm de la superficie. Diferentes estudios han atendido a su orientación empleando residuos de cisteína para inmovilizarla sobre superficies de oro. Bajo una solución amortiguadora, la enzima forma monocapas bien definidas y bastante estables para barridos repetidos. También se pueden encontrar algunas moléculas aisladas de 4 a 4.5 nm de diámetro. La altura más

frecuente para las proteínas del tipo silvestre fue de 1 a 1.2 nm, en tanto que 2.5 a 2.7 nm fue para las de tipo mutante (con residuos de Cisteína) (Davis y Hill., 2002). De igual forma la Glucosa oxidasa (glucoproteína de 160 KDa, que contiene 2 cadenas de polipéptidos idénticas) se ha estudiado en solución amortiguadora. Los resultados muestran que su estructura se puede resolver con alta resolución (Davis y Hill., 2002). Pseudoazurin y apo-pseudoazurin han sido estudiadas, y sus dimensiones fueron semejantes para ambas 6.0 nm de longitud. Las dos proteínas son visibles en un rango de 80.0 nm, forman capas o multicapas. Cuando se colocó una muestra de ambas proteínas en el sustrato no fue posible diferenciarlas, a pesar de que pseudoazurin contiene un átomo de cobre y apo-pseudoazurin lo carece (Contera y Iwasaki, 2001).

Se sabe que la acumulación de la proteína  $\beta$ -amiloidea ( $A\beta$ ) está relacionada con la enfermedad de Alzheimer. Un gran número de estudios han mostrado que agregados de  $A\beta$  resultan tóxicos en cultivos celulares. Los agregados de  $A\beta$  son polimórficos y pueden tener múltiples mecanismos de agregación. Algunas investigaciones se han enfocado en estudiar la estructura y agregación de  $A\beta$ , entre estos se encuentran los realizados a través del STM para los monómeros y oligómeros sobre la superficie de oro (Figura 11). Estos estudios muestran que la distribución de los monómeros y oligómeros resulta heterogénea al igual que su orientación. Los monómeros son visibles en un rango de 100 nm, y revelan una forma globular de 3 a 4 nm de ancho, y una altura de  $8.7 \pm 0.3 \text{ \AA}$  (por AFM). En la mayoría de los monómeros se puede discernir la morfología interna, que consiste en una cadena  $A\beta$  polipeptídica (14 nm de longitud aproximadamente) plegada en 3 ó 4 dominios, la distancia entre los pliegues fue de 4 a 5  $\text{\AA}$ . De igual forma, se observaron dímeros que mostraron dimensiones de 6 a 7 nm de longitud y 3 nm de ancho. Debido a la morfología de los oligómeros se concluye que estos se podrían formar por la fusión de sus monómeros o dímeros de  $A\beta$ , y la estructura interna consiste en varias cadenas (plegadas) alineadas (Losic et al., 2006).

El STM incursionó en el campo de las proteínas estructurales, y ha tenido éxito en sistemas tales como proteínas del citoesqueleto y colágeno, entre otros. Las primeras proteínas estructurales en ser observadas a través del STM al parecer fueron simples redes y filamentos de colágeno (con una cubierta metálica) de tipo IV. En fibras de colágeno tipo I se han observado proyecciones a intervalos de 9.0 nm, lo que se cree son cadenas individuales de colágeno, y con lo cual se podría discernir que cada proyección está constituida por tres hebras de segmento helicoidal. De igual forma, se han observado filamentos de aprox. 1.5 nm lo que es consistente con los valores conocidos para la unidad fundamental del colágeno.

El citoesqueleto es un sistema citoplasmático de fibras, esencial para la movilidad celular. Desempeña un papel estructural importante al sostener la membrana plasmática y formar carriles a lo largo de los cuales se pueden desplazar los organelos y otros elementos en el citosol. Esta constituido por tres tipos de fibras: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos, estos últimos son tubos cilíndricos (de 20 a 24 nm de diámetro y la longitud varia de uno a cientos de micrómetros) constituidos de subunidades globulares de tubulina. Las subunidades están constituidas de dos monómeros  $\alpha$  y  $\beta$  los cuales mantienen una unión bastante fuerte. Estas subunidades miden 8.0 nm de longitud. La microscopia de STM puede dar información de la estructura y organización de los microtúbulos, y complementar la información conocida por técnicas convencionales. En experimentos con STM los microtúbulos (a baja resolución), muestran una apariencia cilíndrica de 24 nm de altura. Las subunidades tambien pueden ser resueltas, su longitud fue de  $3.8 \pm 0.4$  nm y la separación entre ellas fue de  $4.8 \pm 0.4$  nm. En modo de altura constante, se sugiere que es posible discernir las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Maaloum et al., 1994).

La capa proteica intermedia de la bacteria *Deinococcus radiodurans* forma un enrejado hexagonal, y las imágenes de STM resuelven el enrejado formado por las moléculas (105 KDa) con forma de exameros de 18 nm de longitud (Heim et al., 1997).

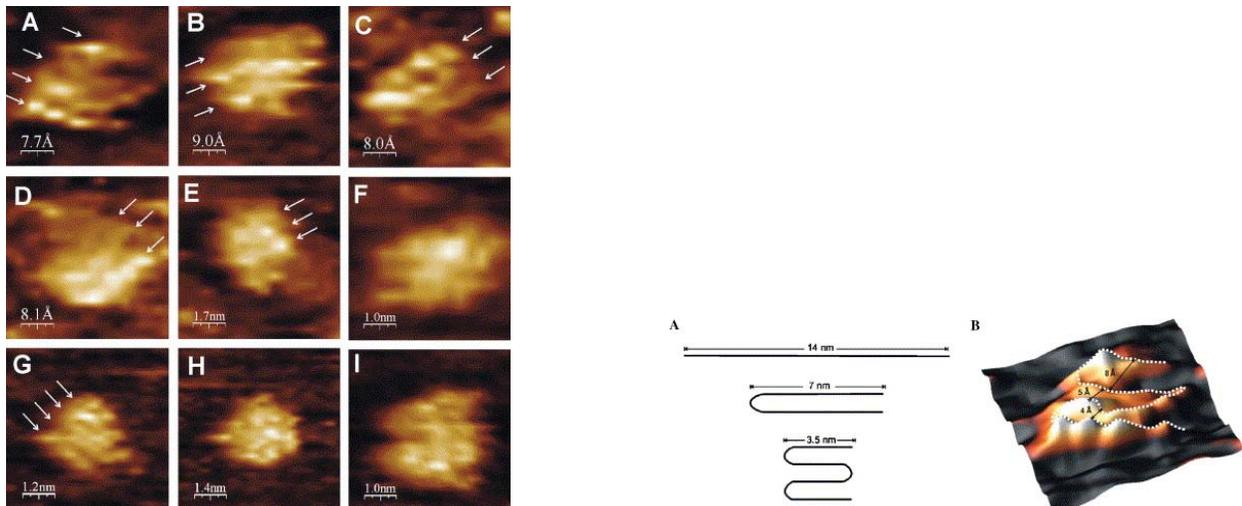


Figura 11. Alta resolución de monómeros de A $\beta$ -40 en una superficie atómicamente plana de oro, los monómeros son de 3 a 4 nm de ancho aproximadamente, los monómeros contiene de 3 a 4 cadenas paralelas, la distancia entre las cadenas es de 5 a 10 Å. Modelo y representación en tercera dimensión de la estructura interna de los monómeros.

La cápside del virus del mosaico del tabaco está compuesta de alrededor de 2130 proteínas idénticas las cuales forman una gran estructura tubular con un arreglo helicoidal. El tubo tiene cerca de 300 nm de longitud y 18 nm de diámetro, y la cavidad interna tiene 4 nm de diámetro. En un estudio realizado a

través de STM las imágenes se obtuvieron en condiciones de alta humedad (HSTM) y sobre un sustrato aislante. Las alturas obtenidas oscilaron en un rango de 15 nm valor que corresponde con el diámetro conocido de igual forma mencionan que algunas características conocidas resultaron visibles (*Heim et al., 1996*).

### 3.4 STM de alta resolución

El STM es ampliamente usado en el estudio de diferentes moléculas que pueden ser adsorbidas en superficies. En la mayoría de los casos, las moléculas pueden ser claramente observadas y en algunos se ha obtenido una resolución cercana a la atómica. Por ejemplo moléculas de ADN sobre grafito pirolítico se ordenan en paquetes de cadenas distribuidas paralelamente. La distancia entre las cadenas observadas por STM fue de 3.3 nm, valor que es cercano al conocido por difracción de rayos X (3.4 nm) para el ADN en fase condensada. La altura aparente de las cadenas fue de 0.9 nm, valor demasiado bajo que puede deberse a la alta condensación de la molécula. Empleando una técnica de deposición diferente, las moléculas de ADN muestran alturas cercanas a 2.0 nm y una orientación curvada de derecha a izquierda con apariencia de la dentadura de una llave. Se observa una periodicidad de 2.0 nm en las torsiones de la cadena, distancia reducida debido a la deshidratación de las muestras (*Keller et al., 1989*).

Dunlap y Bustamante (1986) desnaturalizaron ADN hibridando con poli (dA) para evitar la renaturalización al depositarlo sobre la superficie de HOPG con lo que además favorecieron su interacción con el sustrato, dejando los pb y la columna vertebral (azúcar-fosfato) accesibles al barrido. Los resultados (Figura 12) mostraron la formación de cadenas (unicatenarias) paralelas distanciadas a intervalos de 0.1 nm y los doble anillos de los pb revelaban una forma casi hexagonal. La distancia entre los anillos de las cadenas fue de 0.6 nm y 0.24 nm de centro a centro en los anillos. Los resultados mostraron que se pueden diferenciar los anillos de las pirimidinas. Un par de años después se realizó un estudio detallado de la estructura de pb aisladas como guanina sobre diferentes sustratos. La guanina sobre la superficie de Mo<sub>2</sub>S revelaron que se autoensambla en monocapas aisladas y sobre la superficie de grafito formaron líneas paralelas con una orientación similar a las de Mo<sub>2</sub>S. Las moléculas daban la apariencia de gotas aisladas que formaban líneas paralelas alternadas, las líneas de moléculas se arreglaron en forma de zigzag con ángulos de 95°, la distancia de guanina-guanina es de 0.77 nm. Finalmente, las imágenes de guanina sobre grafito eran mucho más detalladas y complicadas lo que las hizo más difíciles de interpretar. (*Heckl, et al., 1991*).

En una coabsorción de guanina (G) y citosina (C) en una relación 1:10 molar, en una interfase líquido/sólido de 1- octanol sobre HOPG, las imágenes revelaron la formación gradual dos horas después de la deposición de tres (I, II, III) dominios bien diferenciados y ordenados. En los dominios I y II consistieron en líneas rectas alineadas paralelamente, ambos relacionados por una rotación de  $60^\circ$ . La periodicidad a lo largo de las líneas en los dominios I/II es de  $0.45 \pm 0.05$  nm y las líneas adyacentes separadas cada  $0.87 \pm 0.09$  nm. En el dominio III, el arreglo mostró una alternancia entre líneas con protuberancias altas y bajas, con repetida distancia de  $1.71 \pm 0.18$  nm entre las líneas (líneas con protuberancias bajas) y con una periodicidad de  $0.69 \pm 0.07$  nm a lo largo de las líneas. Para este arreglo se supone lo forma las moléculas de G y C. Para C pura, se mostró un arreglo similar al presentado en el dominio I/II con una periodicidad a lo largo de la línea de  $0.53 \pm 0.06$  nm y  $0.82 \pm 0.08$  entre líneas adyacentes. En tanto que para G pura se observó un arreglo totalmente distinto, donde las moléculas daban la apariencia de formar casi un cuadrado. La distancia entre las líneas fue de  $0.64 \pm 0.07$ nm y con una periodicidad de  $0.68 \pm 0.07$  nm a lo largo de las líneas. Se concluye que la formación de los dominios I/ II están formados únicamente por moléculas de C, y el dominio III esta formado por moléculas de G y C. En un modelo optimizado del arreglo de los dimeros de GC, se observó una periodicidad a lo largo de la línea de  $0.74$  nm que concuerda con el valor obtenido experimentalmente ( $0.68 \pm 0.07$  nm). La estructura lineal es estabilizada por puentes de hidrógeno a lo largo de la línea (Xu, *et al.*, 2006).

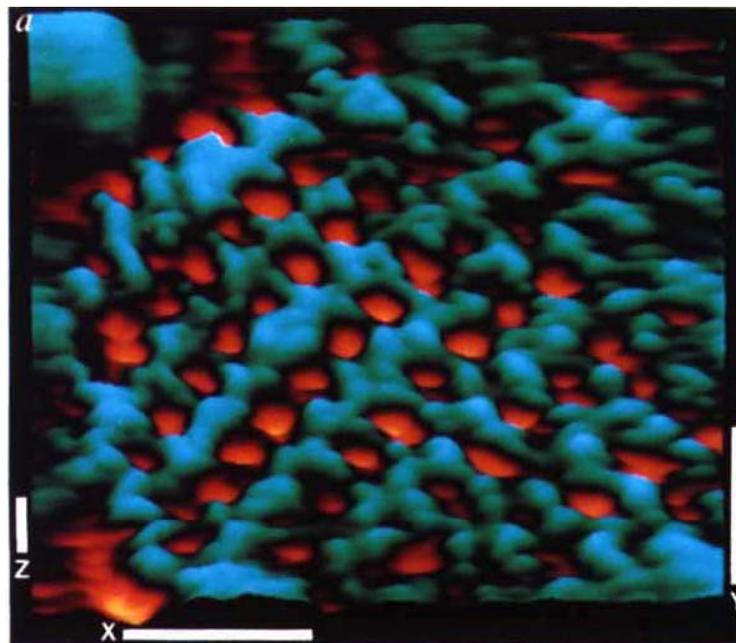


Figura 12. Imagen de cadenas (unicatenarias) paralelas distanciadas a intervalos de 0.1 nm, los doble anillos de los pb revelan una forma casi hexagonal (Dunlap y Bustamante, 1986).

## 4. Rotavirus

Los virus de doble hebra de ARN (dsRNA, por sus siglas en inglés) infectan un amplio rango de organismos, incluyendo a los vertebrados, invertebrados, plantas y bacterias. Las familias *Reoviridae*, *Birnaviridae* y *Cystoviridae* son virus de dsRNA. *Reoviridae* es una de las familias más grandes y una de las más estudiadas. Algunos virus que la conforman son bluetogues virus (BTV), orthoreovirus y rotavirus (Patton y Spencer, 2000). Estos últimos son la principal causa de gastroenteritis severa en humanos, y se estima que más de 600,000 niños mueren anualmente alrededor del mundo debido a la deshidratación (Mena et al., 2005) a pesar de la mejora en los tratamientos (Mathieu et al., 2001).

Los rotavirus fueron aislados por primera vez en el año de 1973. Su nombre se debe a que tienen aspecto de una "rueda" al observarse con microscopía electrónica (Rota del latín rueda) (Abdelnour, 2005). Se clasifican en grupos y subgrupos basados en los epitopes presentes en la capa proteica intermedia VP6. Los siete grupos más estudiados son del A-G, siendo los del A la principal causa de diarrea en infantes (Hoshino, et al 2006).

### 4.1 Estructura de la capsida

A través de estudios de criomicroscopía electrónica (cryo-EM) y el procesamiento de imágenes, se ha podido determinar (a aprox. 20 Å de resolución) la estructura del virión (Mathieu et al., 2001). Su genoma se encuentra empaquetado en una compleja cápsida icosaédrica formada por tres capas proteicas concéntricas (TLPs, por sus siglas en inglés; Patton y Spencer, 2000). Las proteínas que forman la cápsida son VP2, VP6, VP7 y VP4 (Figura 13). La capa externa está constituida por 260 trímeros de la proteína VP7 con una triangulación  $T=13$  y simetría icosaédrica, 60 dímeros de la proteína VP4 en forma de picos se proyectan desde la superficie del virión, estas proteínas interactúan con los receptores de la membrana de la célula huésped. Cuando el virión entra en la célula huésped pierde la capa externa y da paso a la formación de una partícula de doble capa (DLPs, por sus siglas en inglés) que es transcripcionalmente activa. La segunda capa o intermedia está formada por 260 trímeros de la proteína VP6 (44 kDa) con una triangulación  $T=13$  y con simetría icosaédrica. La VP6 es de gran importancia en la organización y replicación del virión (Estes et al., 1987). La capa interna o núcleo tiene de 50 nm de diámetro (Mena et al., 2005) inmediatamente rodea el genoma. Está formada por 60 dímeros de la proteína VP2 (102.5 kDa por monómero) con una triangulación  $T=1$  y simetría icosaédrica, en su forma nativa el núcleo contiene el genoma (dsRNA) y las proteínas VP1 y VP3 (Greig et al., 2006).

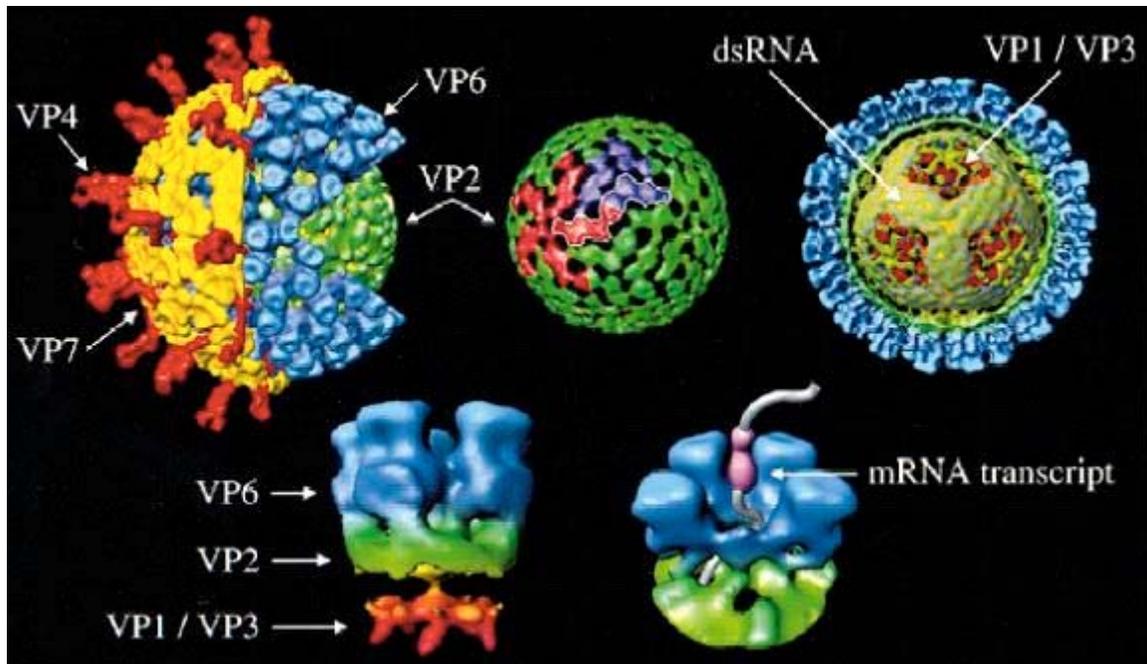


Figura 13. La representación en tercera dimensión de la triple capa proteica del rotavirus muestra el arreglo que toman las proteínas VP4, VP7, VP6, VP2, VP1/VP3 y el dsRNA (Patton y Spencer, 2000).

#### 4.2 Proteína VP6

La proteína VP6 juega un papel clave en la organización del virión ya que la ausencia de los trímeros de VP6 en la DLPs produce diferencias en la morfología del virión (Greig *et al.*, 2006). Algunos autores sugieren que la interacción entre VP6 y VP2 definen la correcta geometría de la partícula viral y que el ensamble de la VP6 en la superficie de la capa interna deriva de una fuerte interacción inicial entre los trímeros de VP6 (Mathieu *et al.*, 2001). Aunque su papel específico no es totalmente conocido, sugieren los autores que es un componente necesario para la replicación y que su presencia es indispensable para la transcripción (Greig *et al.*, 2006), ya que se creó que está relacionada con la actividad de la ARN polimerasa (Estes *et al.*, 1987). La estructura de la proteína VP6 se ha determinado por técnicas de cristalografía de rayos X (a 2 Å de resolución) y por cryo-EM. Es una molécula alargada y su forma recuerda la de una torre (Prasad *et al.*, 1996). El trímero mide 9.5 nm de largo, y su base es triangular (vista transversal) de 6.0 nm por lado. La cabeza (vista transversal) tiene forma de hexágono de 4.5 nm de diámetro. Las tres subunidades que la conforman muestran en la parte central de la molécula una torsión hacia la derecha de la molécula (Figura 14; Mathieu *et al.*, 2001).

Cada subunidad es una cadena de polipéptidos plegada en dos dominios B y H (Figura 14). El dominio B es la base de la molécula, consiste en 8  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ - $\alpha$ ) que derivan de dos segmentos de la cadena

peptídica. El primer segmento contienen las hélices  $\alpha\text{a}-\alpha\text{e}$ , y el segundo segmento contiene las tres hélices restantes ( $\alpha\text{f}-\alpha\text{h}$ ). La conexión entre las hélices  $\alpha\text{b}$  y  $\alpha\text{c}$  en la base forman una  $\beta$ -horquilla ( $\beta\text{a}-\beta\text{b}$ ) que se empaquetan verticalmente en los extremos de la molécula para formar los ejes del prisma triangular de la base del trímero. El dominio H constituye la parte superior de la molécula, y consiste en un  $\beta$ -sandwich o  $\beta$ -barril. El dominio H es una inserción entre las hélices consecutivas  $\alpha\text{e}$  y  $\alpha\text{f}$  del dominio B. Las hebras CHEF forman la  $\beta$ -hoja dispuesta hacia el exterior (extremo de la molécula), en tanto que las hebras BIDG la hoja interna. La última hoja se incrementa por una horquilla A'A'' y la conexión entre las hebras D y E forman otra horquilla D'D''. El dominio H es una estructura de tres capas (sándwich), las seis hebras A'A'' BIDG entre las hojas CHEF y la horquilla D'D''. La cabeza de la molécula está formada por bucles (loops) A'A'', BC y HI incluyendo la hélice corta  $\alpha\text{A}$ . Los dominios H y B participan en los contactos que estabilizan el trímero. La molécula tiene una gran cavidad en el centro de la base que está llena de agua (es limitada por el dominio B de las tres subunidades), la cavidad restringe el área de contacto entre las subunidades. Además la VP6 contiene un ion metálico Zn(II) localizado en el centro de la molécula (Figura 14). Comparando la secuencia de aminoácidos del rotavirus tipo A que infecta especies bovinas, se encontró que concuerda un 98.5% con la secuencia del tipo A que infecta al humano, 40 % con el grupo C de rotavirus y un 16% con el grupo B (Mathieu *et al.*, 2001).

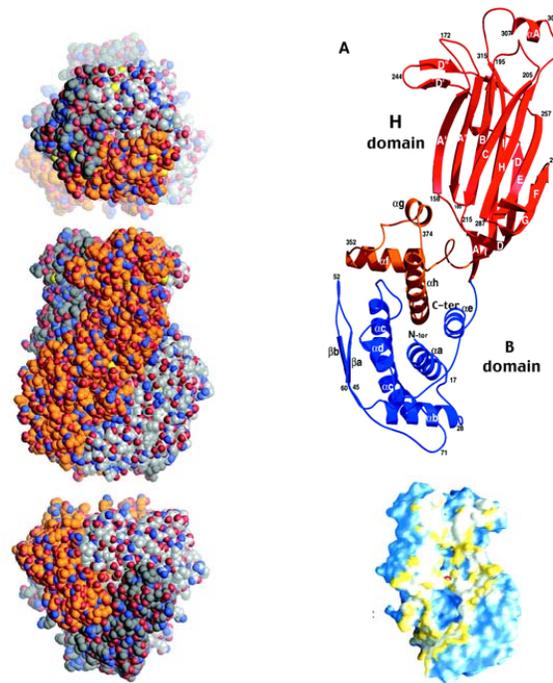


Figura 14. Representación del trímero en orientación ortogonal, cada esfera corresponde al radio de los átomos, su base es triangular (vista transversal) y la cabeza (vista transversal) tiene forma de hexágono, subunidad del trímero con el dominio H en rojo y el B en azul, y representación del trímero donde una subunidad fue removida mostrando el Ion metálico Zn(II) (Mathieu *et al.*, 2001).

### 4.3 Ensamblaje de las proteínas de la cápside de los rotavirus

Diferentes condiciones como la temperatura, pH, fuerza iónica y la misma concentración de las proteínas intervienen en el ensamblaje del virión. Por otro lado, algunos estudios han mostrado que dependiendo de las proteínas que se expresen en los cultivos celulares se pueden obtener diferentes partículas virales. Además se pueden formar arquitecturas simples (formadas sólo por la expresión de la proteína VP2) o estructuras con múltiples capas como las resultantes de la coexpresión de VP2 con una o varias de las tres proteínas restantes de la cápside del rotavirus (VP2/VP6, VP2/VP6/VP7, VP2/VP6/VP7/VP4) (Mena *et al.*, 2005).

#### *Expresión de proteína VP2*

La estructura primaria de la proteína VP2 ha sido muy estudiada. Constituye cerca del 90 % de las proteínas del núcleo. Algunos trabajos mencionan que VP2 se une al ARN y que puede estar implicada en su replicación y encapsulación. La expresión de VP2 revela que puede formar estructuras esféricas (de superficie lisa) de  $52 \pm 2$  nm en diámetro y morfológicamente estables hasta por 4 días. Labbè y colaboradores (1991) reportaron la formación de partículas de 45 nm en diámetro con características similares al núcleo del rotavirus. De igual forma VP2 puede formar estructuras erizadas, planas y hélices de 8.0 nm en diámetro (Zeng *et al.*, 1994). Mena y colaboradores (2006) mencionan que VP2 forma estructuras altamente ordenadas de 50 nm de diámetro en citoplasma celular (Figura 15).

#### *Coexpresión de VP2/VP6, VP2/VP6/VP7, VP2/VP6/VP7/VP4 y VP2/VP6/VP7/VP4*

La coexpresión (en células Sf9) de VP2/VP6 resulta en la formación de partículas con características estructurales similares a las partículas de doble capa (DLPs) (Labbè *et al.*, 1991; Crawford *et al.*, 1994). La coexpresión de VP2/VP4/VP6 forma estructuras con características similares a VP2/VP6 y DLPs, indicando que la adición de VP4 no ocasiona cambios perceptibles en la estructura o diámetro de las partículas, además que la VP4 interactúa directamente con la VP6 en ausencia de VP7. En la coexpresión de VP2/VP6/VP7 o VP2/VP6/VP7/VP4 se forman estructuras con características similares a los viriones de triple capa (Crawford *et al.*, 1994).

#### *Expresión de proteína VP6*

En los casos anteriores se emplea la proteína VP2 como bloque de construcción para las diferentes VLPs, ya que se ha visto que cuando se expresan proteínas y no se incluye VP2 las partículas resultan heterogéneas e inestables como es el caso de la combinación VP6/VP7 (Crawford *et al.*, 1994). Sin embargo Ready y Sabara (1987) reportaron que la proteína VP6 se agrega produciendo estructuras

tubulares y esféricas. Estes y colaboradores (1987) mencionan que la proteína VP6 tiene la propiedad de ensamblarse espontáneamente en tubos. En 2006 Mena y colaboradores confirmaron que la proteína VP6 forma fibras de 50 nm de diámetro en el citoplasma celular de células de insecto. López y colaboradores (2005) mencionan que VP6 puede ensamblarse en fibras incluso cuando VP2 está presente.

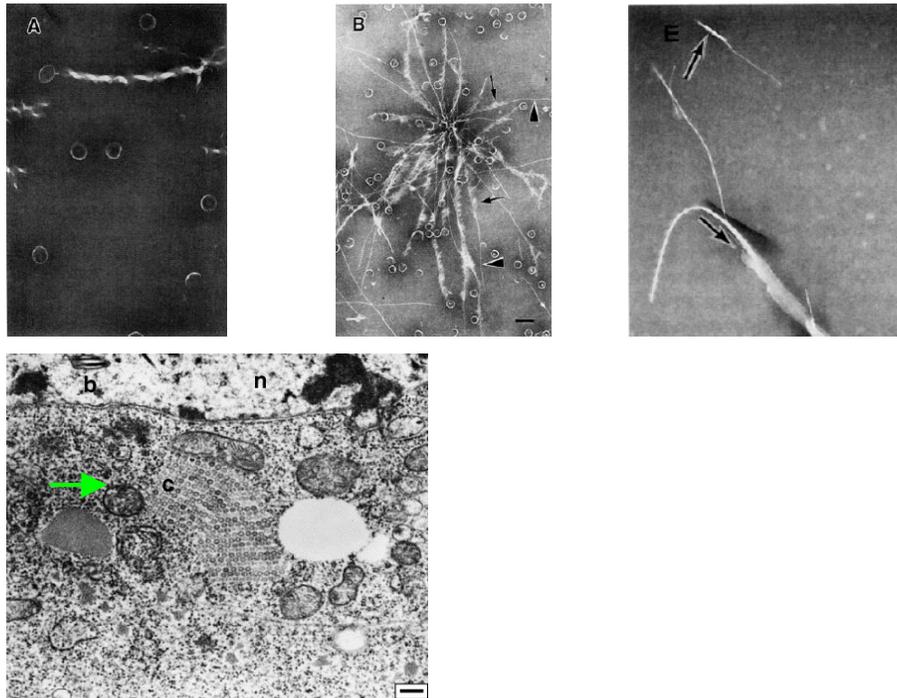


Figura 15. La proteína VP2 puede formar estructuras helicoidales, erizadas y planas (A, B y C; escala de la barra 100 nm). La imagen inferior muestra esferas (vea flecha) altamente ordenadas (barra de escala 200 nm; Zeng et al., 1994; Mena et al., 2006)

#### 4.4 La proteína VP6 de la cubierta del rotavirus se agrega produciendo tubos y esferas

El estado de agregación de la proteína VP6 depende tanto del pH como de la fuerza iónica y la concentración de cationes bivalentes, sin embargo en ausencia de cationes bivalentes, el pH es el principal parámetro que controla los estados de agregación de VP6 (*in vitro*), controlando así el tipo de interacciones y en consecuencia dirigiendo los diferentes tipos de ensambles (Figura 16; Lepault et al., 2001). A pHs neutros y fuerza iónica baja, la proteína forma tubos de 45 nm en diámetro y varios micrómetros de longitud. Sin embargo, cuando se emplean las sales,  $\text{CaCl}_2$  o  $\text{ZnCl}_2$  con el objeto de incrementar la fuerza iónica (100 a 200 mM), los ensambles se desestabilizan y únicamente trímeros de VP6 están presentes en la solución. A pHs de 5.5 a 7 y fuerza iónica baja los trímeros forman grandes tubos de 75 nm en diámetro y varios micrómetros de longitud. De igual forma cuando se incrementa la

fuerza iónica los tubos se desestabilizan. En pHs ácidos de 3.0 a 5.5 se forman partículas esféricas de diferentes tamaños, la mayoría de las esferas pequeñas tienen un diámetro de 75 nm, similar al de los tubos grandes. En condiciones muy ácidas (pH de 2.0 a 3.0) independientemente de la fuerza iónica, las estructuras se desestabilizan y sólo los trímeros están presentes (*Lepault et al., 2001*). Los resultados sugieren que el estado de protonación de VP6 define los tipos de ensamblajes, probablemente afectando los contactos laterales específicos entre los trímeros. La protonación podría compensar las cargas negativas de la superficie de contacto lo que explicaría la formación de las partículas esféricas sólo a pH bajos. El pH afecta la estabilidad de los ensamblajes ya que a pHs básicos los tubos pequeños son termodinámicamente más inestables. De igual forma a elevada acidez e independiente de las concentraciones de cationes bivalentes se observan sólo trímeros.

Todos los ensamblajes son desestabilizados por concentraciones superiores a 100 mM de los cationes divalentes (Ca y Zn).

En células de insecto (in vivo) la formación de fibras de 50 nm de diámetro parece estar relacionada con la concentración de las proteínas debido a que los tubos sólo son visibles 48 hpi (horas post infección), y cuando la concentración de la proteína VP6 se ha incrementado en un 150 % con respecto a la presente 24 hpi y donde las condiciones (pH intracelular pi de 7 y fuerza iónica de 0.2; *Mena et al., 2005*).

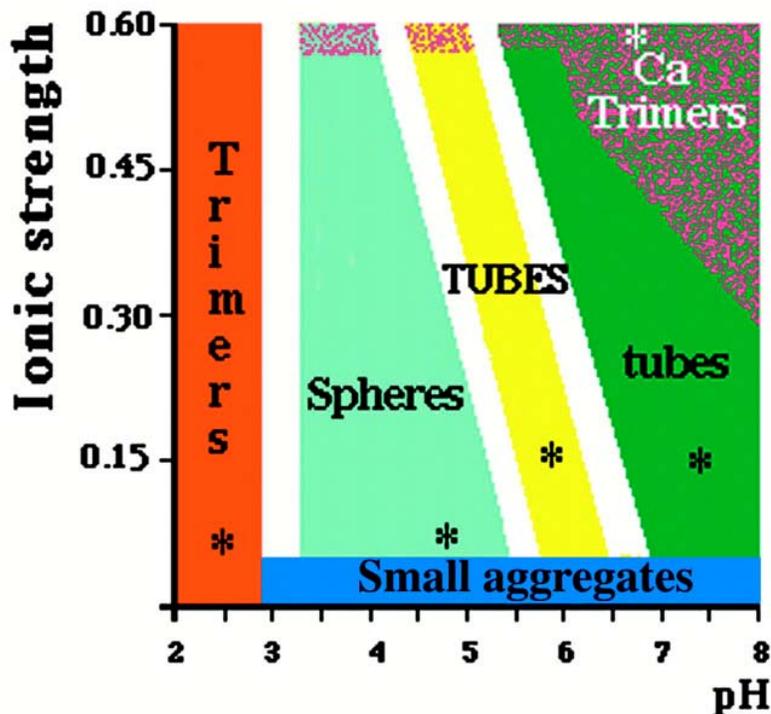


Figura 16. Diagrama de fase (pH y fuerza) de la proteína VP6 (*Lepault et al., 2001*).

#### 4.5 Estructura de los tubos y esferas de la proteína VP6

Los tubos y esferas en su superficie exhiben un enrejado casi hexagonal de trímeros de VP6, claramente visible en las microfotografías electrónicas (*Lepault et al., 2001*). En la reconstrucción en 3D de los tubos grandes y pequeños, la forma de torre del trímero se puede apreciar, donde la cabeza del trímero se expone hacia el exterior en tanto que la base se expone hacia el interior. La cavidad del trímero es claramente visible (Figura 17). Acorde con su simetría se observan tres diferentes tipos de contactos laterales por trímero, uno débil (w, W) a comparación de los restantes que son simples (s) y de doble densidad (d, D1 y D2). Por el tipo de contacto débil los tubos dan la apariencia de estar formados sólo por cintas (que es más claro en los tubos pequeños). En los tubos pequeños los trímeros muestran los tres tipos de contactos, el “w” y en la cinta una conexión de doble densidad (d) y otra simple (s). En los tubos grandes los trímeros únicamente tienen dos tipos de contactos, el W y dos de doble densidad (D1 y D2) (*Lepault et al., 2001*). La Figura 17 muestra las regiones de contacto (laterales) entre trímeros de VP6, son en forma de y, que se extienden después de la base.

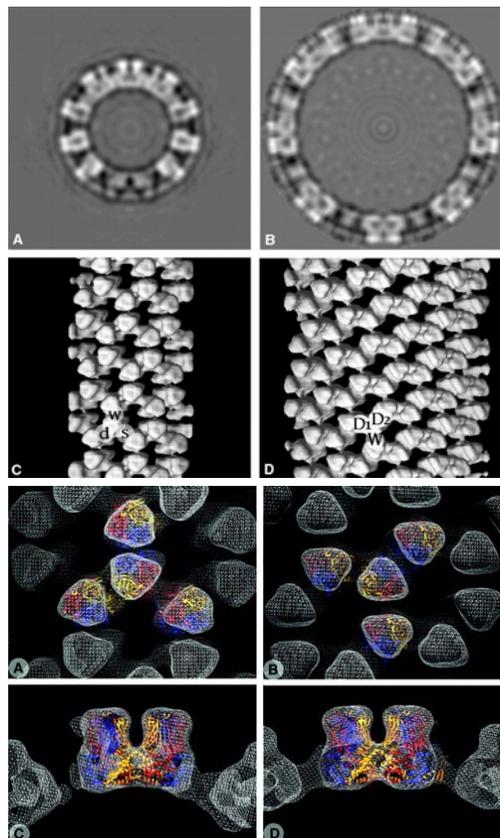


Figura 17. Representación en tercera dimensión de la reconstrucción de los tubos pequeños y grandes. Los tres diferentes tipos de contactos son: débil (w, W), simple (s) y doble densidad (d, D1 y D2). De igual forma se muestra un modelo que muestra los contactos de doble densidad, generado de datos de rayos X, (*Lepault et al., 2001*).

## 5. Objetivos del trabajo

Objetivo general:

La obtención de imágenes de las proteínas virales VP6 depositadas sobre las superficies de grafito pirolítico altamente ordenado mediante la microscopía de barrido de tunelaje, como referencia para los estudios posteriores de nuevos materiales híbridos “proteínas—nanotubos de carbono”.

Objetivos particulares:

- ❑ Investigar los defectos de la superficie del HOPG, que servirán como referencia para la identificación de las binanoestructuras a estudiar.
- ❑ Optimizar el método de depósito de las proteínas VP6.
- ❑ Optimizar los parámetros de voltaje y corriente durante la obtención de las imágenes.
- ❑ Caracterizar el arreglo y la morfología de las nanoesferas de VP6.
- ❑ Caracterizar el arreglo y la morfología de los nanotubos de VP6.

## 6. Materiales y Métodos

Se ocupó un microscopio STM (Nanosurf easyScan E-STM versión 2.1; vea anexo). Las puntas se prepararon de manera mecánica cortando con pinzas un alambre (Nanosurf AG) de 0.25 mm de diámetro de Pt/Ir, los experimentos se llevaron a cabo en condiciones ambientales. El STM se prefirió en modo de corriente constante, con una corriente de túnel de 1.0 pA y voltaje de 0.50 V, en ocasiones estos variaron (lo que se señala en los pies de figura).

Las soluciones de las partículas virales tubulares y esféricas de la proteína VP6 (72 µg/ml) fueron proporcionadas por los Drs. Ramírez, Palomares y Mena, del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La purificación se llevó de acuerdo a la metodología descrita por *Mena et al., 2005*.

Las superficies de grafito pirolítico (Nanosurf easyScan) se prepararon deshojando las capas superiores con cinta diurex e inmediatamente después se depositó 100 µl de solución de la muestra para exponer a una superficie limpia (*Contera et al., 2003*). Las muestras se dejaron secar durante 5 minutos, después se lavaban por 5 segundos con agua destilada para remover el exceso de buffer, y se dejaban secar (aprox. 15 minutos) hasta que no se observaban rastros de la muestra e inmediatamente se observaban en el STM.

Las mediciones como altura, diámetro, longitud y perfiles de las muestras se obtuvieron con el software base del STM, las imágenes que se presentan se trataron con el software (WSxM 4.0, Nanotec Electronica, S.L, Madrid, España).

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 Caracterización de la superficie del grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG)

El grafito pirolítico altamente ordenado es uno de los sustratos más usados en experimentos con STM (*Wang et al., 2006*) para depositar distintas clases de moléculas biológicas (*Sailong et al., 2006; Losic et al., 2006*). Para distinguir adecuadamente las muestras depositadas del sustrato resulta importante la caracterización de la superficie del grafito, ya que se sabe cuenta con defectos que en su morfología y periodicidad pueden confundirse con las muestras depositadas. Muchos estudios se han enfocado en las anomalías del grafito y la relación con sus propiedades electrónicas, otros han documentado con imágenes la morfología de las diferentes estructuras en su superficie (*Atamny et al., 2000*), sin embargo uno de los más interesantes fue el realizado por *Clemmer y Beebe (1991)* donde muestran defectos que podrían confundirse con algunas moléculas biológicas (ADN y proteínas).

Los defectos que se observaron en la superficie del grafito se agruparon de acuerdo a lo sugerido por *Chang y Bard (1991)*. En los experimentos los cortes en **escalón** fueron los defectos que se encontraron con mayor regularidad (*Clemmer y Beebe, 1991*). La Figura 18 muestra escalones de tipo **perfecto** y la Figura 19 de tipo **distorsionado**; estos defectos se identificaron por la diferencia de altura en los dos sitios del escalón (vea flecha en Figura 18B). La Figura 18A muestra tres escalones perfectos de 0.68 nm (*a*), 1.10 nm (*b*) y 0.72 nm (*c*) de altura, valores consistentes con la altura teórica de 2, 3 y 2 capas de grafito (0.35 nm distancia entre dos planos de grafito) respectivamente (*Chang y Bard, 1991*).

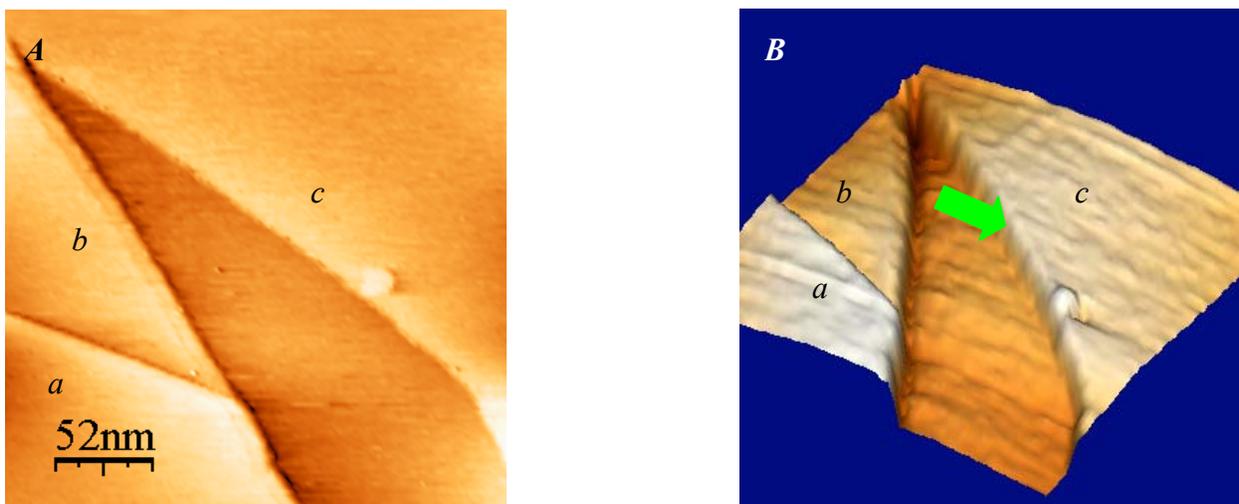


Figura 18. (A) Imagen de tres escalones perfectos señalados como *a*, *b* y *c* (imagen 300 x 300 nm, 1.001 nA, 0.050 V) y su representación en tercera dimensión, la flecha señala la diferencia de altura (B).

Los escalones de tipo distorsionado se observaron aunque con menor regularidad, la Figura 19 es un escalón distorsionado de 0.67 nm de altura, las irregularidades que presenta en su margen le diferencian del escalón perfecto (Figura 19A), su representación en tercera dimensión (Figura 19B) muestra que bajo el escalón hay otro de 3.6 nm de grosor de acuerdo con su perfil (Figura 19C). En los escalones perfectos y distorsionados el arreglo atómico no se pudo observar.

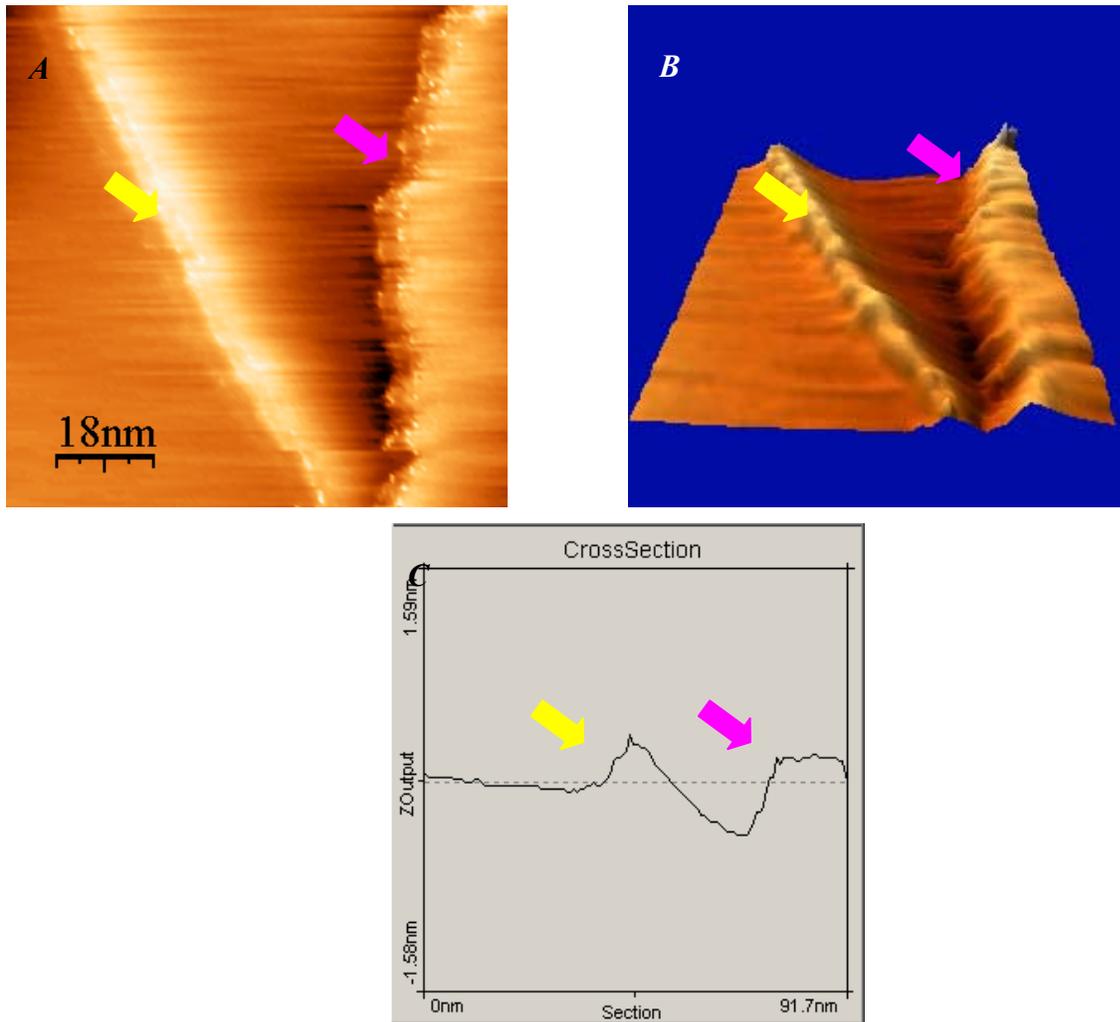


Figura 19. (A) Imagen de un escalón distorsionado de 0.57 nm de altura (imagen 100 x 100 nm, 1.001 nA, 0.050 V), su representación tercera dimensión (B) y el perfil (C), en las tres figuras las flechas negra y blanca señalan el escalón distorsionado y el escalón que emerge respectivamente.

Se observó un sin número de terrazas que cubrían grandes extensiones, un acercamiento en una de ellas mostró que tenía una super periodicidad o **corrugaciones gigantes**, este tipo de defectos se vio en dos ocasiones, se reconocieron ya que son regiones con grandes puntos brillantes con un arreglo bien definido (con apariencia de estructuras triangulares o hexagonales) y límites bien definidos, las imágenes 20 y 21

son secciones de los súper enrejados encontrados, la super periodicidad fue muy evidente ya que se observó en barridos  $> 80$  nm (Figura 20A), un acercamiento sobre el enrejado mostró que tenía una simetría triangular (Figura 20B), de acuerdo con lo medido a lo largo de la línea del perfil marcada en la Figura 20C, la estructura tiene una periodicidad cercana a 3.5 nm (Figura 20D).

Se observó una franja de grafito (Figura 21A), su longitud excedió el rango de barrido, el ancho varió de 32 a 45 nm y la altura fue de 0.62 nm, consistente con la altura teórica de dos hojas de grafito. Un acercamiento sobre la franja, mostró corrugaciones gigantes (Figura 21B) con una periodicidad de 3.3 nm (Figura 21D). A pesar de tener una simetría triangular y valores de periodicidad y similares (Figura 21C), en su morfología hay diferencias, debido probablemente a efectos causados por la punta, sin embargo ambos tipos de enrejados han sido ampliamente reportados (*Wang et al., 2006*).

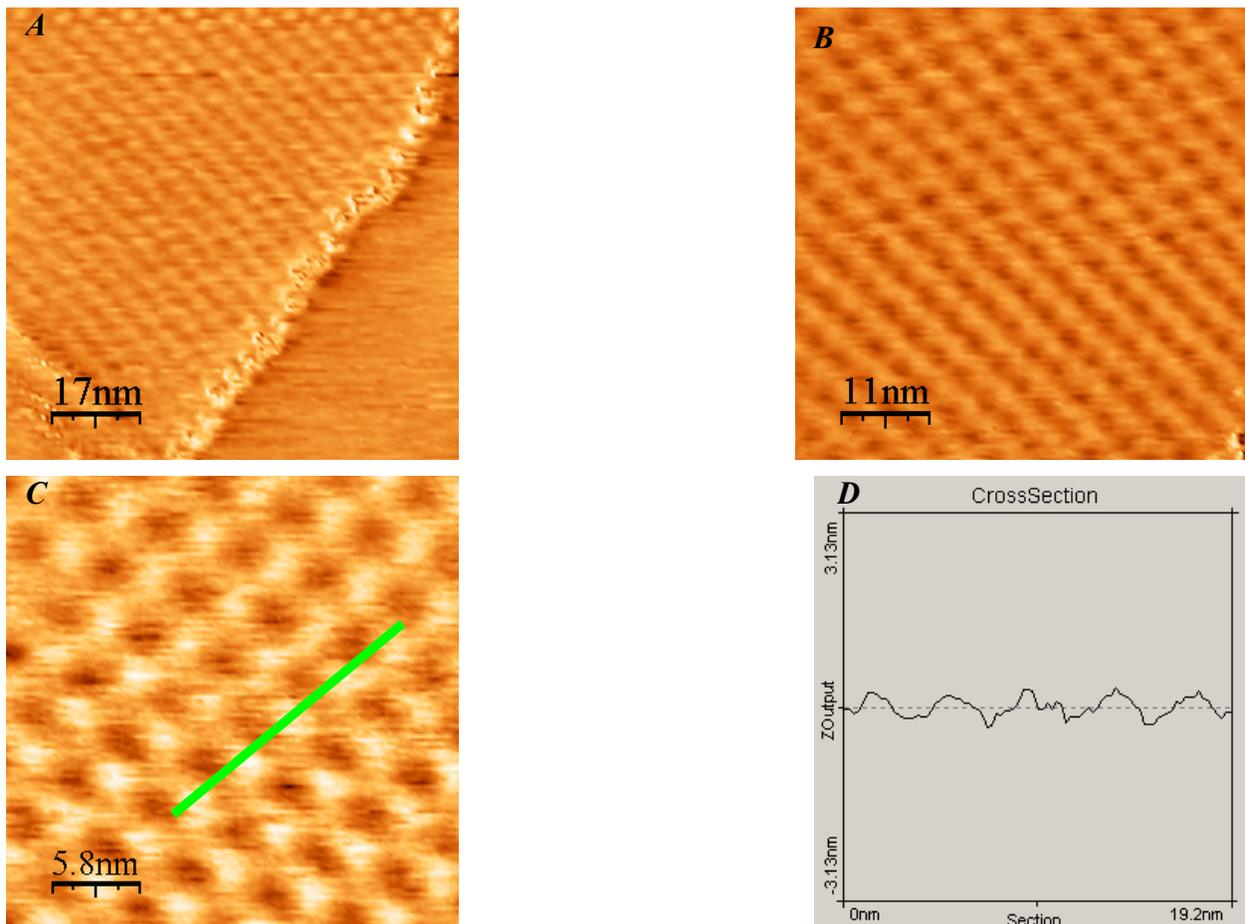


Figura 20. Imagen de super enrejado, que fue visible en barridos  $> 80$  nm (A) (imagen 85 x 85 nm, 1.001 nA, 0.050 V), exhibió una simetría triangular (B y C) (imagen 55 x 55 nm, 1.001 nA, 0.050 V y 29 x 29 nm, 1.001 nA, 0.050 V respectivamente), con una periodicidad cercana a 3.5 nm (D).

Ambos casos fueron altamente reproducibles y permanecieron estables por varias horas (3 a 4 Hrs.), su celda unidad comprende tres sitios  $g-\beta$  (zonas con alto brillo), tres sitios  $g-\alpha$  (zonas de brillo bajo) y un sitio  $g-h$  (zona oscura) vea Figura 21C y D, la celda unidad del super enrejado tiene una analogía con la del grafito, que consiste en tres sitios brillantes  $\beta$ , tres de medio brillo  $\alpha$  y uno de bajo brillo (hueco oscuro), en ambos casos corresponde a tres niveles de estados de densidad electrónica (*Wing- Tat y Durkan 2005*).

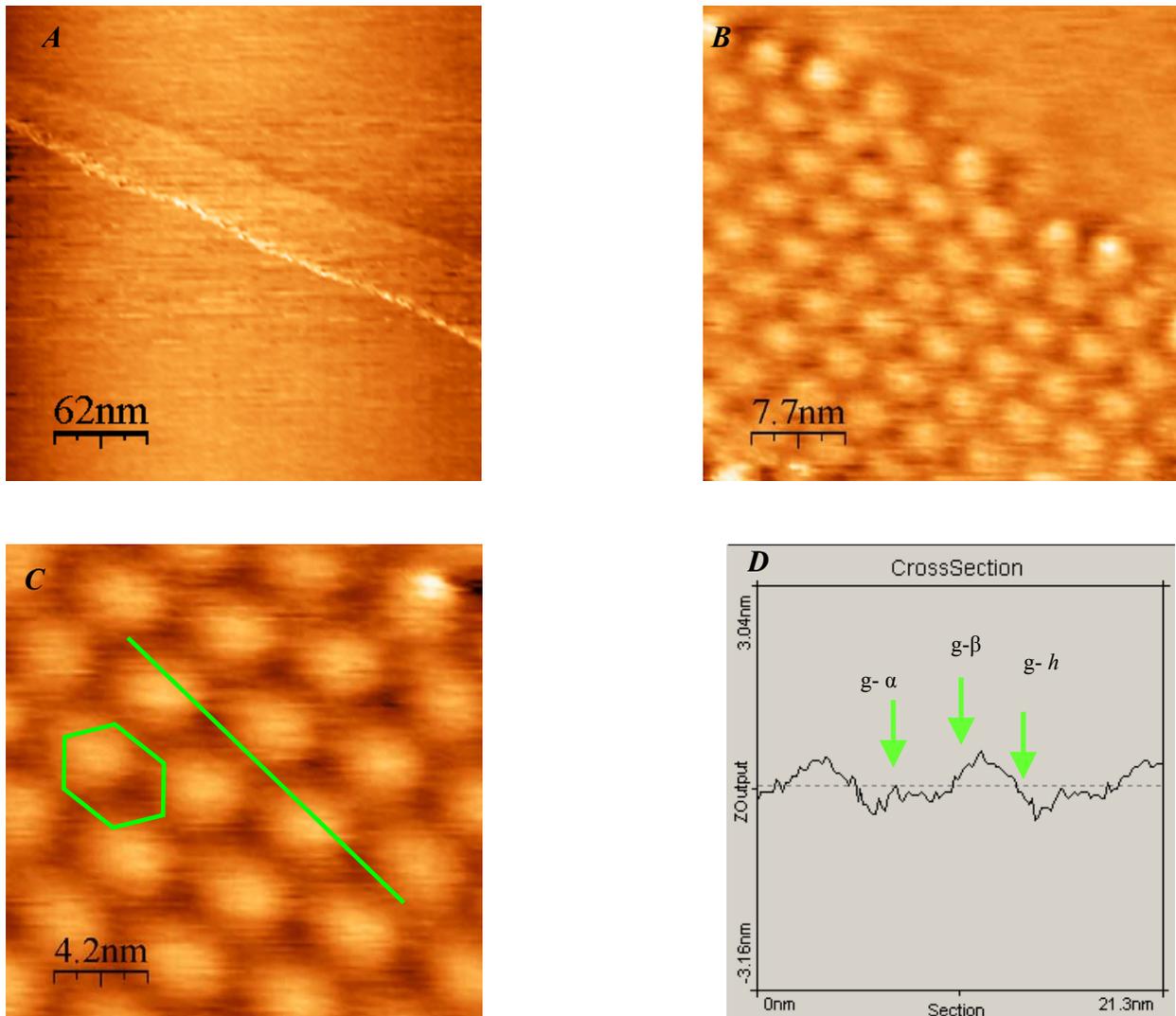


Figura 21. (A) Imagen de la franja de grafito (imagen 310 x 310 nm, 1.001 nA, 0.050 V), (B) al hacer un acercamiento sobre esta revelo un super enrejado (imagen 38.6 x 38.6 nm, 1.001 nA, 0.050 V), (C) con una simetría triangular (imagen 20.9 x 20.9 nm, 1.001 nA, 0.050 V) y (D) el perfil muestra los tres diferentes sitios de la celda unidad.

Las imágenes de super enrejados han sido ampliamente reportadas (*Wang et al., 2006*), se han observado independientemente del tipo de punta empleada (de oro, tungsteno, Pt/Ir), condiciones del barrido ( $V, I$ ) y del modo de operación (corriente o altura constante), se han visto en condiciones ambientales, de igual forma se han reportado en condiciones de alto vacío y en líquido. Su origen se atribuye a diferentes causas como: deformaciones físicas de la superficie, efectos múltiples de la punta, contaminación de la punta, absorción de impurezas (en grafito). Sin embargo la más apoyada por evidencias experimentales, plantea que la formación de los enrejados se debe a la rotación de los patrones de las hojas de grafito, debido a que dos capas (mayas de átomos) rotan y adquieren una orientación diferente una con respecto a la otra y dan la ilusión de formar una celda unidad con características similares a la maya original pero con una super periodicidad (desde 1.7 hasta 44 nm) que puede variar ya que depende del ángulo de rotación entre las dos capas originales (*Wing- Tat y Durkan 2005*).

Otra clase de defectos que ocasionalmente se encontraron fueron estructuras como **hebras** de grafito (Figura 22). Sus longitudes superaban el rango de barrido (625 nm), el ancho varió a lo largo de la cadena (10 a 14 nm). A pesar de que su morfología no pudo ser discernida por completo, se observó que tenía torsiones a lo largo de la cadena. Según *Chang y Bard (1991)* este tipo de estructuras presentan torsiones y de igual forma mencionan que las cadenas se forman de delgadas líneas de grafito que se separan de un escalón al deshojar la superficie ya que se han encontrado que surgen de cortes en escalón, lo que se puede apreciar en las imágenes obtenidas de las cadenas e inserto en Figura 22B.

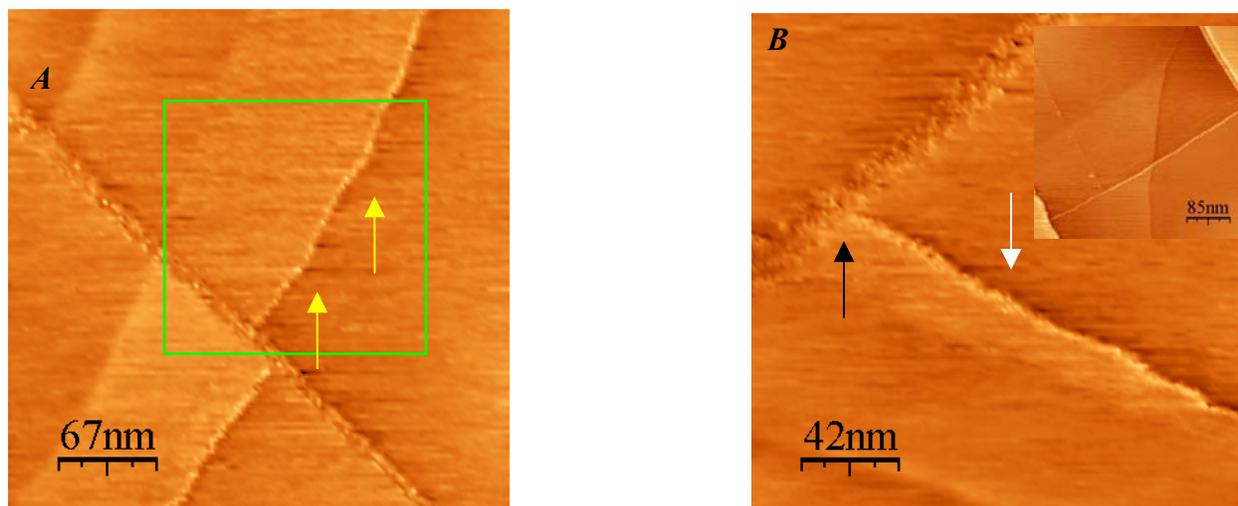


Figura 22. Hebras de grafito, (A) dos cadenas de grafito, la superior de mas de 120 nm y la inferior de 80 nm, en la imagen de lado derecho se muestra la sección de la cadena superior (cuadro en color verde) donde se puede apreciar de forma mas clara que surge de un escalón (flecha negra; imagen 333 x 333 nm, 1.001 nA, 0.050 V), de igual forma en ambas imágenes se puede apreciar la torsiones en las cadenas (flechas blanca; imagen 210 x 210 nm, 1.001 nA, 0.050 V).

Se encontraron estructuras como fibras, en su mayoría se les encontró aglomeradas (Figura 23), en todos los casos las dimensiones de las fibras excedieron el rango de barrido (620 nm). Tanto la morfología y el arreglo paralelo de las fibras fue consistente (Figura 23A y C), el ancho de las fibras vario de 3.5 a 31.0 nm. Este tipo de defectos se forman de la fragmentación de delgadas líneas de grafito que se desprenden de escalones múltiples al preparar una superficie nueva (*Chang y Bard, 1991*), que corresponde con las dimensiones de las fibras encontradas (3.5 a 31.0 nm), ya que son múltiplos de la distancia entre los planos de grafito. Así mismo se observó un grupo de fibras que daban la apariencia de ser hojas de grafito que se solapaban (Figura 23B), poniendo en duda que sean fibras o escalones ya que *Clemmer y Beebe (1991)* mencionan que hay escalones rectos que corren en paralelo y que pueden atravesarse unos con otros en todas direcciones.

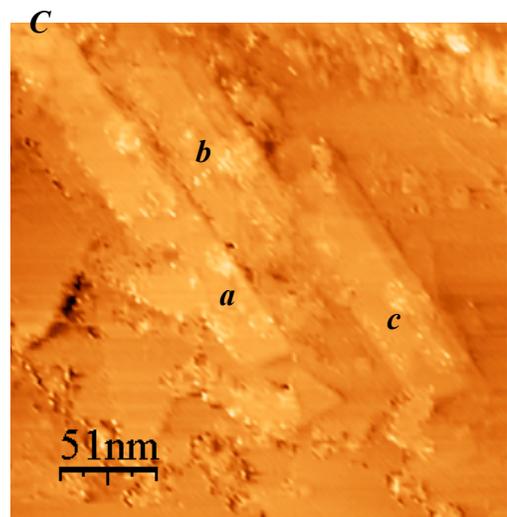
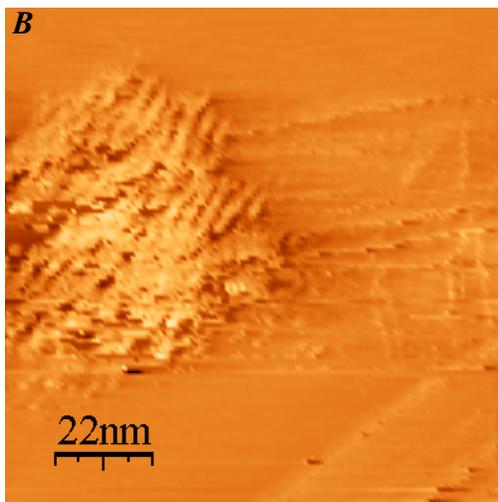
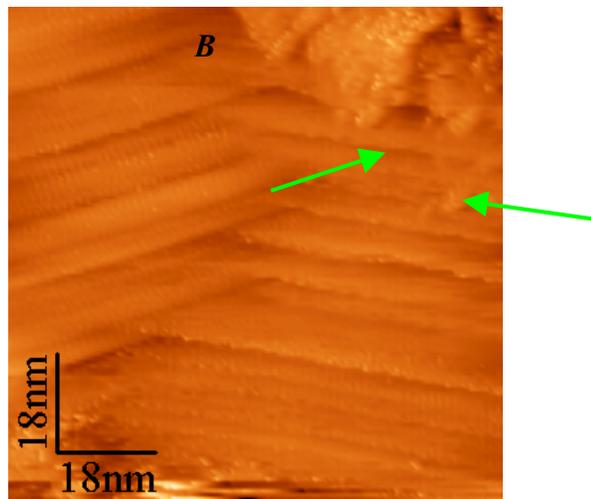
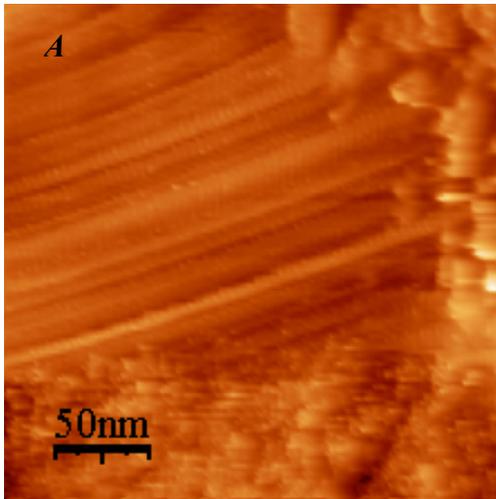


Figura 23. (A) Imagen de grupo de fibras que superaron el rango de barrido (imagen 251 x251 nm, 1.001 nA, 0.050 V), (B) hojas de grafito solapadas (116x116 nm, 1.001 nA, 0.050 V), (C) imagen de fibras en empalizada (imagen 88 x 88 nm, 1.001 nA, 0.050V), (D) fibras en forma de barras (imagen 257 x257 nm, 1.001 nA, 0.050 V).

Se encontraron dos clases más de morfologías para las fibras, la primera en empalizada (Figura 23C) el tamaño de las fibras vario de 3.6 a 4.0 nm de ancho y de 15 a 25 nm de longitud, la morfología fue consistente, dieron la apariencia de estar formadas de ser partículas de carbón unidas. La segunda fue como en barras de 35.3 nm (*a*), 39.0 nm (*b*) y 37.7 nm (*c*) de ancho y su longitud > 100 nm. En todos los casos las fibras debido a su forma y arreglo dieron la apariencia de no estar unidas al sustrato, según *Chang y Bard (1991)* este tipo de defectos no están unidos al sustrato y ocasionalmente se pueden mover con la punta del STM.

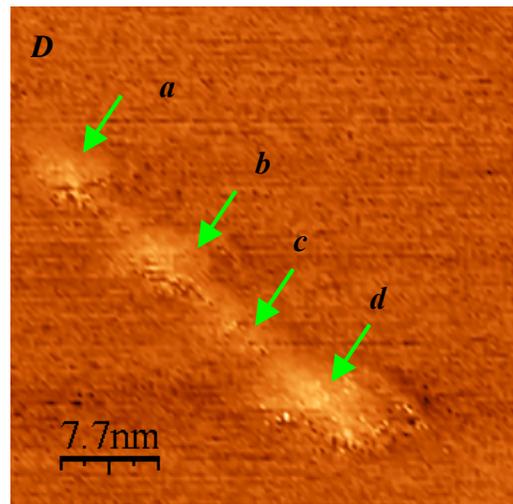
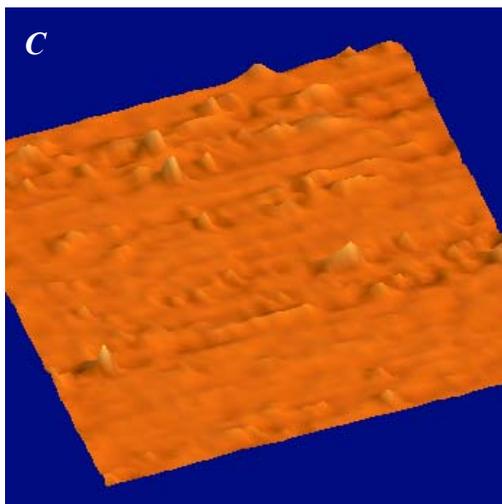
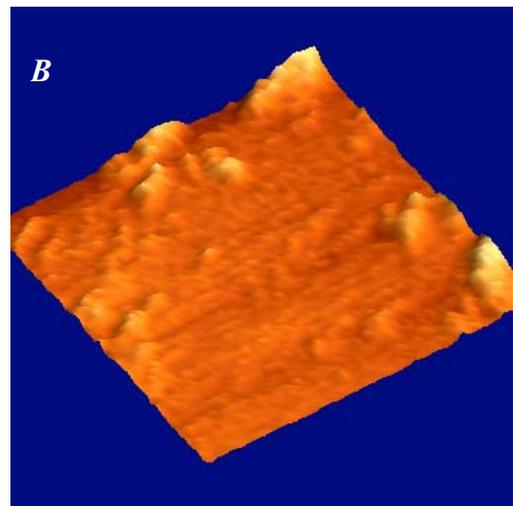
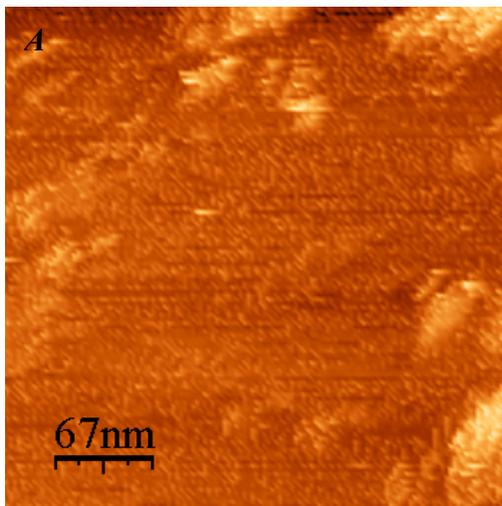
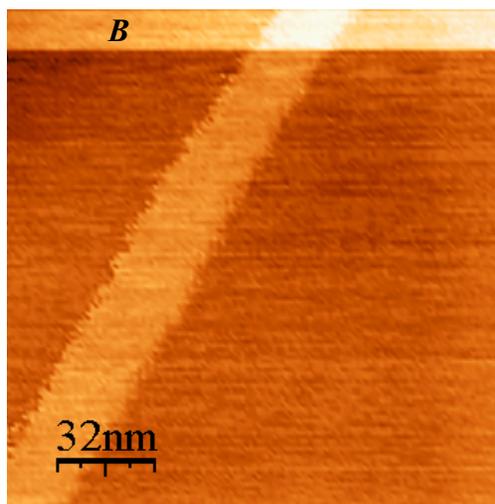
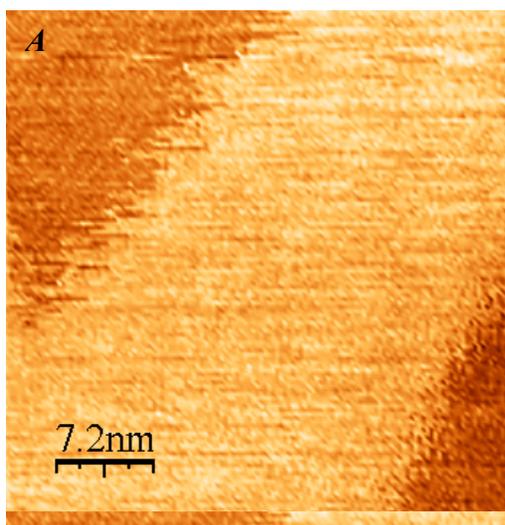


Figura 24. Imagen de partículas de carbón (A) distribuidas heterogéneamente (imagen 3.35 x 3.35 nm, 1.001 nA, 0.050 V) y su representación en tercera dimensión (B), representación en tercera dimensión de partículas de carbón, C. Partículas de grafito de 3.63 nm (a), 4.78 nm (b) y 7.15 nm (c) (D imagen 38.4 x 38.4 nm, 1.001 nA, 0.050 V).

Los defectos mostrados en la figura 24 son partículas de carbón, distribuidas heterogéneamente, el tamaño y la forma no es uniforme como en los defectos que hemos mencionado. En figura 24A se muestran partículas con longitudes de 11 a 51 nm. Fueron visible en barridos menores a 300 X 300 nm, en la figura 24 C hay partículas casi esféricas con diámetros de 4.7 a 12 nm y alturas alrededor de 3.1nm, en 24D se muestran cuatro partículas que parecen estar unidas como en rosario, sus diámetros fueron de 3.63 nm (a), 4.78 nm (b), 4.95 nm (c) y 7.15 nm (d), la altura fue alrededor de 1.06 nm. La obtención de imágenes de partículas de grafito se dificulta, esto probablemente debido a que las partículas pueden afectar el mecanismo de formación de la imagen.



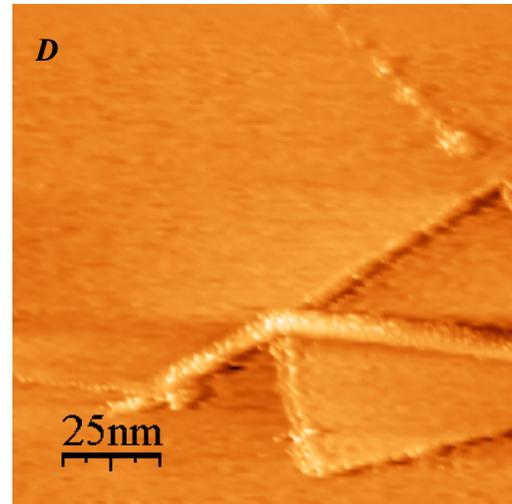
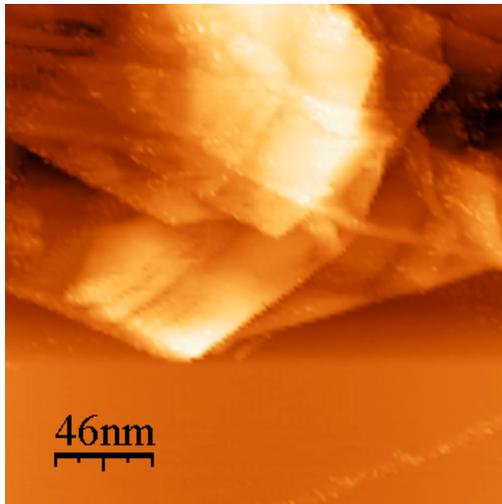


Figura 25. (A) Imagen de partículas ultra pequeñas de carbón (imagen 161 x 161 nm, 1.001 nA, 0.050 V), (B) máximo acercamiento que se pudo resolver para las particular de A (imagen 35.8 x 35.8 nm, 1.001 nA, 0.050 V). (C) Hojas de grafito plegadas (imagen 232 x 232 nm, 1.001 nA, 0.050 V) y (D) piezas de grafito roto (imagen 123 x 123 nm, 1.001 nA, 0.050 V)

Otra clase de defectos se muestran en la figura 25A y B, las partículas ultra pequeñas se observaron distribuidas homogéneamente y formando una línea, de acuerdo a su perfil (no mostrado) su altura es de 0.25 nm, por lo cual las partículas estarían formadas por unos cuantos átomos, la resolución atómica no se pudo obtener (Figura 25B), las partículas de carbón probablemente son piezas de carbón fragmentado.

La figura 25C muestra **hojas de grafito plegadas** (Folded-over Flakes) que son resultando de la aglomeración de pequeñas piezas de grafito como hojuelas que se desprenden al preparar una superficie nueva. En la figura 25D se muestran **piezas rotas de grafito**, este tipo de defectos tienen diferente forma y tamaño (Chang y Bard, 1991).

Se sabe que las superficies deshojadas con cinta adhesiva contienen una cubierta con grandes áreas con defectos en comparación con aquellas deshojadas con navajas (Wing- Tat y Durkan 2005). La presencia de escalones al igual que las piezas de carbón varió en los tres diferentes sustratos de grafito que se emplearon, ya que en unos se encontraron con mayor regularidad que en otros. Atamny y colaboradores (1997) sugieren que la probabilidad de encontrar defectos de una muestra a otra depende de la calidad del grafito debido a las condiciones de fabricación. De igual forma podría atribuirse al método empleado para deshojar las superficies ya que no se puede controlar las características de la superficie producida.

Con las imágenes obtenidas se demuestra la superficie de grafito pirolítico cuenta con una gran cantidad de defectos que varían en tamaño y forma, sin embargo, no se encontraron estructuras que en su

morfología pudieran confundirse con nanoestructuras tubulares y esféricas que serán depositadas en su superficie.

## **7.2 Optimización del proceso de depósito**

Al trabajar con las proteínas virales en el STM, la preparación de las muestras fue una de las principales limitaciones de la técnica, se empleó el método más común, consistió en depositar una gota de solución de la muestra en la superficie del sustrato y dejar secar. La muestra depositada formó una película blanca, que se distinguía del sustrato, parte de la muestra se acumuló alrededor del eje de la gota (vea flechas en Figura 26A). Al analizar la muestra en STM se apreciaron grandes agregados de distinto material, la Figura 26B es un barrido de 156 x 156 nm difícil de interpretar, en la parte superior hay una gran cantidad de material, en la Figura 26D se muestra un barrido de 317 x 317 nm donde prácticamente la ventana está cubierta de material, en la mayoría de los casos el barrido fue muy complicado corroborando que el grosor de la muestra es importante al trabajar con STM (*Heim et al., 1997*).

Debido a los inconvenientes encontrados se decidió que después de depositar la muestra y dejar secar por 5 minutos, se realizara un lavado de la superficie por 5 segundos con agua destilada. Con el lavado la película en la superficie no fue visible y su análisis mediante STM se facilitó.

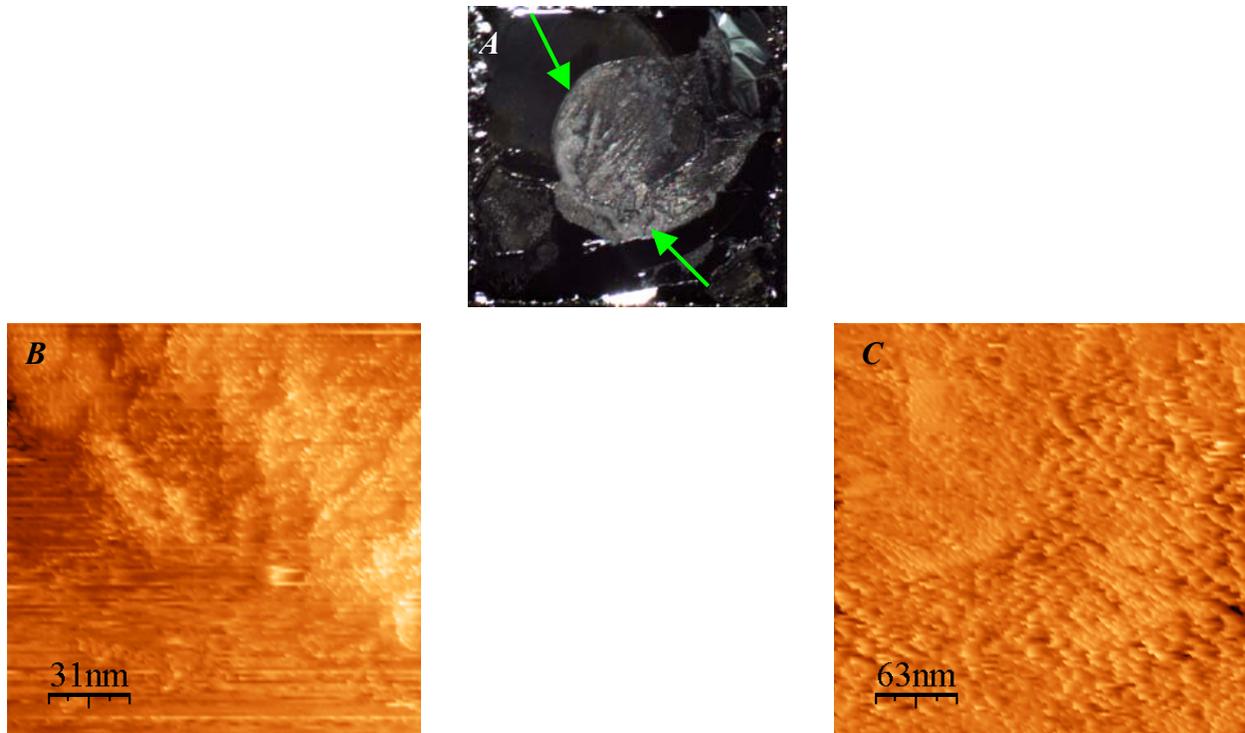


Figura 26. Fotografía de microscopio estereoscópico de gota de muestra depositada en la superficie de grafito (A), las flechas indican las zonas de acumulación de materia; (B y C) Imagen de agregados de la muestra (imagen 156 x 156 nm, 1.001 nA, 0.050 V e imagen 317 x 317 nm, 1.001 nA, 0.050 V respectivamente).

### 7.3 Imágenes de proteínas virales depositadas en la superficie de HOPG

#### 7.3.1 Nanoestructuras globulares de proteínas virales

En los experimentos se encontraron dos clases de estructuras:

La primera son estructuras de 11 a 21 nm de ancho y de 19 a 32 nm de largo, se les encontró aglomeradas. La figura 27A muestra las estructuras globulares, su forma fue consistente y se aprecia que hay contacto entre ellas. Al realizar un acercamiento sobre las esferas encerradas en el recuadro verde de la figura 27A, se ve un poco más claro el contacto entre ellas, incluso la punta no pudo resolver el borde de las dos esferas señaladas con flechas en la figura 27B. El efecto pudo deberse a que estando las esferas muy próximas y la punta al no ser atómica, no resolvió los bordes de las esferas y los tomó como una superficie continua.

La orientación de las estructuras no fue consistente, por lo que no se puede establecer una relación entre el sustrato y la orientación de las estructuras. La Figura 28A y B muestran la alta resolución obtenida de la estructura enmarcada en 27B, su morfología interna mostró como cadenas curvadas que formaban

horquillas de 1.5, 2.0, 2.5 y 4.5 nm de diámetro interno, lo que se aprecia más claro en la representación en tercera dimensión (Figura 28C). Las dimensiones de las estructuras globulares son muy superiores a las del trímero (9.5 nm de largo, de 4.5 a 6.0 nm de ancho) de proteína VP6 (*Mathieu et al., 2001*). Debido a la apariencia y tamaño de las estructuras posiblemente son pequeños agregados de cadenas peptídicas.

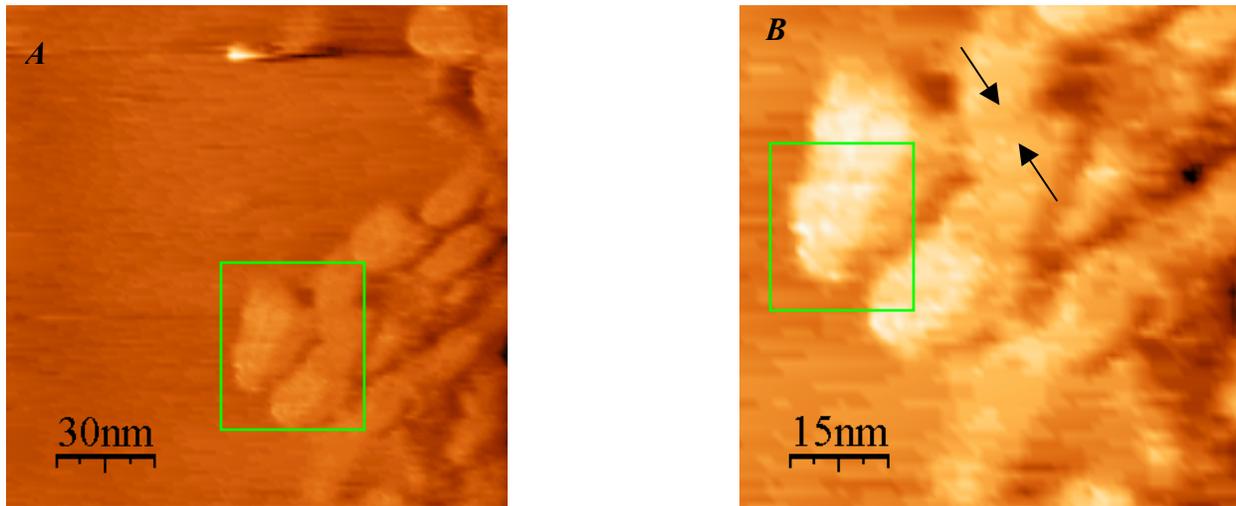


Figura 27. Imágenes de estructuras globulares (A imagen 156 x 156 nm, 1.001 nA, 0.050 V) y (B 75.4x75.4 nm, 1.001 nA, 0.050 V).

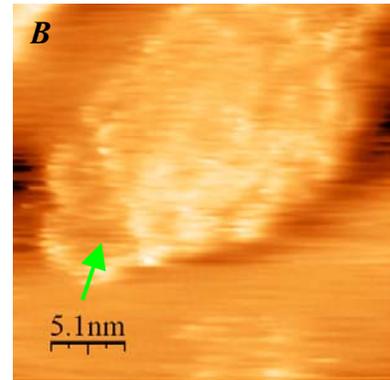
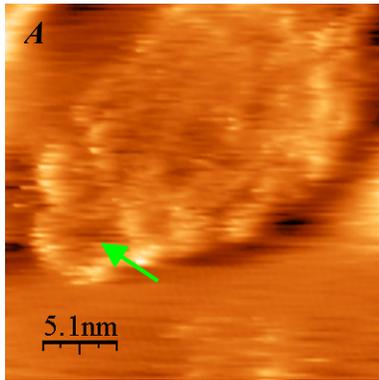


Figura 28. (A y B) Alta resolución de agregados globulares, se pueden observar las horquillas formadas por cadenas de péptidos (A, imagen 25.6 x 26.6 nm, 1.001 nA, 0.050 V; B, imagen 25.6 x 26.6 nm, 1.001 nA, 0.050 V) y su representación en tercera dimensión de 28A.

La segunda clase fueron estructuras de 35 a 51 nm de diámetro y de 1.50 a 5.0 nm de altura, se les encontró formando agregados y aisladas (Figura 29). Su morfología es diferente de las globulares por ser más redondeadas y conservándolo a pesar de estar aglomeradas.

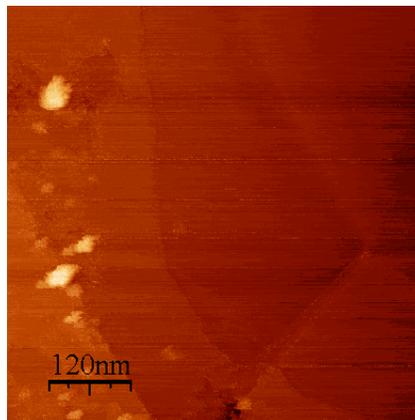


Figura 29. Imagen de esfera aislada de 44 nm de diámetro (imagen 624 x 624 nm, 1.001 nA, 0.050 V).

La figura 30 muestra una esfera de 51 nm de diámetro y 5 nm de altura (inserto en 30A), alrededor de la esfera hay partículas que pueden ser residuos de la solución amortiguadora. La esfera tiene rasgos de degradación (señalados en 30B), el fragmento faltante en la esfera (señalado con una flecha negra) posiblemente fue removido por la punta del STM y colocado a un costado de la esfera (vea flecha blanca) ya que las dimensiones del fragmento coinciden con el hueco en la esfera. Estudios previos han mostrado que si la fragmentación ocurrió por la interacción con la punta del STM, restos de las partes de la muestra se mantendrían en la superficie (Campbell *et al.*, 2007), que es el caso mostrado. Se realizaron dos barridos sobre la esfera rotando 45° y 170°, examinando el piso de las imágenes en los distintos barridos no hubo cambios en la superficie del HOPG, lo que nos indica que la punta no se contaminó y no sufrió cambios. A pesar de esto se encontró una dificultad para obtener una alta resolución de la esfera ya que al realizar un acercamiento la interacción fue evidente (Figura 30C), contaminando la punta e impidiendo continuar con su análisis. La interacción punta-muestra es común al trabajar con muestras biológicas (Alliata *et al.*, 2004).

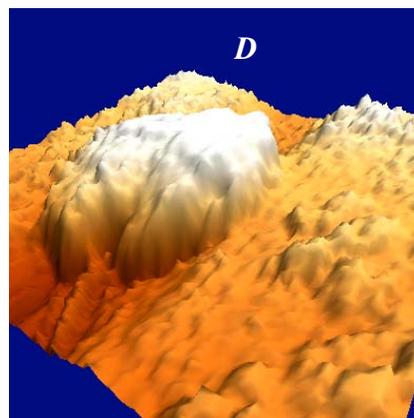
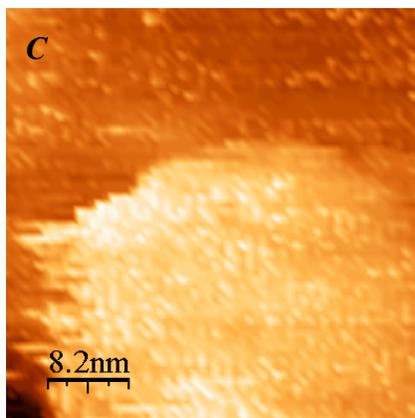
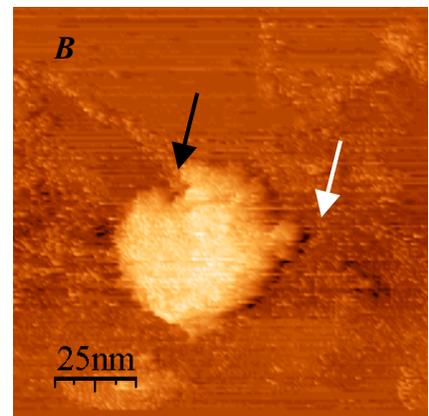
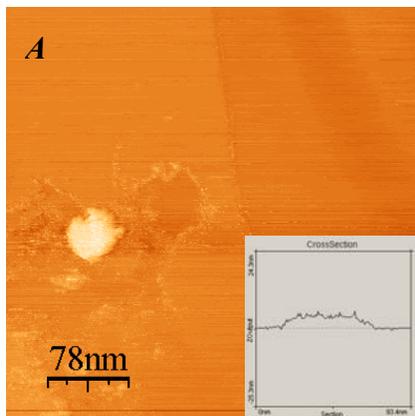


Figura 30. (A) Imagen de esfera de 51 nm de diámetro y 5 nm de altura inserto (imagen 390 x 390 nm, 1.001 nA, 0.050 V), (B) rasgos de degradación de la esfera (imagen 126 x 126 nm, 1.001 nA, 0.050 V), (C) debido a la interacción (punta-muestra) la punta se contaminó (imagen 40.8 x 40.8 nm, 1.001 nA, 0.050 V), (D) representación en tercera dimensión de imagen B.

En la figura 31A se señalan dos esferas de 40 nm de diámetro y 1.5 nm de altura. Como en el caso anterior (Figura 31A) las esferas fueron visible en barridos  $>350$  nm. Las esferas se encontraron cerca de escalones, como en algunos casos anteriores (Datos no mostrados). Un acercamiento sobre la esfera señalada en 31A mostró rasgos de degradación: un fragmento fue fracturado y desplazado sobre un escalón de dos capas (0.7 nm de altura; Figura 31B), lo que pudo deberse a la interacción punta-muestra. La alta resolución de la esfera se muestra en la figura 31C, donde se observan estructuras esféricas, de 1.27 nm de diámetro. Las dimensiones son muy reducidas para que sean trómeros de proteína VP6 (cabeza 4.5 nm). La simetría de la esfera no se pudo observar.

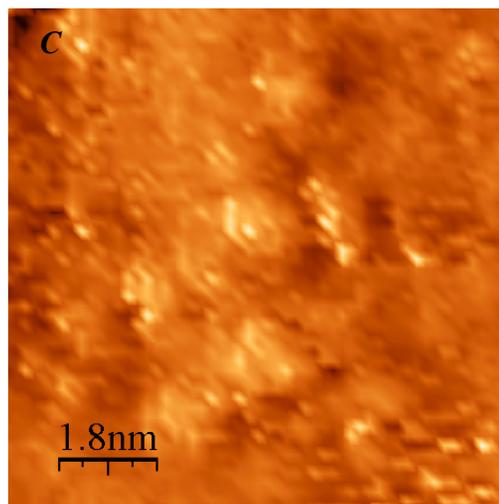
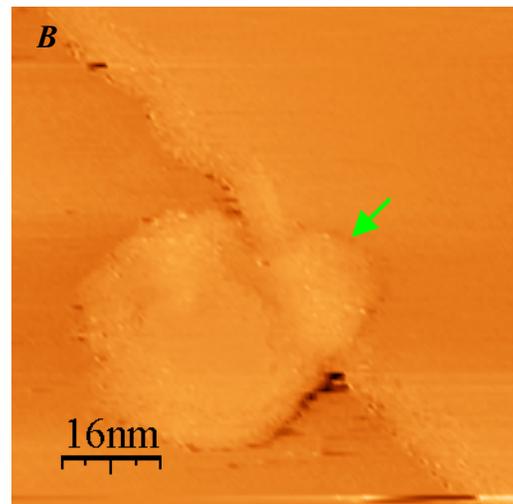
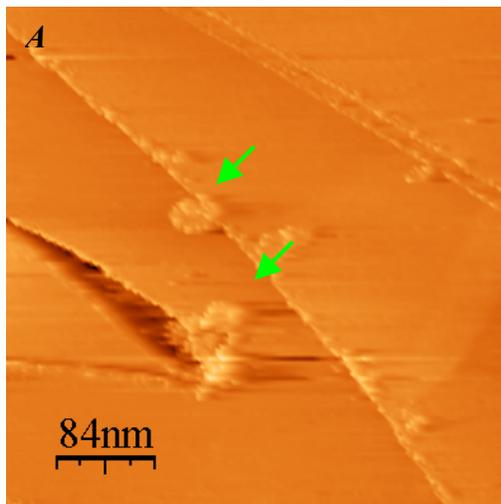


Figura 31. (A) Imagen de dos esferas de 40 nm de diámetro y 15 nm de altura (imagen 419 x 419 nm, 0.821 nA, 0.050 V), (B) esfera fragmentada (imagen 84.1 x 84.1 nm, 10.62 nA, 0.050 V), (C) alta resolución de la esfera (imagen 8.8 x 8.8 nm, 0.217 nA, 1.45 V).

De acuerdo con los datos de microscopía electrónica y criomicroscopía electrónica, las esferas de la proteína VP6 presentan dimensiones heterogéneas, el diámetro más observado es de 75 nm (*Lepault et al., 2001*). En las esferas analizadas en este trabajo, el diámetro más cercano al valor de referencia es de 51 nm que resulta inferior, tomando en cuenta que hay diámetros heterogéneos y que el más observado es de 75 nm que corresponde con el diámetro de los tubos grandes de la proteína VP6. De acuerdo con los resultados obtenidos, se sugiere que hay esferas de 35 a 51 nm de diámetro, que tendría una relación con los tubos pequeños de la proteína con un diámetro de 45 nm, valor cercano a las dimensiones observadas en las esferas a través del STM.

Las alturas de las esferas fueron demasiado reducidas (de 1.5 a 5 nm). Según *Alliata et al., (2004)* esta es una característica común mostrada por las biomoléculas cuando son vistas por STM, y se puede atribuir a su pobre conductividad con respecto a la del sustrato. Otra causa pudiera ser que el voltaje empleado fue muy bajo  $V = 0.050$  V ya que estudios previos han mostrado la dependencia de la altura aparente de la molécula con el voltaje aplicado, resultando la altura relativa en el STM y no característica de la morfología de la molécula (*Shapir et al., 2005*).

La alta resolución de las esferas de la proteína VP6 no pudo ser alcanzada, podemos pensar en dos posibles razones: la primera, debido a la pobre conductividad de las esferas, la interacción de la punta con la muestra fue un factor que impidió un barrido donde la punta no se contaminara con la muestra. La segunda, que la morfología de las puntas empleadas no fue la óptima, ya que una forma aguda es necesaria para una alta resolución de las estructuras, particularmente al trabajar en condiciones ambientales (*Campbell et al., 2006*).

En la mayoría de los casos, las esferas se encontraron cerca de escalones (imagen 29A y 31A) y sólo una esfera fragmentada en el margen del escalón. Este resultado sugiere que la adsorción de los agregados esféricos es más probable que ocurra en el plano basal hidrofóbico.

### 7.3.2 Nanotubos de proteínas virales

En la sección cuatro se mencionó que se realizó un lavado de la superficie de la muestra, debido a los grandes agregados de material que se encontraban. La figura 32, que se obtuvo en los primeros experimentos sin el lavado, muestra cinco estructuras rectas cubiertas de gran cantidad de material, el ancho fue de 42 a 51 nm, su morfología fue consistente: se distinguieron tres líneas que corrían paralelas a lo largo, la distancia entre ellas fue de 13 a 31 nm. Debido a la cantidad de materia que les cubría, su longitud no se pudo medir, pero se estima sean  $>200$  nm, las dimensiones de las estructuras son cercanas a las conocidas para los nanotubos pequeños de la proteína VP6. Se encontraron 5 estructuras. *Mena et al., (2006)* menciona que los tubos forman típicamente grupos de 4 a 5, sin embargo, debido a la morfología que presentaron las estructuras, no se puede asegurar que sean nanotubos de proteína.

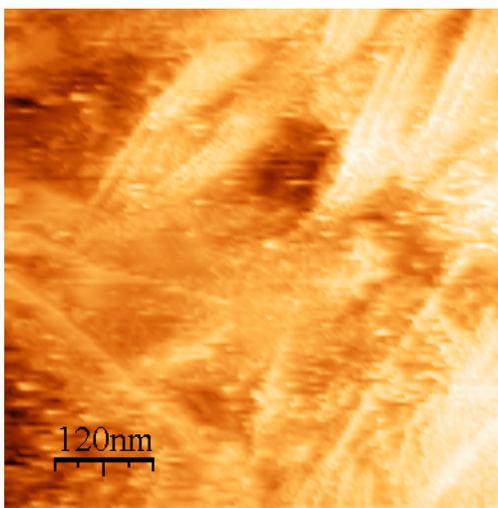


Figura 32. Imagen de estructuras rectas de 42 a 51 nm de diámetro (imagen 624 x 624 nm, 1.0 nA, 1.80 V).

En los experimentos posteriores las estructuras tubulares fueron muy comunes. Se sabe que en la superficie del grafito se pueden formar estructuras tubulares de 46 a 54 nm de diámetro y de 1.56 a 2.63 nm de altura (*Sun et al., 2002*) en condiciones naturales, las dimensiones son muy parecidas a las conocidas para los nanotubos pequeños de la proteína VP6 (45 nm). Para diferenciar los nanotubos de la proteína de posibles tubos de grafito, se variaron los parámetros de voltaje ( $V$ ) y corriente ( $I$ ) al realizar el barrido de los tubos, ya que estudios previos han mostrado que las imágenes de grafito son muy estables y

no cambian con grandes variaciones de los parámetros a diferencia del material orgánico (*Chang y Bard, 1991*). La figura 33A se obtuvo con una corriente de 1.0 nA y un voltaje de 0.050 V. En figura 33B se demostraron los efectos al cambiar los parámetros a 0.0244 nA y 0.0198 V, por lo que sugerimos que las estructuras son tubos orgánicos. Este método se empleó para diferenciar los tubos de la proteína VP6 de los de grafito.

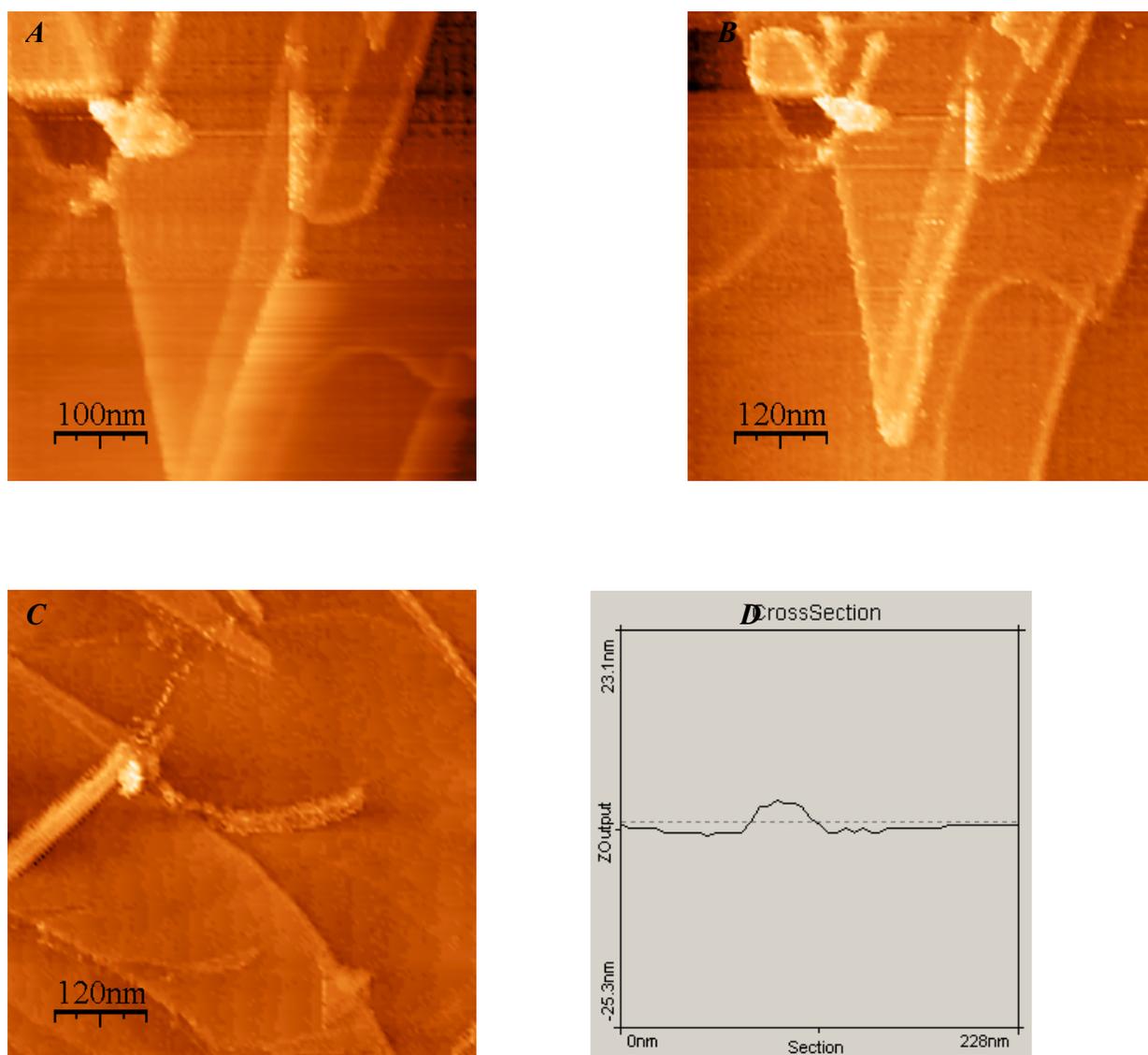


Figura 33. La imagen B muestran los efectos al cambiar la corriente 1.0 nA y el voltaje 0.050 V a 0.0244 nA y 0.0198 V los efectos en la imagen se tomaron en cuenta para diferenciar los tubos orgánicos de los de grafito (imágenes 624 x 624 nm); (C) Imagen de tubo de 51 nm de diámetro (imagen 624 x 624 nm, 1.0 nA, 0.15 V) y 4nm de altura de acuerdo con su perfil (D).

Los tubos de proteína no revelaron un arreglo definido en la superficie del grafito (Figura 33A), mostraron ser adsorbidos en una relativa rectitud y ocasionalmente curvos, otros daban la apariencia de formar horquillas, unos se sobreponían sobre otros, de igual forma se encontraron tubos rectos que corrían en paralelo. Los diámetros de los tubos variaron de 37 a 51 nm, su altura de 1.5 a 4.0 nm, las longitudes no pudieron ser determinadas ya que la mayoría de los tubos salían del rango de barrido del STM, o en algunas ocasiones se les encontró cubiertos por algunos residuos de la muestra que no pudieron ser eliminados durante el lavado. La Figura 33C muestra un tubo de 51 nm de diámetro y 4.0 nm de altura según su perfil (vea Figura 33D). La Figura 34A muestra la representación en tercera dimensión de un tubo de 35 nm de diámetro.

De acuerdo con los datos de microscopia electrónica y criomicroscopía electrónica, las longitudes oscilan en varios micrómetros (*Lepault et al., 2001*). Sus valores podrían ser semejantes a los conocidos para los tubos de la proteína  $\alpha$ -lactalbúmina con 5  $\mu\text{m}$  (*Graveland-Bikker et al., 2006*) y superiores a las conocidas para el virus del mosaico del tabaco (TMV) que llegan hasta los 300 nm (*Knez et al., 2006*).

En la Figura 34B se muestra un tubo de 37 nm de diámetro, que en su extremo superior tenía material acumulado. Este defecto se observó en algunos tubos, los agregados pudieron formarse debido a la fuerte interacción que existe entre los trímeros de proteína (*Mathieu et al., 2001*).

Los nanotubos que se encontraron fueron muy escasos (15 tubos). Estudios previos mencionan que únicamente en imágenes de microscopia de tubos pequeños trímeros aislados de VP6 son visibles, sugiriendo que los tubos pequeños son menos estables que los tubos grandes y las esferas (*Lepault et al., 2001*). Por lo que suponemos que al depositar los tubos en la superficie del grafito estos pudieron colapsar, lo que explicaría la presencia de trímeros de VP6 (Figura 35A) y la gran cantidad de aglomerados.

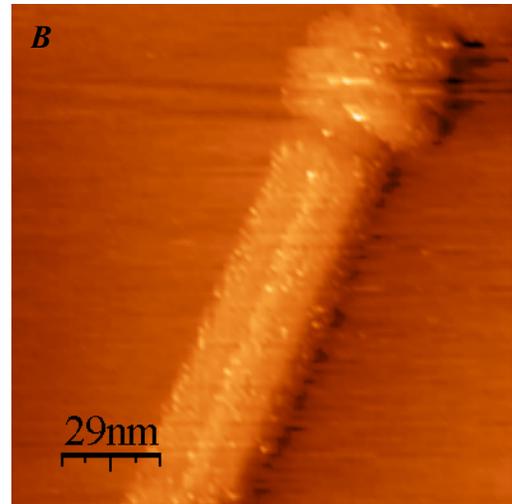
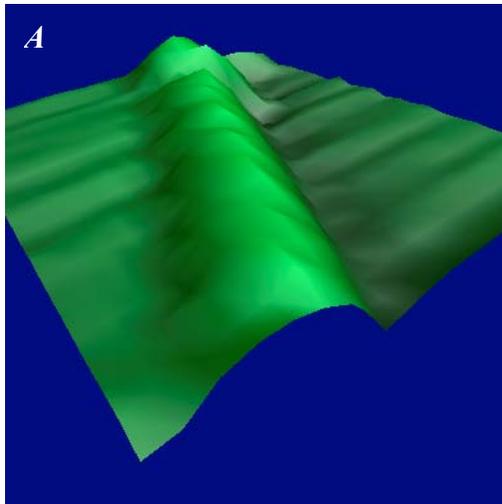


Figura 34. (A) Representación en tercera dimensión de un tubo de 40 nm de diámetro (imagen 145.8 x 145.8 nm 1.0 nA 0.050 V); (B) imagen de un tubo con materia en un extremo (imagen 145.8 x 145.8 nm 0.226 nA 0.0299 V).

Estos trímeros de VP6 encontrados (Figura 35A), de acuerdo con su perfil tienen 9.66 nm de longitud, 6.09 nm de ancho de la base que corresponde con el valor de un lado de su base triangular, 4.9 nm de ancho de la cabeza que correspondería con el diámetro de la cabeza hexagonal, las dimensiones corresponden con las reportadas por *Mathieu et al., (2001)*. Su perfil tomado transversalmente mostró que tiene una depresión de 0.35 nm en el centro del trímero tomando como referencia la base de la molécula. La depresión así como sus dimensiones son característica de los bloques de construcción de las nanoestructuras.

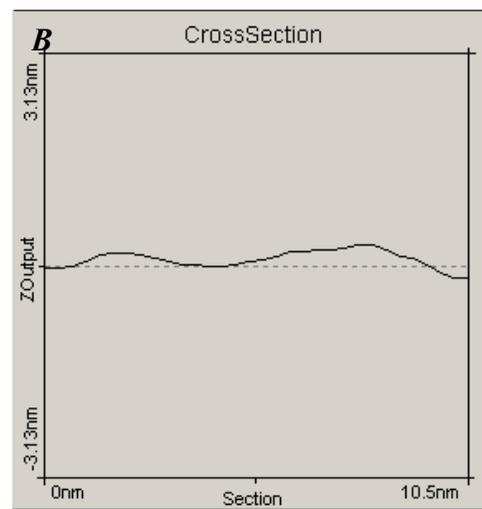
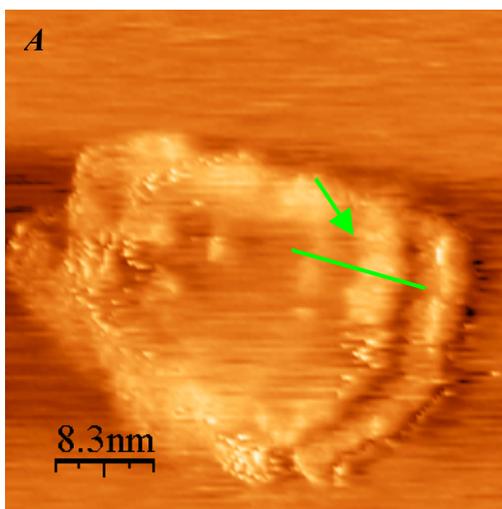


Figura 35. (A) Imagen de un trímero de proteína VP6 (imagen 41.7 x 41.7 nm, 1.0 nA, 0.050 V); (B) perfil del trímero de proteína VP6.

La alta resolución de los tubos de VP6 no pudo ser alcanzada, lo que pudo deberse a que la morfología que tenían las puntas no fue la adecuada, ya que una forma aguda es necesaria para una alta resolución de las estructuras particularmente al trabajar en condiciones ambientales (*Campbell et al., 2006*). En la mayoría de los casos los tubos se encontraron en el plano basal del grafito, y sólo en dos ocasiones cerca de escalones, lo que sugiere que la adsorción de los nanotubos es más probable que ocurra en el plano basal hidrofóbico.

Después de observar las muestras se decidió dejarlas en condiciones ambientales por 72 horas. Se observó que en muestras frescas (2 a 4 hrs.) los nanotubos exhiben una apariencia cilíndrica con una estructura bastante estable. En las muestras que permanecieron fijadas al sustrato alrededor de 72 horas posteriores a su deposición, se observaron algunos tubos que conservaban su estructura cilíndrica, pero también se encontraron tubos que mostraban algunas distorsiones en su estructura: unos se observaban aplanados, otros con fracturas y en su mayoría presentaban diámetros reducidos cercanos a los 20 y 30 nm, lo que nos sugiere que la hidratación puede ser un factor determinante en la preservación de sus dimensiones y estructura, característica que comparte con los microtubulos (*Maaloum., et al 1994*).



## 8. Conclusiones

La superficie de grafito pirolítico tiene una gran cantidad de defectos que varían en tamaño y forma, sin embargo, no se encontraron estructuras que en su morfología pueden confundirse con nanoestructuras tubulares y esféricas.

Se sabe que en la superficie del grafito naturalmente se pueden formar nanotubos, para diferenciar los nanotubos orgánicos de los de grafito se pueden observar los efectos al variar los parámetros de voltaje y corriente.

Lavar la superficie después de depositar la muestra es un paso que evita que el material forme una película, elimina los aglomerados densos y facilita el barrido.

Los parámetros óptimos para el análisis de las bionanestructuras fueron muy semejantes en ambos casos se empleó una corriente de 1.001 nA y un voltaje de 0.050 V.

Con las imágenes obtenidas se demostró que la microscopía de STM en condiciones ambientales es capaz de resolver bionanoestructuras tubulares y esféricas de la proteína VP6, así como sus bloques de construcción.

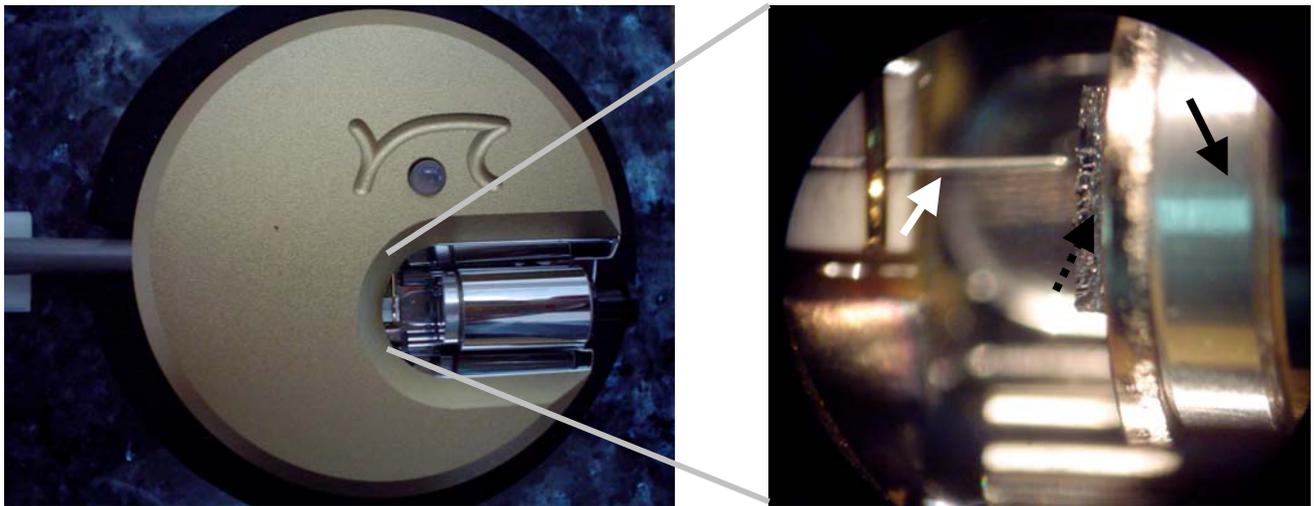
Las nanoesferas muestran una forma globular al depositarlas en la superficie del HOPG, y la conservan a pesar de ser fragmentadas con la punta del STM, además demostraron que no tienen un arreglo definido y que su absorción ocurre en el plano basal hidrofóbico.

Con las imágenes obtenidas se demostró que las nanoestructuras tubulares tienen una forma cilíndrica y que la conservan 72 horas después de ser depositadas. Además se demostró que no tienen un arreglo definido y que su absorción ocurre en el plano basal hidrofóbico.

## 10. Anexos



Fotografía de microscopio de barrido de efecto túnel (STM) y PC.



En estas fotografías se muestran la cabeza del microscopio de STM (izquierda), y el momento cuando piezo motor con el sustrato es llevado cerca de la punta del STM, la flecha negra señala el piezo motor, la punteada el sustrato y la blanca la punta.

## 9. Bibliografía

Abdelnour, A. (2005) Vacunas de Rotavirus: pasado, presente y futuro, *Acta pediátr. Costarric*, Vol. 19, No. 1, pp. 19-20.

Ago, H., Azumi, R., Ohshima, S., Zhang, Y., Kataura, H., Yumura, M (2004) STM study of molecular adsorption on single-wall carbon nanotube surface, *Chemical Physics Letters*, Vol. 383, No. 5-6, pp. 470.

Alliata, D., Andolfi, L., Cannistraro, S. (2004) Tip to substrate distances in STM imaging of biomolecules, *Ultramicroscopy*, Vol. 101, No. 2-4, pp. 231-240

Arakawa, H., Umemura, K., Ikai, A. (1992) Protein images obtained by STM, AFM and TEM, *Nature*, Vol. 358, No. 6382, pp. 171-173.

Atamny, F., Baiker, A., Schlögl, R. (1997) Atomic resolution of defects in graphite studied by STM, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 358, No. 1-2, pp. 344-348.

Atamny, F., Fässler, T.F., Baiker, A., Schlögl, R. (2000) On the imaging mechanism of monatomic steps in graphite, *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, Vol. 71, No. 4, pp. 441-443.

Bai, C. (2000). *Scanning Tunneling Microscopy and its Applications*. Capitulo 1 y 4, Segunda edición, Alemania. Edit. Springer. Pp. 1-35, 63-75.

Heredia-Barbero, A. (2006) *Análisis de Materiales de Origen Biológico en Estado Cristalino y Amorfo: Relación Estructura-Propiedades*. Tesis Doctoral, UNAM. Pp.58-59.

Baro, A.M., Miranda, R., Alaman, J. (1985) Determination of surface topography of biological specimens at high resolution by scanning tunnelling microscopy, *Nature*, Vol. 315, No. 6016, pp. 253-254.

Bhikkaji, B., Ratnam, M., Moheimani, S.O.R. (en prensa) PVPF control of piezoelectric tube scanners, *Sensors and Actuators A: Physical*, en prensa.

Binnig, G., H. Rohrer, Ch. Gerber y E. Weibel. (1982) Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters*. Vol. 49, 57-61.

Brehm, M., Taubner, T., Hillenbrand, R., Keilmann, F. (2006) Infrared spectroscopic mapping of single nanoparticles and viruses at nanoscale resolution. *Nano Letters*, Vol. 6, No. 7, pp. 1307.

Campbell, S.A., Smith, J.R., Jungblut, H., Lewerenz, H.J. (2007) Protein imaging on a semiconducting substrate: A scanning tunnelling microscopy investigation, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 599, No. 2, pp. 313-322.

Chang, H., Bard, A.J. (1991) Observation and characterization by scanning tunneling microscopy of structures generated by cleaving highly oriented pyrolytic graphite, *Langmuir*, Vol. 7, No. 6, pp. 1143-1153.

Chen, C., M-C. Daniel, Z. T. Quinkert, Mrinmoy De, B. Stein, V. D. Browman, P. R. Chipman, V. M. Rotello, C. C. Kao y B. Dragnea. (2006) Nanoparticle-Templated Assembly of Viral Protein Cages. *Nano Letters*. Vol. 6, No. 4, pp. 611.

Clemmer, C.R., Beebe Jr., T.P. (1991) Graphite: A mimic for DNA and other biomolecules in scanning tunneling microscope studies, *Science*, Vol. 251, No. 4994, pp. 640-642.

Colton, R. J., S. M. Baker, R. J. Driscoll, M. G. Youngquist, J. D. Baldeschwieler y W. J. Kaiser (1988) Imaging graphite in air by scanning tunneling microscopy: Role of the tip, *Journal of Vacuum Science y Technology A*, Vol. 6, No. 2, pp. 349-353.

Contera, S.A., Iwasaki, H., Suzuki, S. (2003) Ambient STM and in situ AFM study of nitrite reductase proteins adsorbed on gold and graphite: Influence of the substrate on protein interactions, *Ultramicroscopy*, Vol. 97, No. (1-4), pp. 65-72.

Crawford, S.E., Labbé, M., Cohen, J., Burroughs, M.H., Zhou, Y.-J., Estes, M.K. (1994) Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells, *Journal of Virology*, Vol. 68, No. 9, pp. 5945-5952.

Davis, J.J., Hill, H.A.O. (2002) The scanning probe microscopy of metalloproteins and metalloenzymes, *Chemical Communications*, Vol. 5, pp. 393-400.

Dixit, S.K., Goicochea, N.L., Daniel, M.-C., Murali, A., Bronstein, L., De, M., Stein, B., V., M. Rotello, C. Cheng Kao, Dragnea, B. (2006) Quantum dot encapsulation in viral capsids. *Nano Letters*, Vol. 6, No. 9, pp. 1993.

Driscoll, R.J., Youngquist, M.G., Baldeschwieler, J.D. (1990) Atomic-scale imaging of DNA using scanning tunnelling microscopy, *Nature*, Vol. 346, No. 6281, pp. 294-296.

Dunlap, D.D., Bustamante, C. (1989) Images of single-stranded nucleic acids by scanning tunnelling microscopy, *Nature*, Vol. 342, No. 6246, pp. 204-206.

Estes, M.K., Crawford, S.E., Penaranda, M.E. (1987) Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system, *Journal of Virology*, Vol. 61, No. 5, pp. 1488-1494.

Feyter, S., Schryver, F.C. (2003) Two-dimensional supramolecular self-assembly probed by scanning tunneling microscopy, *Chemical Society Reviews* Vol. 32, No. 3, pp. 139-140.

Gerber, C. y Lang H. P. (2006) How the doors to the nanoworld were opened, *Nature Nanotechnology*, Vol. 1, pp. 3-5.

Grenfell, B. T., C. S. Williams, O.N. Bjørnstad y J. R. Banavar. (2006) Simplifying biological complexity. *Nature*, Vol. 2, pp. 212-213.

Hansma, P. K. y Tersoff J. (1987) Scanning tunneling microscopy, *J. Appl. Phys.* Vol. 61, No. 2, pp. R1-R24.

Heckl, W.M., Smith, D.P.E., Binnig, G., Klagges, H., Hansch, T.W., Maddocks, J. (1991) Two-dimensional ordering of the DNA base guanine observed by scanning tunneling microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88, No. 18, pp. 8003-8005.

Heim, M., Cevc, G., Eschrich, R., Hilebrand, H., Knapp, H. F., Guckenberger, R., (1996) Scanning tunneling microscopy based on the conductivity of surface adsorbed water. Charge transfer between tip

and sample via electrochemistry in a water meniscus or via tunneling?, *J. Vac. Sci. Technol. B*, Vol. 14, No. 2, 1498-1502.

Heim, M., Steigerwald, R., Guckenberger, R., (1997) Hydration scanning tunneling microscopy of DNA and a bacterial surface protein, *Journal of Structural Biology*, Vol. 119, No. 2, pp. 212-220.

Hoshino, Y., Honma, S., Jones, R.W., Santos, N., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Kapikian, A.Z., Thouless, M.E. (2006) A rotavirus strain isolated from pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*) with diarrhea bears a P6[1]:G8 specificity, *Virology*, Vol. 345, No. 1, pp. 1.

Hung, D. Nguyen, Vijay S. Reddy, and Charles L. Brooks III (2007) Deciphering the Kinetic Mechanism of Spontaneous Self-Assembly of Icosahedral Capsids. *Nano Letters*, Vol. 7, No. 2, pp. 338.

Graveland-Bikker, J.F., Schaap, I.A.T., Schmidt, C.F., De Kruif, C.G. (2006) Structural and mechanical study of a self-assembling protein nanotube, *Nano Letters*, Vol. 6, No. 4, pp. 616-618.

Greig, S.L., Berriman, J.A., O'Brien, J.A., Taylor, J.A., Bellamy, A.R., Yeager, M.J., Mitra, A.K. (2006) Structural determinants of rotavirus subgroup specificity mapped by cryo-electron microscopy, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 356, No. 1, pp. 209.

Keller, D., Bustamante, C., Keller, R.W. (1989) Imaging of single uncoated DNA molecules by scanning tunneling microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 86, No. 14, pp. 5356-5360.

Knez, M., A. Kadri, C. Wege, U. Gösele, H. Jeske y K. Nielsch. (2006) Atomic Layer Deposition on biological Macromolecules :Metal oxide coating of tobacco mosaic virus and ferritin. *Nano Letters*, Vol. 6, No. 6, pp. 1172.

Labbe, M., Charpilienne, A., Crawford, S.E., Estes, M.K., Cohen, J. (1991) Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles, *Journal of Virology*, No. 65, Vol. 6, pp. 2946-2952.

Lepault, J., Petitpas, I., Erk, I., Navaza, J., Bigot, D., Dona, M., Vachette, P., (...), Rey, F.A. (2001) Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus, *EMBO Journal*, Vol. 20, No. 7, pp. 1498-1507.

Li, B., H. Wang, J. Yang, J. G Hou. (2004) High-resolution scanning tunneling microscopy for molecules. *Ultramicroscopy*, Vol. 98, No. 2-4, pp. 320.

López, T., Camacho, M., Zayas, M., Nájera, R., Sánchez, R., Arias, C.F., López, S. (2005) Silencing the morphogenesis of rotavirus *Journal of Virology*, Vol. 79, No. 1, pp. 184-192.

Losic, D., Martin, L.L., Aguilar, M.-I., Small, D.H. (2006)  $\beta$ -amyloid fibril formation is promoted by step edges of highly oriented pyrolytic graphite, *Biopolymers-Peptide Science Section*, Vol. 84, No. 5, pp. 519-526.

Losic, D., L. L. Martin, A. Mechler, M. I. Aguilar, D. H. Small. (2006) High resolution scanning tunnelling microscopy of the  $\beta$ -amyloid protein (A $\beta$ 1-40) of Alzheimer's disease suggests a novel mechanism of oligomer assembly, *Journal of Structural Biology*, Vol. 155, No. 1, pp. 104-110.

Maaloum, M., Chrétien, D., Karsenti, E., Hoörber, J.K.H. (1994) Approaching microtubule structure with the scanning tunneling microscope (STM), *Journal of Cell Science*, Vol. 107, No. 11, pp. 3127-3131.

Martin, C.R., Kohli, P. (2003) The emerging field of nanotube biotechnology, *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 2, No. 1, pp. 29-37.

Martin C.R., Kohli, P. (2003) The emerging field of nanotube biotechnology, *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 2, No. 1, pp. 29-31.

Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V.V., (...), Rey, F.A. (2001) Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: Implications for the architecture of the virion, *EMBO Journal*, Vol. 20, No. 7, pp. 1485-1497.

Melmed, A. J. (1991) The art and science and other aspects of making sharp tips, *Journal of Vacuum Science y Technology B*, Vol. 9, Vol. 2, pp. 601-608.

Mena, J.A., Ramírez, O.T., Palomares, L.A. (2005) Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Vol. 824, No. 1-2, pp. 267-276.

Mena, J.A., Ramírez, O.T., Palomares, L.A. (2006) Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *Journal of Biotechnology*, Vol. 122, No. 4, pp. 443-444.

Nam, K.T., Kim, D.-W., Yoo, P.J., Chiang, C.-Y., Meethong, N., Hammond, P.T., Chiang, Y.-M., Belcher, A.M. (2006) Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes, *Science*, Vol. 312, No. 5775, pp. 885-888.

Odom, T.W., Huang, J.-L., Kim, P., Lieber, C.M. (1998) Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes, *Nature*, Vol. 391, No. 6662, pp. 62.

Otero, R., Rosei, F., Besenbacher, F. (2006) Scanning tunneling microscopy manipulation of complex organic molecules on solid surfaces, *Annual Review of Physical Chemistry*, Vol. 57, pp. 497-499.

Park, S., J. Nogami, y C. F. Quate (1987) Effect of tip morphology on images obtained by scanning tunneling microscopy, *Phys. Rev, B*. Vol. 36, No. 5, pp. 2866.

Patton, J.T., Spencert, E. (2000) Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses, *Virology*, Vol. 277, No. 2, pp. 217-225.

Petty, N.K., Evans, T.J., Fineran, P.C., Salmond, G.P.C. (2007) Biotechnological exploitation of bacteriophage research, *TRENDS in Biotechnology*, Vol. 25. No. 1, pp. 7.

Pizzagalli, L., Baratoff, A. (2003) Theory of single atom manipulation with a scanning probe tip: Force signatures, constant-height, and constant-force scans. *Physical Review B* 68, art. no. 115427, pp. 1154271.

Pong, W.-T., Durkan, C. (2005) A review and outlook for an anomaly of scanning tunnelling microscopy (STM): Superlattices on graphite. *Journal of Physics D: Applied Physics*, Vol. 38, No. 21, pp. R329-R355.

Prasad, B.V.V., Rothnagel, R., Zeng, C.Q.-Y., Jakana, J., Lawton, J.A., Chiu, W., Estes, M.K. (1996) Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus, *Nature*, Vol. 382, No. 6590, pp. 471-474.

Ready, K.F.M., Sabara, M. (1987) In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein, *Virology*, Vol. 157, No. 1, pp. 189.

Rosei, F., Rosei, R. (2002) Atomic description of elementary surface processes: Diffusion and dynamics, *Surface Science*, Vol. 500, No. 1-3, pp. 399.

Ryadnov, M.G., Woolfson, D.N. (2004) Fiber recruiting peptides: Noncovalent decoration of an engineered protein scaffold. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 126, No. 24, pp. 7454.

Shafir, E., Yi, J., Cohen, H., Kotlyar, A.B., Cuniberti, G., Porath, D. (2005) The puzzle of contrast inversion in DNA STM imaging, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 109, No. 30, pp. 14270-14274.

Shuguang, Z. (2003) Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature*, Vol. 21, No. 10, 1171-1176.

Sun, J., Xiao, X., Chen, C., Hu, J., Li, M., Wang, Z., Gan, F. (2002) Nanotube-like structures naturally formed on HOPG surface, *Materials Characterization*, Vol. 48, No. 2-3, pp. 237-239.

Szkutnik, P.D., Piednoir, A., Ronda, A., Marchi, F., Tonneau, D., Dallaporta, H., Hanbücken, M. (2000) STM studies: Spatial resolution limits to fit observations in nanotechnology, *Applied Surface Science*, Vol. 164, No.1-4, pp. 170.

Tang, S.L., McGhie, A.J. (1996) Imaging individual chaperonin and immunoglobulin G molecules with scanning tunneling microscopy, *Langmuir*, Vol. 12, No. 4, pp. 1088-1090.

Tao, N.J., Li, C.Z., He, H.X. (2000) Scanning tunneling microscopy applications in electrochemistry - beyond imaging, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 492, No. 2, pp. 81.

Venema, L. (2006) Nanoscience: Small talk. *Nature*, Vol. 442, No. 7106, pp. 994.

Wang, Y., Ye, Y., Wu, K. (2006) Simultaneous observation of the triangular and honeycomb structures on highly oriented pyrolytic graphite at room temperature: An STM study, *Surface Science*, Vol. 600, No. 3, pp. 729-731.

Wiesesndanger, R., H.-J. Güntherodt. (1995) Scanning tunneling microscopy. Segunda edision, edit. Springer, capitulo 3.

Wood, J. (2006) Birthday celebration for STM. *Materials Today*, Vol. 9, No. 9, pp. 1.

Wolde, P. R. T. y Tanase-Nicola S. (2006) Pass on the message. *Nature Physics*, Vol. 2, pp. 371 – 372.

Xu, S., Dong, M., Rauls, E., Otero, R., Linderoth, T.R., Besenbacher, F. (2006) Coadsorption of guanine and cytosine on graphite: Ordered structure based on GC pairing, *Nano Letters*, Vol. 6, No. 7, pp. 1434-1438.

Zeng, C.Q.-Y., Labbe, M., Cohen, J., Prasad, B.V.V., Chen, D., Ramig, R.F., Estes, M.K. (1994) Characterization of rotavirus VP2 particles, *Virology*, Vol. 201, No. 1, pp. 55-65.

## Abreviatura

STM*	microscopía de barrido de efecto túnel
HSTM*	microscopía de barrido de efecto túnel de alta humedad
SEM*	microscopía electrónica de barrido
AFM*	microscopía de fuerza atómica
TEM*	microscopía electrónica de transmisión
cryo-EM*	criomicroscopía electrónica
HOPG*	grafito pirolítico altamente ordenado
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VMB	virus mosaico de brome
VMT	virus de mosaico del tabaco
BTV*	bluetogues virus
ADN	ácido desoxirribonucleico
G	guanina
C	citocina
ARN	ácido ribonucleico
dsRNA*	ARN de doble hebra
VLPs*	partículas virales
TLPs*	partícula viral de triple capa
DLPs*	partícula viral de doble capa
IgG*	inmunoglobulina G
A $\beta$	proteína $\beta$ -amiloida
nm	nanómetro
Å	amstrong
pH	potencial de hidrógeno
<i>I</i>	corriente
nA	nanoamperio
V	voltage
W	tungsteno
Au	oro
Pt	platino
C	carbono

\* por sus siglas en inglés