



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la interacción de los nanotubos de VP6 de rotavirus funcionalizados con metales y células en cultivo: Hacia nuevas aplicaciones.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

QFB Wendy Ivone Garcia Garcia

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Octavio Tonatiuh Ramirez Revich
Instituto de Biotecnología-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leonor Pérez Martínez
Instituto de Biotecnología-UNAM
Dr. Vladimir A Basiuk
Instituto de Ciencias Nucleares-UNAM

Ciudad de México, septiembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA, PAPIIT IT200416. Wendy Garcia recibió becas del CONACyT (585967), Programa de Apoyo a los Estudios de Postgrado (PAEP) y Programa de Alimentación y Hospedaje IBT-UNAM. Se agradece el apoyo técnico por parte de integrantes del IBT-UNAM a la Biol. Rosa Román, M. en C. Martha Contreras, M. en C. Ramón Carrasco, M. en C. Ana Ruth Pastor, M. en C. Vanessa Hernández, Dra. Guadalupe Zavala, Ing. Víctor López de igual forma del IER-UNAM a la Dra. Margarita Miranda, M. en C. Andrés Arrocha e Ing. Rogelio Elvira.

Agradecimientos

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por aceptarme en su laboratorio, por sus críticas constructivas y darme la libertad de planear y dirigir este proyecto.

A la Dra. Laura Palomares por el apoyo personal y profesional brindado durante el desarrollo de mi proyecto.

A la Dra. Leonor Pérez y al Dr. Vladimir Basiuk miembros de mi comité tutorial por sus consejos y apoyo.

Al jurado evaluador Dra. Margarita Miranda, Dra. Martha Pedraza, Dr. Pavel Isa, Dr. Ismael Secundino, Dr. William Rodríguez por su tiempo, críticas y consejos que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A la Dra. Margarita Miranda y a su grupo (Andrés, Guillermo, Alicia, Rogelio, Vianey y Paola) por sus consejos, enseñanzas, paciencia y dedicación.

Al personal técnico del laboratorio, por sus consejos y ayuda.

Al GPR por su ayuda, paciencia, por compartir sus experiencias, conocimientos y sus excelentes consejos.

Al grupo Galindo por su optimismo y compañerismo.

A mis compañeros de generación, por brindarme su apoyo y amistad.

A cada miembro de mi numerosa familia, que de alguna forma particular contribuyó al desarrollo y culminación de este proyecto.

A mi abuelo por ser un ejemplo de vida.

A mis padres y hermana por ser siempre mi soporte.

A Daniela y Alejandro por su paciencia y comprensión.

Contenido

Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	8
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	10
Capítulo 1. Introducción.....	13
Capítulo 2. Antecedentes.....	15
2.1 Nanomateriales y desarrollo de microelectrodos.....	15
2.2 Generalidades y aplicaciones de la proteína VP6.....	19
2.3 Proteína VP6 y sistemas electroquímicos.....	24
Justificación.....	32
Hipótesis.....	33
Objetivos.....	33
General.....	33
Particulares.....	33
Diagrama general de proceso.....	34
Capítulo 3. Materiales y métodos.....	35
3.1 Producción de nanotubos.....	35
3.2 Purificación de VP6 a partir de sobrenadante de cultivo.....	36
3.3 Purificación de VP6 a partir de pellet.....	38
3.4 Integridad de los nanotubos.....	39
3.5 Comparación de rendimientos.....	40
3.6 Funcionalización de nanotubos.....	40
3.7 Determinación de eficiencia de reducción de $Au^{+3} \rightarrow Au^0$ en los nanotubos de VP6.....	41
3.7.1 Preparación de curva estándar.....	41
3.8 Caracterización electroquímica.....	42
3.8.1 Inmovilización de la proteína.....	43
3.8.2 Caracterización de potenciales de circuito abierto (OCP).....	45
3.8.3 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).....	45
3.8.4 Voltamperometría cíclica (CV).....	46

3.8.5 Análisis estructural.....	46
3.8.6 Microscopia electrónica de barrido (MEB).	46
3.8.7 CV con diferentes soluciones de trabajo.....	47
3.9 Manejo de líneas celulares.	47
3.10 Ensayo de citotoxicidad.	48
3.11 Uso de nanotubos como soporte celular.	48
3.11.1 Crecimiento celular sobre soportes de VP6.....	49
3.11.2 Determinación de distribución aparente de nanotubos en los pozos. ...	49
Capítulo 4. Resultados y discusión	52
4.1 Producción de nanotubos	52
4.2 Purificación de VP6 a partir de sobrenadante de cultivo.....	54
4.3 Purificación de VP6 a partir de pellet.	58
4.4 Integridad de los nanotubos.....	61
4.5 Comparación de rendimientos.	63
4.6 Funcionalización de nanotubos de VP6.....	65
4.6.1 Comparativo entre los dos procesos de purificación y la funcionalización con oro.....	67
4.7 Determinación de eficiencia de reducción de $Au^{+3} \rightarrow Au^0$ en los nanotubos de VP6.....	67
4.7.1 Preparación de curva estándar.....	68
4.8 Caracterización electroquímica.....	70
4.8.1 Evaluación de la Inmovilización de la proteína VP6.....	70
4.8.2 Determinación del potencial de circuito abierto (OCP)	71
4.8.3 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).....	72
4.8.4 Voltamperometría cíclica (CV)	78
4.8.5 Análisis estructural de la interacción con nafion.	88
4.8.6 Caracterización estructural.	88
4.8.7 Voltamperometría cíclica medio de cultivo celular.	91
4.9 Manejo de líneas celulares	93
4.10 Pruebas de citotoxicidad.....	93
4.11 Uso de nanotubos como sustrato celular.....	95

4.11.1 Crecimiento celular.	95
4.11.2 Determinación de distribución aparente de nanotubos en los pozos. ...	98
4.11.3 Evaluación de la cantidad de VP6 en el soporte celular.	100
Capítulo 5. Conclusiones	103
Capítulo 6. Perspectivas	105
Capítulo 7. Referencias	107
Apéndice	115

Índice de figuras

Figura 1: Estructura de cápside de rotavirus.	20
Figura 2: Esquema de monómero de VP6.....	20
Figura 3: Representación del trímero de VP6.....	21
Figura 4: Mapa de potencial electrostático en trímero de VP6.....	22
Figura 5: Micrografías electrónicas de la conjugación de nanotubos de VP6 con distintos metales.	22
Figura 6: Cinética de exposición de nanotubos.....	23
Figura 7: Esquema general de tipos de corriente.....	25
Figura 8: Circuitos eléctricos.....	26
Figura 9: Sistema electroquímico.....	28
Figura 10: Representación de la doble capa eléctrica.....	29
Figura 11: Representación gráfica de pruebas electroquímicas.....	31
Figura 12: Sistema electroquímico utilizado.....	43
Figura 13: Estructura de preparación de electrodos inmovilizados.....	44
Figura 14: Titulación del bacVP6p2pl.....	52
Figura 15: Cinética de infección para la producción de proteína recombinante VP6.....	53
Figura 16: Cinética de producción de VP6.....	54
Figura 17: Cromatografía de intercambio aniónico.....	56
Figura 18: Cromatografía de exclusión molecular.....	57
Figura 19: Precipitación de VP6 con acetato de sodio al 40%.....	59
Figura 20: Cromatograma de purificación a partir de pellet.....	60
Figura 21: Micrografía electrónica de la fracción retenida en la cromatografía de intercambio catiónico.....	60
Figura 22: Proceso de concentrado y ensamblaje de VP6 purificada de pellet.....	61
Figura 23: Micrografías electrónicas de nanotubos de VP6 obtenidos de purificación sobrenadante.....	62
Figura 24: Micrografías electrónicas de nanotubos purificados a partir de pellet celular.....	63
Figura 25: Micrografías electrónicas de nanotubos purificados y funcionalizados de sobrenadante.	65
Figura 26: Micrografías electrónicas a diferentes aumentos de nanotubos purificados y funcionalizados de pellet.....	66
Figura 27: Determinación del intervalo de trabajo para la cuantificación de oro (III).....	68
Figura 28: Cuantificación de oro (III).....	69
Figura 29: Comparación de respuestas voltamperométricas entre GC y diferentes concentraciones de nafion.....	71
Figura 30: Determinación del potencial de circuito abierto (OCP).....	72
Figura 31: Selección de potenciales de trabajo para EIS.....	73
Figura 32: Evolución de la resistencia a la transferencia de carga con respecto al potencial aplicado de los encapsulados de nanotubos de VP6.....	74
Figura 33: Evolución de la resistencia a la transferencia de carga con respecto al potencial aplicado de los encapsulados de nanotubos de VP6 con oro.....	75
Figura 34: Comparativa de resistencias de los diferentes encapsulados en los electrodos de trabajo.....	77
Figura 35: Respuesta voltamperométrica de los electrodos de trabajo con nanotubos de VP6.....	79
Figura 36: Respuesta voltamperométrica de los electrodos de trabajo con nanotubos de VP6 con oro.....	80

Figura 37: Respuesta voltamperométrica de los electrodos de trabajo con BSA.....	82
Figura 38: Respuesta voltamperométrica de los electrodos de trabajo con VP6 desensamblada vs VP6 en nanotubos.....	83
Figura 39: Repeticiones de montaje de electrodos de trabajo de tablas 3 y 5.....	86
Figura 40: Repeticiones de montaje de electrodos de trabajo de tabla 4.....	87
Figura 41: Micrografías electrónicas de transmisión de la simulación de los encapsulados.....	88
Figura 42: Micrografías electrónicas de electrodos con nanotubos de VP6.....	90
Figura 43: Respuestas voltamperométricas de nanotubos de VP6 en medio de cultivo.....	92
Figura 44: Determinación de actividad mitocondrial por medio de MTT.....	94
Figura 45: Nanotubos utilizados como sustrato de crecimiento celular, células Neuro 2A, a las 52 h de cultivo.....	96
Figura 46: Nanotubos utilizados como sustrato de crecimiento celular, células mHypoE-N1 a las 52 h de cultivo.....	97
Figura 47: Prueba de inmunofluorescencia para observar la distribución de VP6 en los pozos de crecimiento celular.....	99
Figura 48: Viabilidad celular normalizada de células neuronales.....	101
Figura 49: Viabilidad celular normalizada de células no neuronales.....	102
Figura 50: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para carbón vítreo a diferentes potenciales.....	115
Figura 51: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de nafion 0.2% a diferentes potenciales.....	116
Figura 52: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de nafion 0.05% a diferentes potenciales.....	116
Figura 53: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de VP6 nafion 0.2% a diferentes potenciales.....	116
Figura 54: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de VP6 nafion 0.05% a diferentes potenciales.....	116
Figura 55: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de NT Au nafion 0.2% a diferentes potenciales.....	116
Figura 56: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de NT Au nafion 0.05% a diferentes potenciales.....	116

Índice de tablas

Tabla 1: Preparación de mezcla de reacción para cuantificación de oro (III).....	42
Tabla 2: Controles de referencia.....	44
Tabla 3: Electrodos de trabajo.....	45
Tabla 4: Control de proteína de referencia.....	45
Tabla 5: Composición de los diferentes soportes.....	46
Tabla 6: Determinación de cantidad de proteína VP6 para células Neuro2A y mHypoE1.....	50
Tabla 7: Determinación de cantidad de proteína para células BHK y A-549.....	50
Tabla 8: Rendimientos del proceso de purificación de sobrenadante.....	64
Tabla 9: Rendimientos del proceso de purificación de pellet.....	64
Tabla 10: Comparativo de pérdida de proteína por desalado entre purificación de pellet y sobrenadante.....	67

Abreviaturas

Buffer A	Tris HCl 30 mM, EDTA 0.1 mM pH= 6.16
Buffer B	Tris HCl 30 mM, EDTA 0.1 mM, 1 M NaCl pH= 6.16
CEM	Cromatografía de exclusión molecular
CIA	Cromatografía de intercambio aniónico
CIC	Cromatografía de intercambio catiónico
CV	Voltamperometría cíclica
EIS	Espectroscopía de impedancia electroquímica
GC	Carbón vítreo
h	Hora
hpi	Horas post-infección
J	Densidad de corriente
L	Litro
MDI	Multiplicidad de infección
min	Minutos
NP-Au	Nanopartículas de oro
NT	Nanotubos de VP6
NT-Au	Nanotubos funcionalizados con oro
PBS	Buffer de fosfatos
PBS-T	Buffer de fosfatos con 1% Tween 20
SCE	Electrodo saturado de calomel
SEM	Microscopio electrónico de barrido
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
ufp	Unidades formadoras de placa
V	Volt
VP6	Proteína VP6 de la cápside de rotavirus

Resumen

Existe un gran interés en la fabricación de microelectrodos para ser empleados como sistemas de entrega localizada de fármacos u otras moléculas, o bien que promuevan la comunicación celular a través de descargas eléctricas controladas, con el fin de combatir diversas enfermedades neurodegenerativas. La construcción de microelectrodos empleando nanobiomateriales ha resultado en sistemas más nobles debido a su composición, comparado con aquellos basados en materiales inorgánicos. En el presente trabajo se aprovechó el polimorfismo de la proteína VP6 de la cápside de rotavirus, que es capaz de formar nanoestructuras tubulares. Tales nanoestructuras pueden ser conjugadas con diversos precursores metálicos, que tras la adición de un agente reductor fuerte se promueve la de síntesis *in-situ* de nanopartículas metálicas, confiriéndoles así distintas propiedades según el metal utilizado (funcionalización). Las nanoestructuras conjugadas con nanopartículas de oro, se utilizaron en el presente trabajo como soporte para el crecimiento de células neuronales con el propósito de favorecer la comunicación celular.

La proteína VP6 fue producida de manera recombinante en el sistema células de insecto-baculovirus. Se analizó la calidad de la estructura de los nanotubos de VP6 con y sin oro por medio de microscopia electrónica de transmisión. Se observaron estructuras tubulares de diferentes longitudes, así como el arreglo de las nanopartículas de oro sobre el nanotubo. Se determinó por medio de un método espectrofotométrico que tras el proceso de funcionalización a partir de ácido cloroáurico (HAuCl_4) hasta la obtención de nanopartículas metálicas (Au^0) se lograba una reducción del 99% del precursor metálico utilizado.

Se caracterizaron las propiedades eléctricas de los nanotubos VP6 y los nanotubos de VP6 funcionalizados con oro, utilizando un sistema electroquímico. Debido a la solubilidad de VP6 en soluciones acuosas, fue necesaria la encapsulación de los nanotubos en el polímero nafion sobre un electrodo de trabajo de carbón vítreo. Se realizaron pruebas de espectroscopia de impedancia electroquímica y mediante un ajuste no lineal con circuitos equivalentes, se calculó la resistencia a la polarización de carga eléctrica para los distintos encapsulados

realizados. Se determinó que la resistencia de los encapsulados de los nanotubos de VP6 fue menor que la de aquellos funcionalizados con oro. Se realizaron voltamperometrías cíclicas en donde se observó transferencia de carga en los encapsulados con nanotubos de VP6, tanto con o sin oro.

La posible citotoxicidad de los nanotubos de VP6 se determinó mediante la actividad mitocondrial en células neuronales en cultivo, las cuales fueron expuestas durante 52 h a nanotubos de VP6 con y sin oro. Se observaron actividades mitocondriales normalizadas por arriba del 90% para las células expuestas a los nanotubos de VP6 sin oro. Se observó una disminución de la actividad mitocondrial con respecto al control por debajo del 60% en las células expuestas a los nanotubos con oro, descartando su posible uso como soporte para el crecimiento celular.

Los encapsulados de nanotubos de VP6 sin oro, se utilizaron como soporte de crecimiento celular sobre placas de cultivo. Se evaluó por medio de un inmunoensayo la distribución de los nanotubos de VP6 en la superficie de cultivo, observándose una mayor cantidad de proteína en las periferias del pozo. Al crecer células neuronales sobre los soportes realizados, se observó la disminución en la viabilidad celular cuando se emplearon nanotubos de VP6. Esto probablemente se debió al cambio de la interfase célula-soporte, donde los nanotubos de VP6 pudieran promover mecanismos de muerte celular. Se probaron distintas cantidades de VP6 en los encapsulados con el fin de elucidar si este efecto era dependiente de la cantidad de proteína en el encapsulado. Estos ensayos se realizaron en células neuronales y en células renales y pulmonares. Se observó que la viabilidad celular aumentaba conforme disminuía la cantidad de proteína utilizada en el soporte. Se observó la misma tendencia para todas las líneas celulares probadas, sin embargo, el efecto desfavorable sobre la viabilidad celular fue mayor en células neuronales.

Nuestros resultados sugieren que los nanotubos de VP6 con o sin oro, debido a su naturaleza proteica y su capacidad de transferir carga, podrían ser utilizados como materiales para el diseño de biosensores. Se ha observado que los soportes nanoestructurados no sólo sirven como andamios para el anclaje de diferentes biomoléculas, sino que también favorecen la interacción biomolécula-

nanomaterial, permitiendo mantener la actividad de las biomoléculas, comparado con materiales de anclaje sin este arreglo nanométrico.

Capítulo 1. Introducción

En los últimos años se ha demostrado que los materiales de escala nanométrica poseen propiedades distintas y en algunas ocasiones potenciadas en comparación con materiales de la misma composición pero de tamaños mayores. Esto se debe al arreglo estructural presente en los nanomateriales y al aumento del área superficial activa. Los nanomateriales abren la puerta, a un sin número de posibles nuevas aplicaciones. En imagenología médica, se han podido desarrollar diferentes materiales, como nanopartículas de oro, que debido a sus propiedades ópticas, estructurales y selectivas, pueden ser utilizadas como agentes de contraste, lo que ha permitido diagnósticos más sensibles y oportunos, que resultan en terapias dirigidas y efectivas, reduciendo los costos y mejorando la calidad de vida de los pacientes [1-2]. Se busca mejorar el diseño de dispositivos cerebrales utilizados para la entrega controlada de fármacos o para promover la comunicación celular, en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson. El uso de nanomateriales, para la fabricación de dispositivos neuronales, aumenta el área activa del microelectrodo y debido a su tamaño, favorece la interacción en la interfase célula-dispositivo, resultando en microelectrodos más eficientes [3].

Se han utilizado diferentes biomoléculas como elementos (ladrillos) estructurales para la síntesis de diversos nanobiomateriales, siendo menos nocivos para el ser humano que materiales de origen inorgánico. En nuestro laboratorio se trabaja con diferentes proteínas producidas de manera recombinante, como la proteína VP6 de la cápside de rotavirus. La unidad funcional de la proteína VP6, está dada por la asociación de monómeros en trímeros, los cuales se ha observado que dependiendo de las condiciones del medio en que se encuentren, es decir, pH, fuerza iónica y concentración de iones, se promueve la formación de esferas, nanotubos o trímeros [4]. Las últimas estructuras se obtienen extremando las condiciones del medio. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que estas estructuras sirven como andamios para la deposición de distintas moléculas, generando nanobiomateriales multifuncionales dependiendo de la conjugación realizada. Los nanotubos de VP6 se han funcionalizado con distintos metales, tanto

en su superficie interna como externa y se han caracterizados algunas de sus propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas y catalíticas [5-6].

Dado que los nanotubos de VP6 son sintetizados de manera sencilla, la conjugación con precursores metálicos es fácil y que presentan baja citotoxicidad [7-8]. El presente trabajo busca ampliar la caracterización de las propiedades eléctricas de los nanotubos de VP6 funcionalizados con oro, con el fin de enriquecer el conocimiento para su posible uso como andamios para el crecimiento de células neuronales *in vitro*. Se busca estudiar los probables efectos, que pudieran tener sus propiedades de conducción eléctrica, sobre la proliferación celular. Esta investigación pretende cimentar las bases para nuevas aplicaciones de los nanotubos de VP6 con oro, principalmente en el área de la neurociencia.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Nanomateriales y desarrollo de microelectrodos

En medicina resulta particularmente complejo el estudio y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, ya que ensayos *in vitro* no siempre resultan extrapolables a sistemas *in vivo*, debido en gran medida a la complejidad de estos últimos o bien al desarrollo poco eficiente de técnicas para su estudio. Con el paso del tiempo se han desarrollado dispositivos, que buscan ampliar el conocimiento del funcionamiento del sistema nervioso, así como la implementación de estos dispositivos, como alternativa terapéutica para combatir distintas enfermedades, en las cuales puede haber fallos o interrupción en la transmisión del impulso nervioso, provocado por un daño en la estructura del tejido neuronal, por el rompimiento de las redes de interconexión sináptica. Sin embargo, la gran mayoría de los dispositivos hasta ahora desarrollados, tienen algunos problemas de diseño, entre los más relevantes está su tamaño, dado a que son relativamente más grandes con respecto al microambiente celular [9–15]. Para el estudio de fenómenos eléctricos, es necesaria una buena interacción en la interfase célula-dispositivo, ya que la transducción de la señal es directamente afectada por la distancia. Los dispositivos con gran tamaño pueden provocar posibles daños mecánicos al ser insertados *in vivo*, lo que desencadena una serie de procesos inflamatorios, que conlleva en una fase primaria, a la liberación de moléculas pro-inflamatorias, extravasación de líquidos celulares y formación de coágulos. Todo lo anterior puede progresar a una respuesta crónica, que culmina con reclutamiento de macrófagos al sitio de inserción, promoviendo la activación de células glía, pudiendo seguir dos caminos: formar una cicatriz al alrededor del dispositivo, aumentando la impedancia y reduciendo la transferencia de carga en la interfase, disminuyendo o eliminando así su sensibilidad, o bien liberando especies reactivas de oxígeno (superóxidos, peróxido de hidrogeno, etc.) que cambian el microambiente químico celular, afectando de igual forma la respuesta del dispositivo [16-17].

Los problemas anteriormente descritos, se han disminuido con la utilización de materiales de escala nanométrica, los cuales mejoran la sensibilidad y selectividad de los dispositivos, además de que el daño causado al momento de la inserción en sistemas *in vivo*, se ve importantemente disminuido debido a su reducción de tamaño [18].

Los nanomateriales están formados por una gran diversidad de moléculas orgánicas como ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas, etc., e inorgánicas como diversos metales, materiales de carbono, entre otros compuestos. Estos nanomateriales, pueden ser sintetizados de manera escalonada a partir de monómeros estructurales, hasta formar nanocomplejos o bien utilizando estructuras complejas formando a partir de ellas moléculas más sencillas. Para ser considerados como nanomateriales, estos deben poseer al menos en alguna de sus superficies dimensiones menores a los 100 nm [19-20] .

La respuesta celular ante los nanomateriales, depende del tipo celular donde se utilicen, al igual que la forma, composición y tamaño de los nanomateriales. Diversos estudios han demostrado, que entre los principales problemas que se tienen, está la agregación de nanomateriales en los componentes celulares como iones, proteínas, DNA, etc. Para solucionar tal problema, se ha propuesto la búsqueda de estrategias como la utilización de materiales de origen orgánico, la optimización en la síntesis de nanocomplejos para la obtención de estructuras de formas y tamaños más uniformes, con el fin de tener una mínima respuesta celular adversa. Se ha propuesto que la exposición a los nanomateriales de manera gradual, pudiera promover la adaptación celular y la evasión de la activación del sistema inmune, resultando en nanomateriales efectivos y seguros [21–25].

Actualmente los nanomateriales han tenido un gran auge en distintas áreas de la ciencia, donde se busca aprovechar sus propiedades únicas, como alternativa al mejoramiento de muchos tipos de sistemas, tal es el caso del diseño de microelectrodos debido a sus características, como tamaño, flexibilidad y mayor conductividad [3]. Para el diseño adecuado de microelectrodos, es necesario tener en cuenta que en el medio celular existen factores a considerar. Es necesario considerar las propiedades eléctricas celulares, es decir, la resistencia que está

dada por canales iónicos selectivos y la capacitancia de membrana, responsable de la polaridad de membrana, así como la resistencia en la interfase que se pueda generar por el dispositivo. Además los procesos eléctricos en los dispositivos y en las células, se llevan a cabo de manera diferente, mientras que en los primeros el paso de corriente eléctrica es generado por el flujo de electrones, en los segundos es debido al tránsito de iones a través de la membrana plasmática [26]. Aplicar una corriente eléctrica en un cultivo celular o bien en un sistema *in vivo*, implica cambios en la polaridad de la membrana y por tanto cambios en el microambiente físico y químico del contexto celular. Un dispositivo ideal sería aquel, que al ser puesto en un fluido biológico, actúe como un capacitor, es decir, que al recibir un potencial externo, las cargas se acumulen y se distribuyan en la interfase, permitiendo el flujo de corriente directamente a las células, no obstante existe la posibilidad que al recibir el estímulo, el dispositivo transfiera las cargas al medio extracelular, generando procesos redox, cambiando el ambiente celular y afectando la viabilidad de las células [10, 16]. Esto y variantes como la naturaleza del material, efectos citotóxicos, potencial a utilizar, etc., deben ser considerados y definidos en el momento de diseñar un electrodo.

Al incidir un campo eléctrico en un cultivo celular, se ha observado que es posible re-direccionar el crecimiento celular, así como favorecer la prolongación de neuritas, debido a que algunas células neuronales presentan galvanotropismo, aspecto importante para el estudio de diversas enfermedades neurológicas. El aumento de la comunicación celular en los experimentos mencionados, dependen de la composición del electrodo, ya que deben ser compatibles con las células en estudio, no debiendo interferir con crecimiento celular. También son importantes las propiedades eléctricas del electrodo, es decir, de su capacidad para almacenar carga y la resistencia al flujo de corriente. Los materiales planos de carbono son muy utilizados para el diseño de electrodos. Se ha trabajado arduamente en la modificación superficial de los electrodos, con el fin de mejorar sus propiedades eléctricas. S. Jain *et al.*, [27] demostraron que a través de la modificación superficial de un electrodo plano de carbono, hasta lograr la formación de poros sobre su superficie, es posible aumentar la capacitancia y disminuir la impedancia del

electrodo, a su vez favoreciendo el crecimiento celular, debido a la rugosidad de la superficie, además tras incidir un potencial eléctrico externo suave, observaron que se favorecía la prolongación de neuritas.

Una estrategia relevante para el desarrollo de dispositivos neuronales, es la combinación de distintos materiales, buscando que la combinación de sus propiedades resulte en dispositivos más efectivos. Se ha observado el mejoramiento de microelectrodos con el uso de los nanotubos de carbono, debido a que tienen buena movilidad de electrones, una gran área superficial y su forma podría favorecer el crecimiento celular [3,28-29]. Richard F. Vreeland y colaboradores [30], desarrollan un sensor electroquímico, para la medición *in vivo* de dopamina (neurotransmisor de suma importancia, entre sus varias funciones, regula las funciones cognitivas), el electrodo está compuesto por una fibra de carbón cubierto del polímero conductor poli(3,4-etilenedioxitiofeno) (PEDOT) y el polímero nafion. Este último polímero forma una membrana selectiva catiónica. En dicho trabajo, se probó que no solamente lograron obtener un electrodo más duradero, si no que debido a las propiedades catiónicas del nafion, se pudo generar una selectividad entre dopamina y otras moléculas con el mismo potencial de reducción. Los resultados son relevantes, ya que el estudio *in vivo* de la liberación de biomoléculas, es altamente complejo. Otro enfoque importante a considerar para la fabricación de microelectrodos en estudios *in vivo*, es su durabilidad y que sean inertes para evitar el reconocimiento del sistema inmune. Se han utilizado materiales para el recubrimiento cuya naturaleza química, puedan evadir la activación inmunológica y dar mayor durabilidad a los dispositivos. Hashemi *et al.*, utilizaron electrodos implantados, para medir la liberación de dopamina *in vivo*, tras estandarizar sus métodos de detección, como la ventana de potencial, velocidad de barrido, etc., observaron que los potenciales a los cuales aparecen los procesos de oxidación y reducción de la dopamina, cambian tras días del implante y presentan un comportamiento distinto a lo reportado *in vitro*, por lo tanto la medición de dopamina se dificulta. Propusieron la utilización de nafion para recubrir al electrodo implantado, observando que logran mantener los potenciales de oxidación y reducción de dopamina, con el electrodo implantado hasta por 28 días

[31]. Los autores argumentaron, que la carga del polímero, ayudó a disminuir la activación del sistema inmune de sus ratones.

Otra alternativa para el desarrollo de microelectrodos, es el uso de proteínas como material de fabricación [32–35]. Se ha visto, que la síntesis controlada de algunos péptidos, permite la obtención de nanoestructuras autoensamblables, que pueden ser alineadas por medio de campos eléctricos. Es así posible formar redes complejas, que favorecen la regeneración neuronal, debido a que es posible decorarlas, con una amplia gama de moléculas que promuevan estos procesos. También funcionan como andamiajes de fármacos, logrando un efecto terapéutico localizado y mucho más efectivo, sólo mencionar algunas aplicaciones [33-34, 36].

2.2 Generalidades y aplicaciones de la proteína VP6

Así como algunos virus son agentes patógenos para los humanos, otros virus que no lo son, la biotecnología ha permitido su manipulación obteniendo una gama de aplicaciones, como es utilizar su genoma para la producción de proteínas de interés, producción de vacunas, nanomateriales, etc. [37–40].

Rotavirus, es un virus de RNA de doble cadena, que presenta una cápside icosaédrica, conformada por diferentes proteínas. En una capa interna se encuentra la proteína VP2, la proteína VP6 en la capa intermedia, una capa externa de VP7 y VP4 ensamblada entre VP7 y VP6, formando espículas que sobresalen de la cápside [4,42-43]. (*Figura 1*). De manera *in vitro* las proteínas estructurales de rotavirus, se ensamblan en esferas. Para que el ensamblaje se lleve a cabo, es necesaria la presencia de VP2. La proteína VP2 forma esferas de capa sencilla, o bien puede estar asociada con VP6 formando esferas de doble capa, o asociada con VP6/VP7 para formar esferas de triple capa [43]. Sin embargo una vez aislada la proteína intermedia VP6, se ha observado que se puede formar estructuras tubulares o esferas autoensamblables, las cuales son dependientes de la fuerza iónica y pH del medio en el que se encuentra, ambas estructuras presentan un arreglo casi hexagonal constituidos por trímeros [4,44]. El trímero de la proteína VP6 presenta dos dominios, un dominio distal (H) formando barriles β antiparalelos y otro en la base (B) constituido por hélices α . Ambos dominios interactúan para dar

estabilidad al trímero (*Figura 2*). Los trímeros presentan una cavidad central donde se encuentra un ion Zn^{+2} unido a la histidina 153 de cada una de las subunidades del trímero. En esta zona inter trímero también se observó que existe un área de 42 nm^2 , la cual es accesible al solvente, formada principalmente por residuos hidrofílicos del dominio B [44] (*Figura 3*). El análisis estructural realizado por Lepault y colaboradores [4] muestran los tres contactos laterales inter trímero, un contacto débil interno y otros dos que permiten la polimerización de los trímeros para formar tubos.

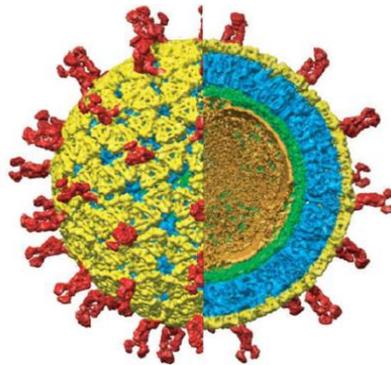


Figura 1: Estructura de cápside de rotavirus.

RNA y complejo de polimerasa en naranja, VP2 en verde, VP6 en azul, VP7 en amarillo y espículas de VP4 en rojo [4].

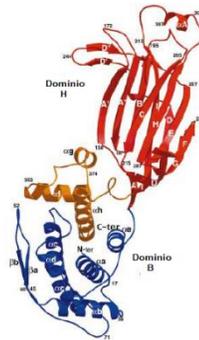


Figura 2: Esquema de monómero de VP6

Dominio H formado por barriles β antiparalelos. Dominio B formado por hojas plegadas α . Modificado de [44].

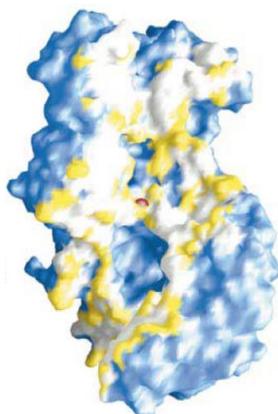


Figura 3: Representación del trímero de VP6.

En azul las zonas accesibles al solvente. En amarillo las zonas hidrofílicas. En blanco las zonas internas hidrofóbicas. En el centro en rojo el ion Zn^{+2} [44].

Plascencia-Villa y colaboradores [5] utilizaron el sistema de células de insecto-baculovirus, para producir proteína recombinante VP6 y optimizar procedimientos de su purificación [6]. Obtuvieron nanotubos ordenados de diámetros de 75 y 45 nm, con longitudes por encima de los 200 nm. Además demostraron, que ese ordenamiento permitía la conjugación con otras moléculas, gracias a aminoácidos disponibles tanto en su superficie interna como externa. Los nanotubos obtenidos fueron utilizados como andamiajes, para la síntesis de nanomateriales funcionales, tras la conjugación con distintos metales en su superficie externa e interna. Se observó que tras la conjugación con precursores metálicos, que se podían obtener nanopartículas distribuidas a lo largo del nanotubo, si se utilizaba un agente reductor fuerte, como el borohidruro de sodio, o una cubierta continua del metal, si se utilizaba un agente reductor suave como citrato de sodio. Así mismo determinaron, que las propiedades de los nanotubos, eran altamente variadas según el metal y agente reductor utilizado [5,40] (*Figura 5*). Mediante un análisis de potencial electrostático, determinaron que la histidina 316, el glutamato 315 y la asparagina 250, son los probables aminoácidos que favorecen la nucleación de nanopartículas (*Figura 4*).

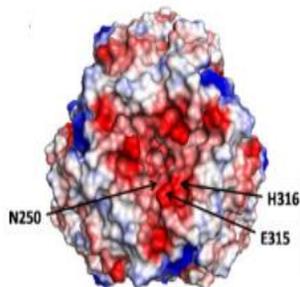


Figura 4: Mapa de potencial electrostático en trímero de VP6.

En rojo negativo, en azul positivo. Se muestran posibles aminoácidos de unión a iones metálicos [5].

Agente reductor utilizado		
Metal	NaBH ₄	Citrato de sodio
Plata [5]		
Oro [5]		
Platino[5]		
Plata (interior) [40]		

Figura 5: Micrografías electrónicas de la conjugación de nanotubos de VP6 con distintos metales.

Con el fin de entender la interacción entre células en cultivo y nanotubos de VP6, así como su posible aplicación como una alternativa de vacunación, *Rodríguez et al., 2014* [7] demostraron que es posible la internalización celular de la proteína VP6 y que esta respuesta celular era dependiente del tamaño y la forma en la cual se encontraba la proteína, ya que sólo la VP6 ensamblada en nanotubos podía internalizarse. Se ensayaron diferentes linajes celulares, se utilizaron inhibidores de endocitosis mediada por clatrina y claveolina sin obtener indicios de entrada de la proteína al interior celular. Se determinó que los nanotubos de VP6 sólo podían ser internalizados en macrófagos por medio de fagocitosis, debido probablemente a la interacción con receptores de membrana y balsas lipídicas de los macrófagos. Carreño-Fuentes [46] realizó pruebas de citotoxicidad mediante la medición de la actividad mitocondrial, con nanotubos funcionalizados con nanopartículas de plata y oro, en líneas de carcinoma pulmonar humano *A-549 ATCC® CCL-185™* y hepatocitos humanos *HepG2 ATCC® HB-8065™*, observando que los nanotubos con oro y sin cubierta mantienen viabilidades por arriba del 80%, al menos para los tiempos y la concentración de 30 µg/mL (*Figura 6*).

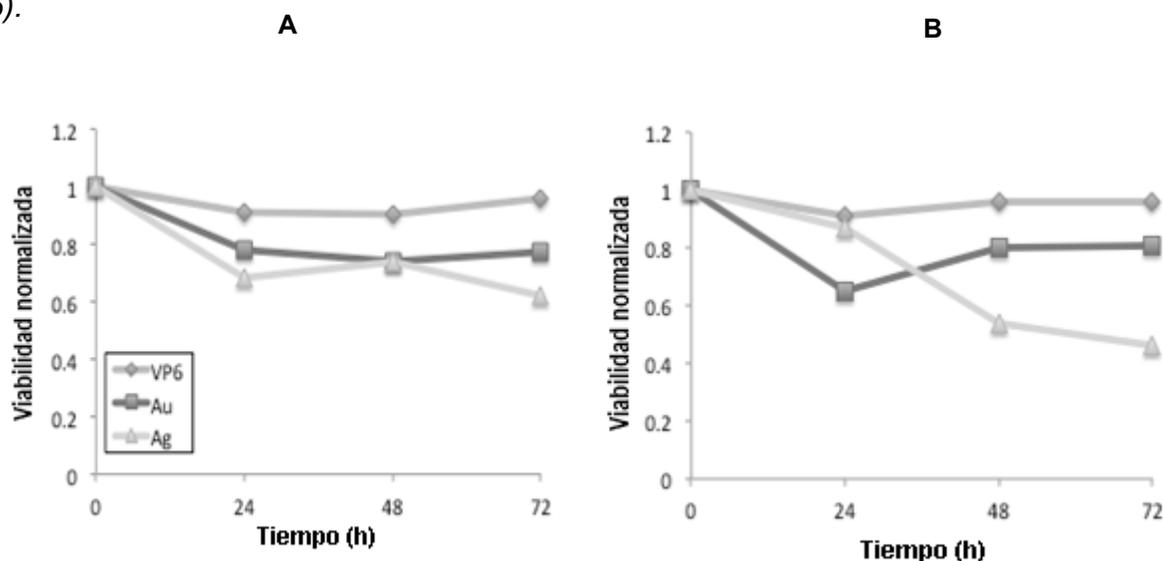


Figura 6: Cinética de exposición de nanotubos

NT sin conjugar (diamantes) y conjugados con oro (cuadro) y plata (triángulos). **A)** Células humanas de carcinoma pulmonar *A-549 ATCC® CCL-185™*. **B)** Hepatocitos humanos *HepG2 ATCC® HB-8065™*. Para ambos casos se utilizó una concentración de proteína de 30 µg/mL durante 72 h [46].

En el presente proyecto trabajaremos con nanotubos conjugados en su superficie externa con nanopartículas de oro. La propiedad conductora de estos nanomateriales [8] puede ser utilizada para conferir propiedades a cultivos celulares, que podría ser especialmente importante para cultivos de células eléctricamente activas, como los cardiomiocitos y las neuronas [16]. Utilizaremos células del tejido neuronal, ya que son células especializadas en propagar impulsos eléctricos en forma de potenciales de acción. Nos interesa estudiar una posible interacción con la propiedad conductora de los nanotubos de VP6 funcionalizados con oro, al ser utilizados como andamios para el crecimiento de células neuronales. El estudio de las interacciones célula-soporte, resulta relevante para el entendimiento y el desarrollo de nuevas terapias contra diversas enfermedades neurológicas [47-48].

2.3 Proteína VP6 y sistemas electroquímicos

Para considerar a los nanotubos de VP6 como candidatos para material de microelectrodo, es necesario caracterizar sus propiedades eléctricas (resistencia, capacitancia, inductancia). Los conductores eléctricos, como los metales se caracterizan por tener electrones libres en su capa de valencia y tras aplicar un potencial, es posible mover esos electrones a lo largo del metal. Lo anterior se conoce como conductividad eléctrica, la cual sigue la ley de Ohm (*Ecuación 1*) y establece que: *“La intensidad de corriente es directamente proporcional al voltaje aplicado e inversamente proporcional a la resistencia del material”*. Donde I corresponde a la corriente medida en amperios (A), E potencial medido en voltios (V) y R la resistencia dada en ohmios (Ω)

$$[1] \quad I = \frac{E}{R}$$

La eficiencia del flujo de electrones, está relacionada directamente con la distancia que tienen que recorrer (longitud del material), el diámetro o espesor del

material, la superficie así como su estabilidad ante el paso de potencial. La resistencia generada, es específica para cada material conductor y está dada por la expresión de la (Ecuación 2).

$$[2] \quad R = \frac{\rho l}{A}$$

Donde ρ es la resistencia específica del material en Ωcm , l la longitud en cm , A es el área transversal en cm^2 . Dependiendo lo que se quiera caracterizar, se emplearán técnicas que utilicen corriente directa o corriente alterna. En la corriente directa, las cargas solo fluyen en un solo sentido entre dos puntos en el material conductor, es decir no cambia de polaridad a través del tiempo. En corriente alterna, la corriente tiene un comportamiento sinusoidal, es decir la corriente es invertida (polarizada) constantemente a través del tiempo. (Figura 7).

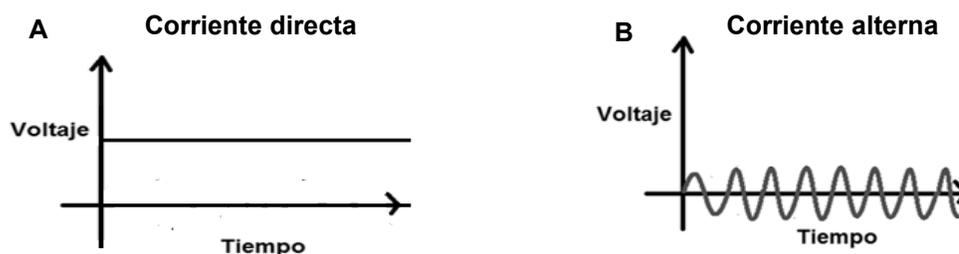


Figura 7: Esquema general de tipos de corriente.

A) Corriente directa no varía con respecto al tiempo. Una técnica que utiliza este tipo de corriente es la voltamperometría cíclica. **B)** Corriente alterna, tiene comportamiento sinusoidal, es decir cambia de polaridad a través del tiempo. La espectroscopia de impedancia electroquímica utiliza este tipo de corriente.

Los sistemas en solución, siguen los mismos principios y leyes que los sistemas sólidos, sólo que en este caso, se estudiaría la conductividad iónica, generada por dos especies electrolizadas en solución. Estas especies son capaces de permitir el flujo de iones, consecuencia de un estímulo eléctrico. En este caso la conductividad iónica, es dependiente de la concentración de los o el electrolito presentes en el medio y está dada por la (Ecuación 3).

$$[3] \quad L = \frac{1}{R}$$

Donde L es la conductancia del electrolito Ω^{-1} y R corresponde a la resistencia de la solución. Dado que la conductancia depende de la concentración de iones en la solución, la conductividad específica (κ) es distinta para cada electrolito y se encuentra en función de la resistencia específica de cada electrolito (ρ). La conductancia específica, se define como la conductancia de 1 cm^3 de disolución de electrolito. (Ecuación 4)

$$[4] \quad \kappa = \frac{1}{\rho}$$

Para obtener las propiedades eléctricas de un material en particular, es necesaria la implementación de circuitos eléctricos o electrolíticos, que ayuden a discernir los fenómenos de transporte de carga. Tales circuitos deben ser cerrados, es decir que exista continuidad con la fuente emisora de energía y los diferentes componentes eléctricos del sistema. Los circuitos pueden arreglarse en configuración paralela o en serie, de igual manera es posible llevar a cabo su análisis, implementando circuitos equivalentes, que consisten en modelos matemáticos que buscan resolver, los diferentes elementos eléctricos del sistema, mediante un ajuste con un modelo ideal. (Figura 8).

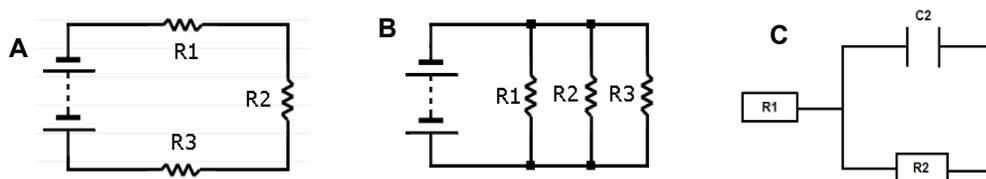


Figura 8: Circuitos eléctricos.

A) Circuito en serie. **B)** Circuito en paralelo. **C)** Circuito equivalente.

Elementos eléctricos: $\text{---}|\text{---}$ capacitor, $\text{---}\text{---}\text{---}$ resistor.

Los sistemas electroquímicos se asemejan a los circuitos eléctricos mostrados en la figura 7. Son sistemas heterogéneos altamente sensibles, que a través de una perturbación eléctrica, se pueden caracterizar reacciones en la

interfase. Para el estudio de materiales, podemos generar una interfase entre una molécula electroactiva en solución de respuesta conocida (compuesta por un electrolito en altas concentraciones, encargado de evitar la difusión de electrones fuera del seno de la solución y una molécula que permita fácilmente el intercambio de electrones en la interfase) y el material de estudio. Es posible asociar las respuestas generadas por la especie electroactiva, al material de estudio, permitiéndonos estudiar fenómenos eléctricos como transferencia de carga, resistencia, capacitancia, etc.

Los componentes principales de los sistemas electroquímicos, son los electrodos, donde a través de un arreglo eléctrico, depósito o anclaje sobre los electrodos, es posible el estudio de diferentes materiales. Los electrodos que conforman el sistema electroquímico que será utilizado en el presente trabajo, consisten en un arreglo de tres electrodos, un electrodo de trabajo, uno de referencia y uno auxiliar. Los electrodos y la solución electroactiva, confinados en un mismo espacio, se les denomina celda electroquímica. Todos los electrodos, se encuentran conectados a un potencióstato. El electrodo de trabajo (material de estudio), es el encargado de coleccionar los electrones generados en la interfase y al que se le impone un potencial. Existen varios aspectos importantes a considerar en el montaje del electrodo de trabajo, debido a que pudieran existir falsas respuestas, que nos llevarían a la mala interpretación de datos y fenómenos. Debe asegurarse la continuidad eléctrica entre el electrodo de trabajo y el potencióstato, ya que falsos contactos, generarían señales inespecíficas en las respuestas electroquímicas. Para el estudio de algunos materiales como proteínas y debido a que muchas proteínas son solubles en soluciones acuosas, es necesario realizar un anclaje o encapsulado, a un material conductor para asegurar el cierre del circuito eléctrico. Los electrodos de trabajo, por lo general en los sistemas electroquímicos, son de áreas no mayores a 1 cm^2 y por tanto se necesita muy poca cantidad del material de estudio, esto representa una ventaja para el estudio de materiales biológicos, dado a que en algunas ocasiones, no es posible tener una gran cantidad de material para su estudio, lo que a su vez, reduce los costos de operación. El electrodo de referencia presenta un potencial estándar antes de la perturbación eléctrica, que

dependerá del tipo de electrodo que se utilice. Tras incidir un potencial en el sistema electroquímico, se da una diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, generando a su vez una corriente eléctrica, datos que son recopilados en el potenciostato. El electrodo auxiliar, mantiene los electrones constantes en la solución, contrarrestando los electrones generados por el electrodo de trabajo. (Figura 9)

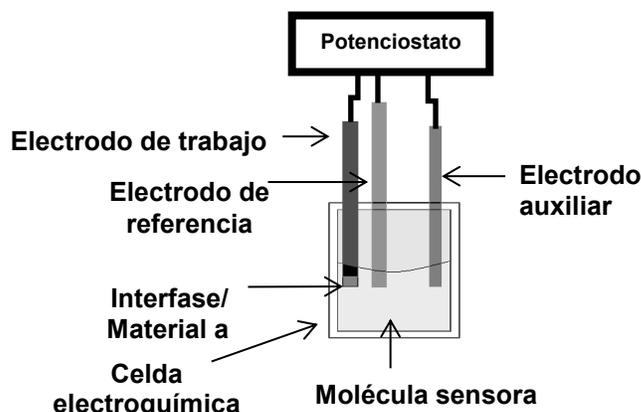


Figura 9: Sistema electroquímico.

Representación general del sistema electroquímico de tres electrodos utilizado para la caracterización de reacciones en la interfase. Electrodo de trabajo de carbón vítreo, electrodo auxiliar de platino, electrodo de referencia de calomel, se utilizó como molécula sensora ferricianuro de potasio.

Un aspecto importante a considerar, es que en la interfase, sin incidir ninguna perturbación eléctrica al sistema electroquímico, se llevan a cabo una serie de interacciones electrostáticas, entre la superficie del electrodo de trabajo y la solución electroactiva, que dan origen a una zona llamada doble capa eléctrica. En la doble capa eléctrica, se da la acumulación de cargas, por las interacciones entre las diferentes moléculas en la interfase, funcionando como un capacitor. El flujo constante de moléculas en la doble capa, generan una corriente capacitiva, que no está relacionada con la oxidación-reducción de los soportes, ni con el flujo de electrones, es propia de la interacción del material analizado y la solución. La doble capa eléctrica es dependiente de la composición del electrodo, el tipo de electrolito utilizado, el solvente, la temperatura y grado de especificidad de absorción de moléculas. Dependiendo del tipo de interacciones presentes en la

doble capa, la corriente capacitiva, puede o no, interferir con las mediciones electroquímicas. Los materiales que componen al electrodo de trabajo, son determinantes en las interacciones en la doble capa. Algunos materiales, después de la adsorción de cargas en la doble capa, disminuyen la capacidad del electrodo de trabajo de transferir electrones, actuando como inhibidores, esto puede ser debido a la fuerte adsorción que crea un efecto aislante en la superficie del electrodo. En contraparte, otros materiales componentes del electrodo de trabajo, pueden potenciar la transferencia de carga en la interfase. Las interacciones en la doble capa, van a generar el potencial de circuito abierto (OCP), el cual se da sin incidir ninguna perturbación eléctrica, pudiendo ser registrado a través del tiempo y varía según los componentes de la interfase. Tras una perturbación eléctrica (potencial), se genera carga en el electrodo, en la solución electroactiva y en la doble capa (interfase). Los solventes dipolares como el agua, interactúan sobre la superficie del electrodo. Superficies cargadas negativamente, se ven afectadas en mayor proporción por el agua, debido a la adsorción de H^+ , no obstante, se puede dar la adsorción de moléculas neutras o de carga positiva, esta adsorción dependerá de la carga y material del electrodo. [49–51]. (Figura 10).

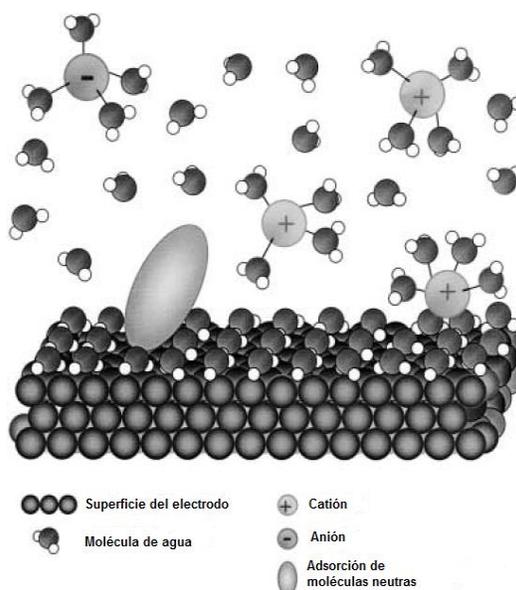


Figura 10: Representación de la doble capa eléctrica.

Se observan las distintas contribuciones en la interfase. Modificado de [49]

Existen diversas técnicas que utilizan los sistemas electroquímicos. La selección particular dependerá del fenómeno de estudio. Entre estas técnicas, tenemos la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), donde a través del uso de corriente altera (sinusoidal) y la variación de la frecuencia a lo largo del tiempo, se puede obtener valores de resistencia del material de estudio, capacitancia de la doble capa eléctrica, entre otras propiedades eléctricas de los materiales de estudio [52–54]. La voltamperometría cíclica (CV) es una técnica que utiliza corriente directa, que consiste en incidir un barrido potencial constante sobre el electrodo de trabajo, el cual permite la reducción de la especie electroactiva en la solución, seguida de la inversión del potencial, para realizar la oxidación de la especie, permitiendo estudiar fenómenos de transferencia de carga y determinar la reversibilidad de dicho proceso [55-56]. En la *figura 11* se presentan ejemplos de los gráficos obtenidos a partir de las técnicas de EIS y CV. En la *figura 11-A*, se presenta el gráfico de Nyquist, se ven representadas las diferentes resistencias, que conforman el sistema electroquímico, e indica que la capacitancia de la doble capa, se obtiene a partir de la frecuencia en la cual el ángulo de fase es igual a 90° . En la *figura 11-B*, se presenta un voltamperograma de un proceso redox reversible, se observa el pico máximo de corriente anódica (I_{pa}), donde se llevan a cabo el proceso de oxidación y el pico máximo de corriente catódica (I_{pc}), donde la especie está siendo reducida. El ejemplo muestra un electrodo de calomel saturado (SCE) como electrodo de referencia. Estas técnicas nos ayudan al estudio de las propiedades eléctricas de distintos materiales, con el fin de encontrar a los mejores candidatos para generar sistemas electroquímicos mucho más eficientes [57].

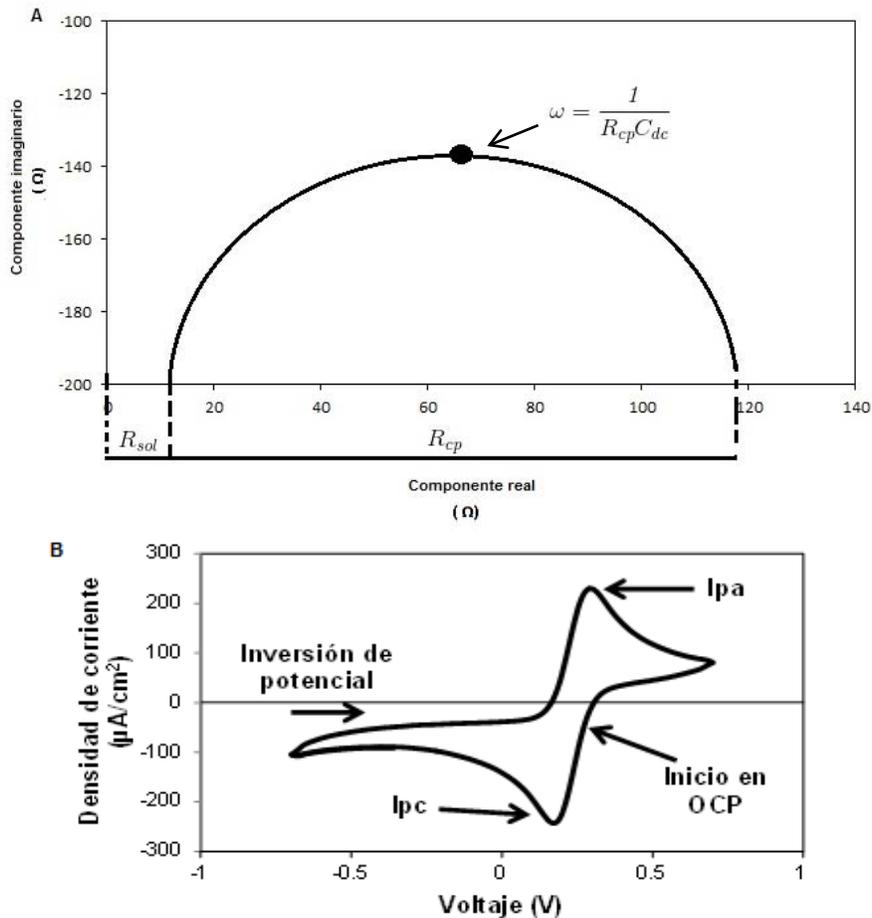


Figura 11: Representación gráfica de pruebas electroquímicas

A). Diagrama de Nyquist. Representación gráfica, de las pruebas de espectroscopia de impedancia electroquímica. A partir de este gráfico y por medio de un ajuste equivalente se obtienen valores de resistencia y capacitancia del sistema analizado. **R_{sol}** , representa la resistencia de la solución electroactiva. **R_{cp}** a la resistencia a la transferencia de carga, la cual está directamente relacionada con el material de estudio. ω representa la frecuencia a la cual el ángulo de fase es 90° , y a partir de ese valor es posible realizar el cálculo de la capacitancia de la doble capa eléctrica. Modificado de [52]. **B) Voltamperograma.** Respuesta de un proceso redox reversible típico, obtenida de la prueba voltamperometría cíclica. Donde **I_{pc}** representa el pico máximo de intensidad de corriente catódica, que corresponde a fenómenos de reducción de la especie electroactiva. **I_{pa}** corresponde al pico máximo de intensidad de corriente anódica, donde ocurren fenómenos de oxidación de la especie electroactiva Modificado de [55].

*Nota para futuros diagramas de Nyquist y voltamperogramas reportados en el presente trabajo:

En el diagrama de Nyquist. El componente real, corresponde a la resistencia del sistema en cada frecuencia y será indicado como Z_r , con unidades Ω . El componente imaginario corresponde a la capacitancia en cada frecuencia dada, y será indicado como $-Z_i$, con unidades Ω .

En el voltamperograma. Densidad de corriente será indicada como J . Voltaje será representado como E/V vs SCE, donde E indica el potencial incidido sobre el electrodo de trabajo, V se refiere a las unidades en voltios y SCE se refiere al electrodo saturado de calomel de referencia.

Justificación

Existe una necesidad continua de combatir enfermedades neurológicas. Para esto, entre las opciones disponibles se encuentra el desarrollo y mejoramiento de microelectrodos con materiales más seguros y efectivos que favorezcan la comunicación celular y minimicen los efectos colaterales tras su uso. Debido a sus características estructurales, los nanobiomateriales, particularmente los nanotubos de VP6, pueden ser una alternativa muy atractiva para el diseño de microelectrodos destinados a la terapia de enfermedades neurológicas. Específicamente, los nanotubos de VP6 se obtienen de manera sencilla, sintetizados a partir de proteínas autoensamblables; son producidos de manera recombinante y pueden ser funcionalizados con diversos metales sin la necesidad de utilizar condiciones extremas, como temperatura y uso de solventes. Es así que las propiedades eléctricas de los nanotubos de VP6 funcionalizados con oro y su baja citotoxicidad, previamente estudiadas en nuestro grupo de trabajo, abre la posibilidad de emplear estos nanobiomateriales novedosos en aplicaciones relacionadas al estudio de células neuronales y potenciales desarrollos a largo plazo como dispositivos neuroterapéuticos.

Hipótesis

Un soporte de nanotubos de VP6 funcionalizados con oro servirá de andamio para el crecimiento de células neuronales, posibilitando el desarrollo de sistemas de estimulación y/o medición de señales eléctricas tanto *in vivo* como *in vitro*.

Objetivos

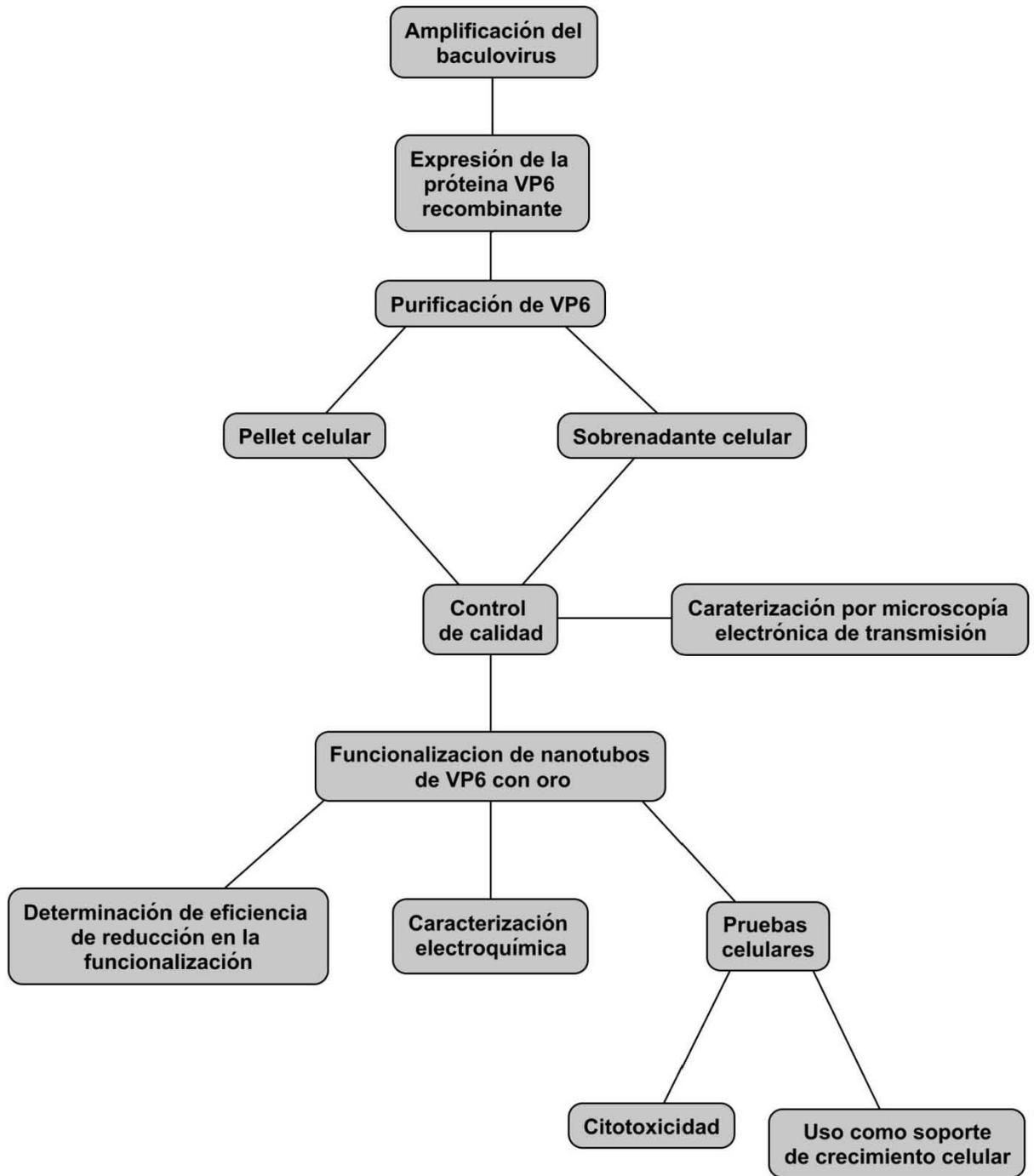
General

- Estudiar la interacción entre nanotubos de VP6 funcionalizados con oro y células neuronales.

Particulares

- Caracterizar las propiedades eléctricas en sistemas electrolíticos de los nanotubos de VP6 funcionalizados con oro, como componente de un electrodo de trabajo en un sistema electroquímico.
- Determinar la citotoxicidad de los nanotubos funcionalizados con oro en células neuronales en cultivo.
- Observar el crecimiento de células neuronales cultivadas sobre un soporte de nanotubos de VP6 funcionalizados con oro.

Diagrama general de proceso



Capítulo 3. Materiales y métodos.

3.1 Producción de nanotubos

El baculovirus recombinante (donado por la Dra. Susana López IBT-UNAM) fue amplificado a partir de una unidad formadora de placa que contenía el bacmido bac-VP6. La placa fue re-suspendida en medio cultivo SF900™ II SFM de Invitrogen™. Se realizó una infección con 500 µL del re-suspendido en 50 mL del mismo medio en células SF9 (ATCC®CRL-1711™ - *Spodoptera frugiperda*) mantenidas en agitación a 110 rpm y 27 °C, hasta alcanzar una viabilidad del 30%. La viabilidad y densidad celular fueron determinadas por procedimiento manual con hemocitómetro y mediante la técnica de azul de tripano, correlacionado la densidad celular con mediciones automáticas y usando un equipo *Coulter Beckman*™. Esta metodología fue utilizada para todas las mediciones de viabilidad del presente documento. El sobrenadante de cultivo fue cosechado mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 10 min, conservado con 2% de suero fetal bovino y cubierto de la luz a 4 °C [6]. Se realizó la titulación siguiendo los lineamientos mencionados en Mena *et al.*, 2003 [58].

La producción de la proteína recombinante VP6 se realizó usando el sistema células de insecto-baculovirus y se llevó a cabo como se describe en [6], [59]. Se realizaron cultivos de la línea celular High Five™ (*Trichoplusia ni*) (H5) en suspensión, en matraz de 1 L, con un volumen final de 250 mL de medio de cultivo *Protein Sciences Fortified Media (PSFM)*, mantenidos en agitación a 110 rpm y 27 °C. La densidad celular inicial fue de 0.5×10^6 células/mL. Se siguió la cinética de crecimiento cada 12 h hasta alcanzar una densidad celular entre 1.1×10^6 - 1.2×10^6 células/mL, con una viabilidad mayor al 95%.

Las células High Five™ fueron infectadas con el baculovirus bacVP6 a una multiplicidad de infección (MDI) de 0.1 ufp/célula.

Se registró la cinética de infección, verificando densidad y viabilidad celular cada 24 h. El cultivo fue cosechado a las 96 h post-infección (hpi), una vez alcanzada una viabilidad entre el 80-70%. El sobrenadante fue clarificado por medio de centrifugación a 4,000 rpm por 10 min, mantenido el sobrenadante de cultivo a 4 °C

con 0.05% de azida de sodio y el paquete celular resultante a -20°C , hasta su posterior utilización.

3.2 Purificación de VP6 a partir de sobrenadante de cultivo.

El sobrenadante de cultivo, se concentró por ultrafiltración cuatro veces con respecto al volumen original, en un sistema *Amicon*[®]-*Millipore* (sistema utilizado en todos los pasos de ultrafiltración del presente trabajo), utilizando una membrana de 100 kDa, para eliminar así moléculas de bajo peso molecular.

La purificación fue realizada mediante cromatografía. Con el fin de no saturar la columna, se determinó la concentración de proteína total, por el método de Bradford de *Bio-Rad* (método utilizado para todas las cuantificaciones de proteína total). Este método consiste en la unión del colorante Azul Brillante G-250 principalmente con los residuos de arginina y aminoácidos aromáticos constituyentes de proteínas, donde a través de la lectura de absorbancia en el espectro de luz visible a 595 nm, se obtiene la concentración de proteína total de la muestra. Se usó como curva estándar albumina bovina a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Se realizaron 2 pasos de cromatografía en un equipo *AKTAprime Plus*[™]. Se inició con cromatografía de intercambio aniónico, donde se utilizó una columna *XK-16* de *GE Healthcare* empacada con 30 mL de resina *Q-Sepharose*[™] *Fast Flow* a un flujo 5 mL/minuto, registrando lecturas de absorbancia a 280 nm. Se realizaron lavados con 10 volúmenes de columna con NaOH 1 M, un igual número de volúmenes con agua grado *MiliQ*, después etanol al 50 % y finalmente agua *MiliQ*. La columna se regeneró con 5 volúmenes con buffer B (Tris-HCl 30 mM, 0.1 mM de EDTA, 1 M de NaCl, pH 6.16) y para equilibrar la columna se emplearon 5 volúmenes de buffer A (Tris-HCl 30 mM EDTA 0.1 mM, pH 6.16). Como control se verificó que los valores de conductividad, pH y absorbancia permanecieran constantes al momento de hacer el cambio de solución para asegurar la ausencia de posibles contaminantes en la columna.

Se inyectaron a la columna, 20-25 mL del sobrenadante clarificado concentrado. Posteriormente, se pasaron 90 mL de buffer A. VP6 se obtiene a los

75 mL después de iniciada la inyección de la muestra, que corresponden al volumen “no pegado” de la columna. Tal fracción fue concentrada por ultrafiltración usando una membrana de 30 kDa. Así, las moléculas con carga neta negativa permanecen retenidas en la columna, principalmente proteína gp64 de la envoltura lipídica del baculovirus y ácidos nucleicos viral y celular. Para desprender las proteínas contaminantes adheridas, se aumentó la fuerza iónica haciendo pasar buffer B por la columna.

Como siguiente paso de purificación, se realizó una cromatografía de exclusión molecular. Se inyectaron volúmenes de 30-35 mL del concentrado anterior a una columna *XK-26* de *GE Healthcare* empacada con 400 mL de resina *Toyoperl HW65F* de *TOSOH Biosciences*, empleando un flujo de 2.5 mL/min. La columna se equilibró con al menos 2 volúmenes de buffer Tris-HCl 30 mM, EDTA 0.1 mM pH 8. Esta parte sirve para separar proteínas de bajo peso molecular al igual que proteína no ensamblada en nanotubos de VP6, es decir VP6 en monómeros y/o trímeros. Los nanotubos de VP6 ensamblados salen en el volumen vacío de columna, es decir el volumen que no es retenido en los poros de la columna, esto ocurre a los 150 mL después de inyectada la muestra, que corresponde al primer pico del cromatograma. Se realizó una última etapa de concentración por ultrafiltración con una membrana de 30 kDa. El concentrado se almacenó a 8 °C con azida de sodio al 0.05 %, para ser analizado y utilizado posteriormente.

Control de calidad

Para la determinación de pureza de la proteína se realizaron geles de poliacrilamida al 10% SDS-PAGE desnaturizantes, corridos a 30 mA por 30 min y teñidos con azul de comassie. Se empleó un *ChemiDoc™* de *Bio-Rad* para la digitalización de imágenes. Se utilizó *BenchMark™ Thermo Fisher* como marcador de peso molecular para todos los geles.

Se realizó una detección específica de la proteína VP6 por western blot. Se realizó una transferencia a una membrana de 6.5 x 8 cm de nitrocelulosa de

Millipore empleando un equipo *Trans-Blot® Turbo Transfer System™* de *Bio-Rad* a 250 mA durante 30 min. La membrana se sometió a bloqueo durante una hora con leche entera en polvo al 5% en PBS-T. Se lavó la membrana con PBS-T durante 10 min en agitación constante, tres veces. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti-rotavirus de conejo cepa NCDV (donado por Dra. Susana López y amplificado en conejos por la MC Ruth Pastor IBT-UNAM) en una dilución 1:3,500 en PBS-T con 0.1% de leche descremada en polvo, por una hora en agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó tres veces la membrana con PBS-T durante 10 min en agitación constante. Se agregó el anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa (*Jackson Immunoresearch Labs*) a una dilución 1:4,000 en PBS-T, con 0.1% de leche descremada en polvo y se incubó por una hora, para posteriormente lavar por 10 min con PBS-T. La actividad de peroxidasa se detectó por quimioluminiscencia con el kit *Western Ligthning Plus ECL* de *Pekin-Elmer*, colocando un volumen igual de las soluciones oxidante y luminol (250 µL c/u). Se empleó el *ChemiDoc™* de *Bio-Rad* para visualizar y captar imágenes. Como marcador de peso molecular se utilizó *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* de *Bio-Rad*.

3.3 Purificación de VP6 a partir de pellet.

Esta parte fue realizada con ayuda del Ing. Víctor López del *Instituto de Biotecnología UNAM*. Se realizó un paso de precipitación con buffer de acetatos al 40%. El paquete celular obtenido, fue re-suspendido en 200 mL de buffer que contenía 50 mM de acetatos y 100 mM de NaCl a pH 3.0. Se realizaron 3 fases de congelado y descongelado, de -20 °C a temperatura ambiente, con el fin de liberar la proteína VP6 al medio. El pH tan extremo tuvo el propósito de eliminar por precipitación, contaminantes posibles en la muestra. Se centrifugó la muestra a 10,000 rpm durante 10 min.

Se cuantificó proteína total y se realizó un solo paso de purificación. Inyectando 50 mL del sobrenadante a una columna de intercambio catiónico, *SP Sepharose High Performance™* GE, en el equipo *AKTAprime Plus™* a un flujo de

trabajo de 3 mL/min. La proteína de interés queda adsorbida en la resina. La muestra fue eluída con buffer 30 mM Tris, 1 M NaCl a pH 8 y detectada como el pico 2 del cromatograma. En este paso de cromatografía se obtiene a la proteína VP6 desensamblada debido a la fuerza iónica del buffer de elución utilizado.

Se concentró la muestra por ultrafiltración, con una membrana de 30 kDa. La muestra se almacenó en refrigeración con 0.05% de azida de sodio. Posteriormente los monómeros de la proteína VP6 se re-ensamblaron en nanotubos por medio de diálisis, utilizando una membrana *Spectra/Por® Spectrum®* de corte de 6-8 kDa. La diálisis se realizó contra un buffer de 30 mM Tris-HCl, 0.1 mM ZnCl₂ a pH 8.0 para disminuir la fuerza iónica y lograr una formación de nanotubos adecuada. Lo anterior durante toda la noche con un cambio de buffer a las 2 h de iniciada la diálisis.

Como control de calidad de la proteína pura se analizó por western blot y gel de poliacrilamida, tal como se indica en el apartado anterior,

3.4 Integridad de los nanotubos.

La integridad de los nanotubos fue corroborada por microscopía electrónica de transmisión en rejillas de formvar-carbón F-200-Cu de *Electron Microscopy Sciences*. Diez µL de muestra fueron depositados en la rejilla, dejándose reposar durante 5 min, pasado el tiempo la gota de muestra fue retirada con papel filtro libre de pelusas cuidando de no tocar el centro de la rejilla. Se agregaron 10 µL de acetato de uranilo al 2% (colorante de tinción negativa) dejando incubar durante 3 min. Se repitió el paso de secado y se agregaron 10 µL de agua, incubando por 1 min y secando. Las rejillas fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión, *Libra 120 Zeiss*, a un voltaje de aceleración de 80 kV, con ayuda de la *Dra. Guadalupe Zavala de la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Biotecnología*.

Los nanotubos de VP6 purificados de sobrenadante se desensamblaron con 250 mM de CaCl₂ a temperatura ambiente en agitación constante por 2 h. Posteriormente se re-ensamblaron por medio de diálisis utilizando una membrana

Spectra/Por®, *Spectrum*® corte 6-8 kDa contra 4 L de buffer 30 mM Tris-HCl a pH 8.0, con el fin de eliminar el calcio, disminuir la fuerza iónica y lograr una formación de nanotubos. Lo anterior durante toda la noche, con un cambio de buffer a las 2 h de iniciada la diálisis. Para lograr un reensamblaje eficiente fue necesaria una concentración de proteína VP6 entre 60-200 µg/mL [60][46].

3.5 Comparación de rendimientos

Se comparó el rendimiento de purificación a partir de sobrenadante y pellet. El rendimiento de purificación de sobrenadante fue calculado tomando como base al sobrenadante clarificado como el 100% de proteína total, por el método de Bradford, mientras que para la purificación de pellet se tomó el pellet re-suspendido en buffer de acetatos como el 100%.

3.6 Funcionalización de nanotubos

Se siguió el protocolo señalado en [5]. Los nanotubos de VP6 purificados fueron llevados a una concentración de 25 µg/mL con agua ultrapura filtrada por 0.22 µm y preparada al momento (paso determinante para evitar agregados de nanopartículas y una funcionalización aparentemente más eficiente). En caso de ser necesario, se hicieron lavados hasta eliminar lo más posible las sales contenidas en la muestra de proteína (0.05 mM de buffer Tris-HCl, en el cual se encontraba originalmente la muestra) usando un *Amicon Ultra-4 and -15 Centrifugal Filter Units –100,000 NMWL* de *Millipore*, centrifugando a 2000 rpm. Se observó que cuando era utilizado un corte menor de membrana los nanotubos se desensamblaban, efecto visto principalmente en los nanotubos purificados a partir de pellet celular. Los nanotubos libres de sales se incubaron con 1 mM de ácido cloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) por 3 h en la oscuridad y en agitación constante. Transcurrido el tiempo, se llevó a cabo la reducción a Au^0 usando 1 mM de borohidruro de sodio, generando la síntesis *in situ* de nanopartículas de oro y dejando reposar durante 1 h. Una vez sedimentados los nanocomplejos, se retiró

el exceso de la solución, cuidando no perturbar el sedimento para evitar la pérdida de nanotubos funcionalizados. Se realizó un lavado con agua y el material se almacenó a 4 °C resguardado de luz.

Para comprobar la funcionalización efectiva, los nanotubos fueron observados por microscopia electrónica de transmisión, con el procedimiento previamente descrito. Para la preparación de la muestra, se realizaron todos los pasos mencionados anteriormente, excepto la tinción con acetato de uranilo, ya que el metal que recubre a los nanotubos de VP6 funcionalizados, les confiere electrodensidad.

Para las pruebas que requerían ambiente estéril, los nanotubos sin funcionalizar y funcionalizados fueron sometidos a radiación UV durante 15-30 min. La integridad estructural aparente fue verificada por microscopia electrónica de transmisión.

3.7 Determinación de eficiencia de reducción de $Au^{+3} \rightarrow Au^0$ en los nanotubos de VP6.

Mediante los métodos descritos en [[61], [62]], pero con algunas adecuaciones, se cuantificó oro para obtener la eficiencia de reducción de Au^{+3} a Au^0 , durante el proceso de funcionalización. Se utilizó el sobrenadante de la reacción de reducción con el fin de eficientar el uso de nanotubos de VP6 funcionalizados.

3.7.1 Preparación de curva estándar.

Se determinó que el intervalo de trabajo sería de $4-8 \times 10^{-3}$ mM de $AuHCl_4 \cdot 3H_2O$. Los experimentos se realizaron por cuadruplicados. Para poder cuantificar oro a partir de nanopartículas, debido a que se encuentran en estado metálico, fue necesario realizar la disolución de nanopartículas de oro. Esto es posible, tras la exposición con HNO_3 y HCl , ácidos componentes del agua regia, que provocan la oxidación de las nanopartículas, dejando oro (III) en solución. Se mezclaron volúmenes iguales de agua regia y muestra a cuantificar, utilizando

placas de 96 pozos resistentes a ácidos y calentando la mezcla a 80 °C durante 8 h para lograr la evaporación. La muestra completamente seca se reconstituyó en 120 µL de buffer de acetato de sodio 1 M. Se determinó que el paso de secado, era limitante para la realización del análisis ya que la reacción es pH dependiente.

En placas diferentes a las utilizadas para la evaporación se realizó la mezcla indicada en la *tabla 1* hasta un volumen final de trabajo de 350 µL. Se mezcló durante 5 min e incubó por 40 min a 37 °C. Se realizó la lectura de absorbancia en el lector de microplacas a 570 nm en un volumen de 200 µL por pozo.

Tabla 1: Preparación de mezcla de reacción para cuantificación de oro (III).

Reactivo	(µL)	Concentración final
Buffer de acetatos pH= 4.6 (1 M)	87.5	250 mM
Floxina B (10 mM)	7	0.2 mM
Metilcelulosa (1%)	35	0.1%
Tiamina (10 mM)	35	1 mM
Agua	85.5	NA
Muestra	100	NA

3.8 Caracterización electroquímica.

Condiciones generales del sistema electroquímico.

Esta parte experimental se realizó en las instalaciones del Instituto de Energías renovables-UNAM con asesoría de la Dra. Margarita Miranda y el M.C. Andrés Arrocha.

Para las pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) y voltamperometría cíclica (CV) se montó un sistema electroquímico. Se utilizó una malla de platino puro como electrodo auxiliar, un electrodo saturado de calomel como referencia y una punta de carbón vítreo (GC) de 3 mm de diámetro como electrodo de trabajo. Como solución electroactiva de referencia, se utilizó una solución de 10 mM de ferricianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$) con 1 M de cloruro de potasio (KCl), utilizando agua grado *Milli-Q* como disolvente. La oxidación de la

interfase por el oxígeno ambiental fue controlada con una cama de nitrógeno gaseoso en la celda electroquímica. Se utilizó un potenciostato-galvanostato *VoltaLab-40* de *Radiometer analytical* para incidir el potencial externo y registro de las respuestas obtenida. El software utilizado para la obtención de datos fue *VoltaMaster-4*. Todas las pruebas fueron realizadas a temperatura ambiente. En la *figura 12* se presenta un esquema general del sistema.

3.8.1 Inmovilización de la proteína.

Dadas las propiedades de solubilidad de VP6, se utilizó una molécula encapsulante para anclar la proteína al electrodo de carbón vítreo. Debido a sus características físicas y químicas, reportadas en la literatura, se decidió utilizar al polímero *Nafion*® de *Sigma-Aldrich* (nafion) como encapsulante, que forma una membrana con capacidad de intercambio catiónico. [63]–[65].

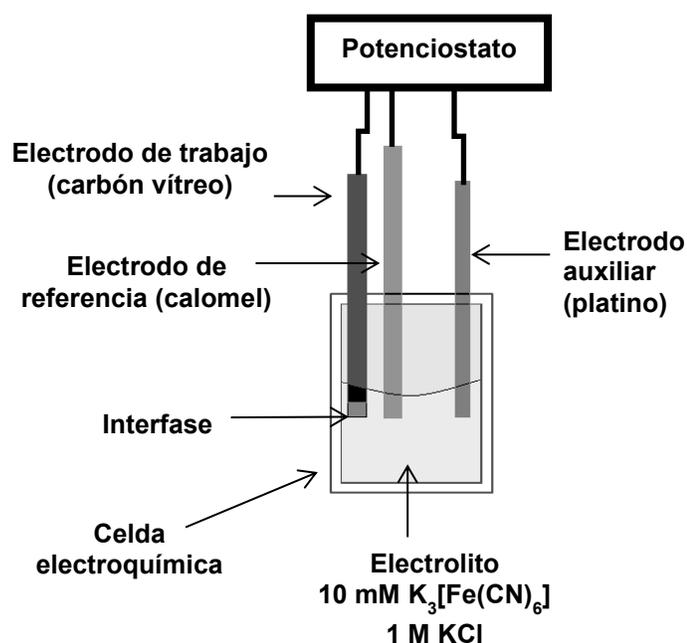


Figura 12: Sistema electroquímico utilizado.

Para demostrar que la presencia del nafion en la interfase, no intervendría en la respuesta de la proteína VP6 al ser analizada, se depositaron películas de

nafion sobre electrodo de trabajo (GC). Con el fin de evaluar el comportamiento de VP6 ante el polímero, se utilizaron dos concentraciones de nafion: 0.05% peso/volumen (p/v) y 0.2% p/v, realizando los ajustes de concentración de nafion con isopropanol. Se utilizó la técnica de voltamperometría cíclica, realizándose un barrido en una ventana de potencial de -700 mV a 700 mV, a dos velocidades (200 mV/s y 20 mV/s) y la solución electroactiva de ferricianuro de potasio mencionada en el apartado anterior. Los resultados obtenidos de las voltamperometrías de los electrodos con nafion fueron empleados como controles de respuesta eléctrica negativa, mientras que la respuesta del electrodo de carbón vítreo fue tomado como control de respuesta positiva de un proceso redox. *Ver tabla 2.*

Tabla 2: Controles de referencia

<i>Composición</i>	<i>Notación corta</i>
Carbón vítreo	GC
GC–Nafion 0.2%	Nafion 0.2%
GC–Nafion 0.05%	Nafion 0.05%

Se formaron diferentes encapsulados sobre el electrodo de GC previamente lijado y pulido con alúmina de 0.05 μm . Se prepararon de manera general, agregando 1.5 μL de nafion sobre el carbón vítreo, posteriormente la proteína VP6 a analizar (0.4 μg de proteína totales) y finalmente 1.5 μL de nafion. Cada componente fue adicionado uno a la vez, secando las diferentes capas a temperatura ambiente. En la *figura 13* se presenta una ilustración del encapsulado. En la *tabla 3 y 4* se describe la composición de los diferentes electrodos de trabajo analizados.

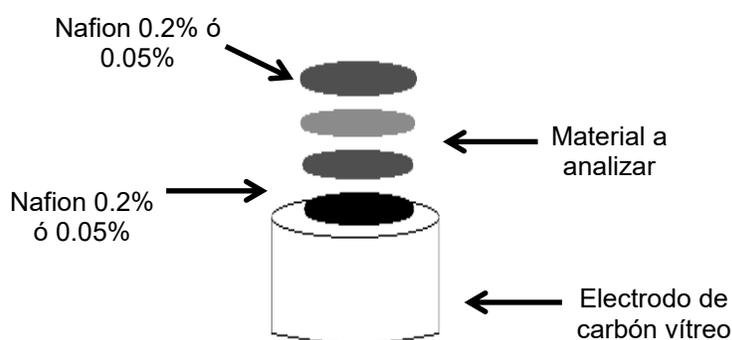


Figura 13: Estructura de preparación de electrodos inmovilizados.

Tabla 3: Electroodos de trabajo

<i>Composición</i>	<i>Notación corta</i>
GC– Nafion 0.2%–NT*- Nafion 0.2%	NT 0.2%
GC– Nafion 0.05% -NT- Nafion 0.05%	NT 0.05%
GC– Nafion 0.2 %–NTAu**- Nafion 0.2 %	NTAu 0.2 %
GC– Nafion 0.05 % -NTAu- Nafion 0.05 %	NTAu 0.05 %

*NT= Nanotubos de VP6

**NTAu = Nanotubos de VP6 funcionalizados con oro

Tabla 4: Control de proteína de referencia

<i>Composición</i>	<i>Notación corta</i>
GC–Nafion 0.2% -BSA*-Nafion 0.2%	BSA 0.2%
GC– Nafion 0.05% -BSA- Nafion 0.05%	BSA 0.05%

3.8.2 Caracterización de potenciales de circuito abierto (OCP).

Utilizando el sistema electroquímico descrito en la *figura 12*, se determinó el OCP durante un minuto para cada uno de los electrodos de las *tablas 3 y 4*. Este análisis revela la interacción del electrodo de trabajo y la solución electrolítica, sin necesidad de utilizar alguna perturbación eléctrica.

3.8.3 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).

Con el objetivo de mantener controlada la difusión de iones se utilizó un electrodo de disco rotatorio de GC (CTV1-01) a una velocidad de 1,500 rpm. Los ensayos de EIS se realizaron en un intervalo de frecuencias 50 KHz a 1 Hz, realizando el barrido de altas a bajas frecuencias. En esta técnica se aplica una señal sinusoidal con amplitud 10 mV pico-pico. Se utilizó $K_3[Fe(CN)_6]$ como solución de trabajo. Los electrodos de trabajo analizados con esta técnica, fueron los señalados en las *tablas 3 y 4*.

3.8.4 Voltamperometría cíclica (CV).

Los experimentos fueron realizados a dos velocidades de barrido, 200 mV/s y 20 mV/s, en una ventana de potencial de 700 mV a -700 mV. Los procesos redox se siguieron utilizando $K_3[Fe(CN)_6]$ como solución de respuesta conocida. Los electrodos de trabajo analizados con esta técnica, fueron los señalados en las *tablas 3, 4 y 5*.

Tabla 5: Composición de los diferentes soportes.

a)	Control sin encapsulado. Placa de poliestireno
b)	Nafion 0.05%
c)	Nafion 0.2%
d)	Nafion 0.05%- 2.9 μ g NT-Nafion 0.05%
e)	Nafion 0.2%- 2.9 μ g NT-Nafion 0.2%
f)	Nafion 0.05%- 2.9 μ g NT-Au-Nafion 0.05%
g)	Nafion 0.2%- 2.9 μ g NT-Au-Nafion 0.2%

3.8.5 Análisis estructural.

Con el fin de comprobar si los nanotubos de VP6 sufrían alguna modificación estructural al ser encapsulados con nafion, debido a su posible interacción con el polímero, se simuló dicho encapsulado utilizando rejillas de formvar-carbón y se observaron por microscopia electrónica de transmisión a un voltaje de aceleración de 80 kV. Los nanotubos sin oro fueron teñidos con acetato de uranilo al 2%, mientras que para los nanotubos funcionalizados con oro no se utilizó tinción.

3.8.6 Microscopia electrónica de barrido (MEB).

Para comprobar si la estructura de los nanotubos se veía afectada por el potencial aplicado se realizó MEB con ayuda del Ing. Rogelio Elvira Morán del Instituto de Energías Renovables UNAM a 5 kV y 10 kV de voltaje de aceleración, directamente sobre los electrodos de trabajo antes y después de realizar las pruebas de CV. Para este análisis fueron seleccionados los inmovilizados con nafion al 0.05% y nanotubos con oro. Las imágenes obtenidas pertenecen a dos montajes independientes debido a la dificultad del montaje de los electrodos de trabajo. No obstante no se pudo observar por MEB los electros con nanotubos de

VP6 debido a que la muestra colapsó. Este efecto se atribuyó tanto a las propiedades de la proteína como al contenido de agua en la muestra.

3.8.7 CV con diferentes soluciones de trabajo.

Dado a que parte de los objetivos del presente trabajo, es utilizar a VP6 como soporte para crecimiento celular, se realizaron CV bajo las condiciones previamente descritas, pero utilizando buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.2 y medio de cultivo suplementado tal cual se usa para el crecimiento celular. Lo anterior se realizó, con el fin de descartar cualquier posible interacción redox, de VP6 con estas soluciones tras una perturbación eléctrica que pudiera afectar el ambiente celular.

3.9 Manejo de líneas celulares.

Se utilizaron dos líneas celulares, *Neuro-2A ATCC® CCL-131™* de neuroblastoma de ratón y *mHypoE-N1 (Cedarlane®)* de hipotálamo de embrión de ratón. Las líneas celulares fueron donadas por la *Dra. Leonor Pérez del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos IBT*. Todas las líneas celulares fueron crecidas en medio enriquecido (IMDM de Sigma-Aldrich®, conteniendo 10% de suero fetal bovino y 2 mM de glutamina) y mantenidas a 37⁰ C con 5% de CO₂. Los pases celulares se realizaron al alcanzar un 80-90% de confluencia, utilizando buffer PBS a pH fisiológico estéril para los lavados para remover restos celulares y el suero fetal bovino. Para despegar las células se utilizó una solución que contenía 0.25% p/v tripsina (páncreas de bovino con una actividad >10,000 U/mg de *Sigma Aldrich®*), 0.02% p/v EDTA-Na en buffer PBS pH 7.2. La dilución celular máxima realizada fue de 1:5 con respecto al contenido celular original ya que una dilución muy grande afecta a la comunicación celular y por ende a la proliferación.

Los bancos celulares, fueron preparados en medio enriquecido y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) como agente crio-preservador. Para la línea *Neuro-2A* se realizaron 3 pases con 100 µg/mL de antibiótico *Normocin™* de *InvivoGen* en el medio de cultivo para evitar la contaminación con mycoplasmas previo a la crio-preservación.

3.10 Ensayo de citotoxicidad.

Durante 52 h las líneas celulares mHypoE-N1 y Neuro2a, fueron expuestas a los nanotubos de VP6 sin funcionalizar y funcionalizados con oro. Se realizó la determinación de la actividad mitocondrial por medio del ensayo de MTT de *Sigma-Aldrich*[®]. Este ensayo se realizó en placas para cultivo celular de 96 pozos, se utilizaron 6,000 células totales (60,000 células/mL) en medio enriquecido sin antibiótico y mantenidas a 37 °C con 5% de CO₂. Las células fueron incubadas durante 24 h, posteriormente se agregaron las nanoestructuras dejándolas durante 52 h. Se utilizaron 1.25 µg y 2.5 µg totales tanto de nanotubos sin funcionalizar como funcionalizados. Pasado el tiempo de exposición, se hicieron 3 lavados con PBS estéril a pH fisiológico para eliminar las nanoestructuras y evitar posibles interferencias con la medición de la actividad mitocondrial. Se preparó reactivo de MTT en medio de cultivo libre de suero a 5 mg/mL y se adicionó 100 µL de esta solución a cada pozo. Se mantuvo en agitación constante y en la oscuridad durante 2 h. Las placas fueron después centrifugadas a 2,000 rpm durante 10 min, se retiró la solución con sumo cuidado tratando de no arrastrar cristales y finalmente se agregó 100 µL de DMSO para disolver los cristales. Se tomó la lectura de absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas *FLUOstar Omega* de *BMG LABTECH*. Se utilizó para la normalización de los ensayos controles de células sin exponer a las nanoestructuras. Se realizaron cuadruplicados para cada una de las condiciones.

3.11 Uso de nanotubos como soporte celular.

En una placa de 96 pozos se colocaron diferentes encapsulados descritos en la *tabla 5*. Los encapsulados fueron secados al aire y esterilizados mediante exposición a la luz UV durante 30 min. La cantidad de proteína fue proporcional a la utilizada en los electrodos de trabajo durante la caracterización electroquímica (0.05µg/mm² de proteína).

3.11.1 Crecimiento celular sobre soportes de VP6.

Se crecieron células Neuro 2A y mHyphoE1 sobre los encapsulados de la tabla 5, bajo las condiciones de cultivo descritas en el apartado anterior y usando como control de respuesta, células crecidas directamente en los pozos. Se utilizaron 6,000 células totales por pozo (30,000 células/mL), incubándolas durante 52 h con medio de cultivo enriquecido. La proliferación celular fue evaluada por microscopía óptica en un microscopio *Nikon TE300*.

3.11.2 Determinación de distribución aparente de nanotubos en los pozos.

Para los encapsulados a-e (descritos en la *tabla 5*), se realizó un inmunoensayo por duplicado, directamente en placas de 96 pozos para observar la distribución espacial de la proteína y asegurar su presencia en los pozos de cultivo,

Todo el procedimiento fue llevado a cabo a temperatura ambiente. Los pozos fueron bloqueados con gelatina al 2% en PBS pH 7.2 durante 2 h. Se realizaron 3 lavados con PBS, cada uno por 10 min. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo monoclonal AcM 255/60 (donado por el grupo de la Dra Susana Lopez IBT-UNAM, expandido en ratones y purificado de líquido de ascitis por la Dra. Mabel Rodríguez, Instituto de Biotecnología, UNAM) a una dilución 1:100 en PBS-0.1% gelatina, incubando a 4 °C durante toda la noche. Este anticuerpo reconoce al trímero de VP6 y no al monómero, lo que nos da una guía indirecta del mantenimiento del ensamblaje de VP6 al menos en su forma trimérica en los pozos. Se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 min cada uno. Se adicionó el anticuerpo secundario policlonal cabra anti-ratón conjugado con *Alexa Fluor® 594* diluido 1:1,000 en PBS 0.1% gelatina, incubando a temperatura ambiente por 1 h. Se realizaron 2 lavados de 5 min cada uno. Se realizó la lectura de fluorescencia en el lector *Typhoon™ FLA 9500* de *GE Healthcare*, con asesoría del Dr. Tomas López, Instituto de Biotecnología, UNAM. Las imágenes fueron colectadas en un

microscopio invertido de fluorescencia *Nikon TE300* con ayuda del M.C. David Hidalgo, Instituto de Biotecnología, UNAM.

3.11.3 Evaluación de la cantidad de VP6 en el soporte celular.

Para observar si existía alguna variación en el crecimiento celular, con respecto a la cantidad de proteína VP6 utilizada en los encapsulados, se realizaron diferentes encapsulados descritos en las *tablas 6 y 7*. Además de las células neuronales (Neuro2A, mHyphoE1), se utilizaron células de riñón de hámster bebe (BHK) y células de carcinoma pulmonar humano (A-549). Se determinó viabilidad por el método de azul de tripano, normalizando los resultados con las células crecidas en pozos sin encapsulados, para cada una de las líneas celulares utilizadas.

Tabla 6: Determinación de cantidad de proteína VP6 para células Neuro2A y mHyphoE1.

a) Control sin encapsulado. Placa de poliestireno
b) Nafion 0.05%
c) Nafion 0.05%- 7.2 µg NT-Nafion 0.05%
d) Nafion 0.05%- 2.9 µg NT-Nafion 0.05%
e) Nafion 0.05%- 2 µg NT-Au-Nafion 0.05%
f) Nafion 0.05%- 1.5 µg NT-Nafion 0.05%
g) Nafion 0.05%- 0.5 µg NT-Nafion 0.05%
h) Nafion 0.05%- 0.25 µg NT-Nafion 0.05%
i) 7.2 µg NT en suspensión

Tabla 7: Determinación de cantidad de proteína para células BHK y A-549

a) Control sin encapsulado. Pozo de poliestireno
b) Nafion 0.05%
c) Nafion 0.05%- 7.2 µg NT-Nafion 0.05%
d) Nafion 0.05%- 2.9 µg NT-Nafion 0.05%
e) Nafion 0.05%- 1.5 µg NT-Nafion 0.05%
f) 7.2 µg NT en suspensión

Las células A-549 fueron cultivadas en medio DMEM F-12 *Sigma-Aldrich*® suplementado con 5% SFB y 2 mM de glutamina. Las células BHK se cultivaron medio enriquecido IMDM de *Sigma-Aldrich*®, con 10% SFB y 2 mM de glutamina.

Las líneas celulares permanecieron a 37 °C por 48 h y 5% CO₂. Se utilizó 5,000 células/pozo para las células BHK y A-549, mientras que para las células neuronales se emplearon 6,000 células/pozo. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados con PBS a pH 7.2. Después de retirar el excedente de buffer, para afectar lo menos posible el ensayo, se agregaron 100 µL de tripsina y se incubó durante 5 min a 37 °C. Pasado el tiempo se realizó el conteo y la determinación de la viabilidad celular tal y como se describió previamente. Se respetaron rigurosamente los tiempos y volúmenes empleados, para asegurar la reproducibilidad del ensayo. Para los pozos con nanotubos funcionalizados con oro, se intentó realizar la medición de la viabilidad, pero no se logró un despegue celular uniforme ni reproducible entre pozos, esto pudo deberse a que las nanopartículas de oro presentaban afinidad por la tripsina lo que probablemente interfirió con su actividad enzimática evitando el despegue celular.

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1 Producción de nanotubos

Para realizar las infecciones de las células H5, para la expresión de la proteína VP6, se realizó la titulación del baculovirus recombinante amplificado. Según lo reportado en la literatura un título viral es aceptable si se encuentra entre 10^7 - 10^9 upf/mL. En la *figura 14* se muestra el gráfico obtenido a partir del ensayo de dosis letal media por MTT y su respectivo ajuste sigmoidal, que es convertido en TCID₅₀ (dosis media infectiva del cultivo celular) por ensayo de dilución limite, debido a la correlación lineal entre ambos métodos. Se utilizó la distribución de Poisson para la el cálculo del título viral en upf/mL. Se obtuvo 5.4×10^8 pfu/mL lo que es aceptable para la realización de futuras infecciones [58], [67].

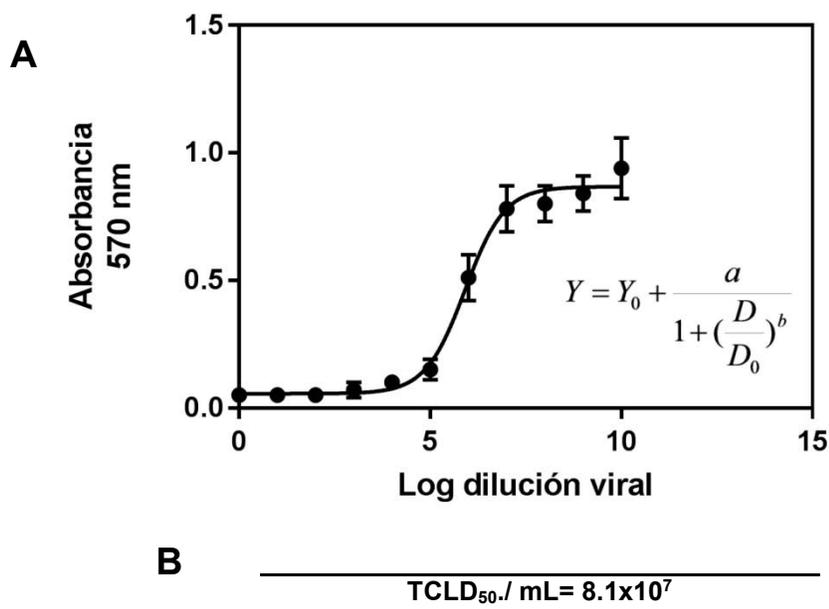


Figura 14: Titulación del bacVP6p2pl.

A) Gráfico de logaritmo de la dilución viral vs absorbancia para la obtención de TCID₅₀. Se realizó un ajuste sigmoidal. Se utilizó la ecuación del ajuste (indicada en el gráfico) para el cálculo de la TCLD₅₀ (**B**).

Se registró la cinética de infección con el baculovirus bacVP6 en células H5 desde las “0” horas hasta las 96 hpi (*figura 15*). Durante los primeros tiempos post-infección se observó que las células se duplican indicando una infección secundaria [60], donde la progenie celular porta el virus recombinante, este proceso se comprueba con el descenso significativo de la viabilidad celular a las 72 hpi, consecuencia de la lisis celular por la producción de la proteína recombinante, fenómeno que no se observa en las células sin infectar.

En la *figura 16* se presenta el seguimiento al proceso de infección y cosecha de VP6 por medio de electroforesis en gel y western blot. En el gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie, se observa la aparición de la banda en 45 kDa correspondiente VP6 [42] a partir de las 48 hpi (*figura 16A*), a todos los tiempos se observa la proteína gp64 del baculovirus y otras diferentes proteínas celulares y virales, indicándonos la necesidad de realizar una purificación. En el western blot (*figura 16B*) se observa ligeramente la banda de VP6 desde las 24 hpi, donde inicia la expresión de la proteína recombinante, hasta las 96 hpi donde el cultivo es cosechado.

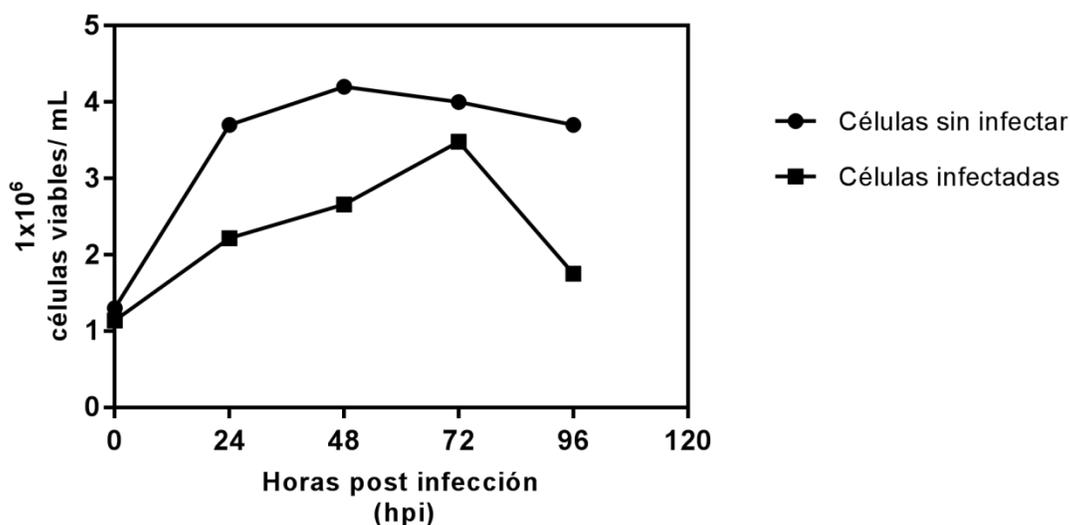


Figura 15: Cinética de infección para la producción de proteína recombinante VP6.

Se muestran en círculo densidad celular viable no infectadas y en cuadros la densidad celular viable infectada con el baculovirus BacVP6pl, desde las “0” hpi hasta las 96 hpi que fue cosechado el cultivo.

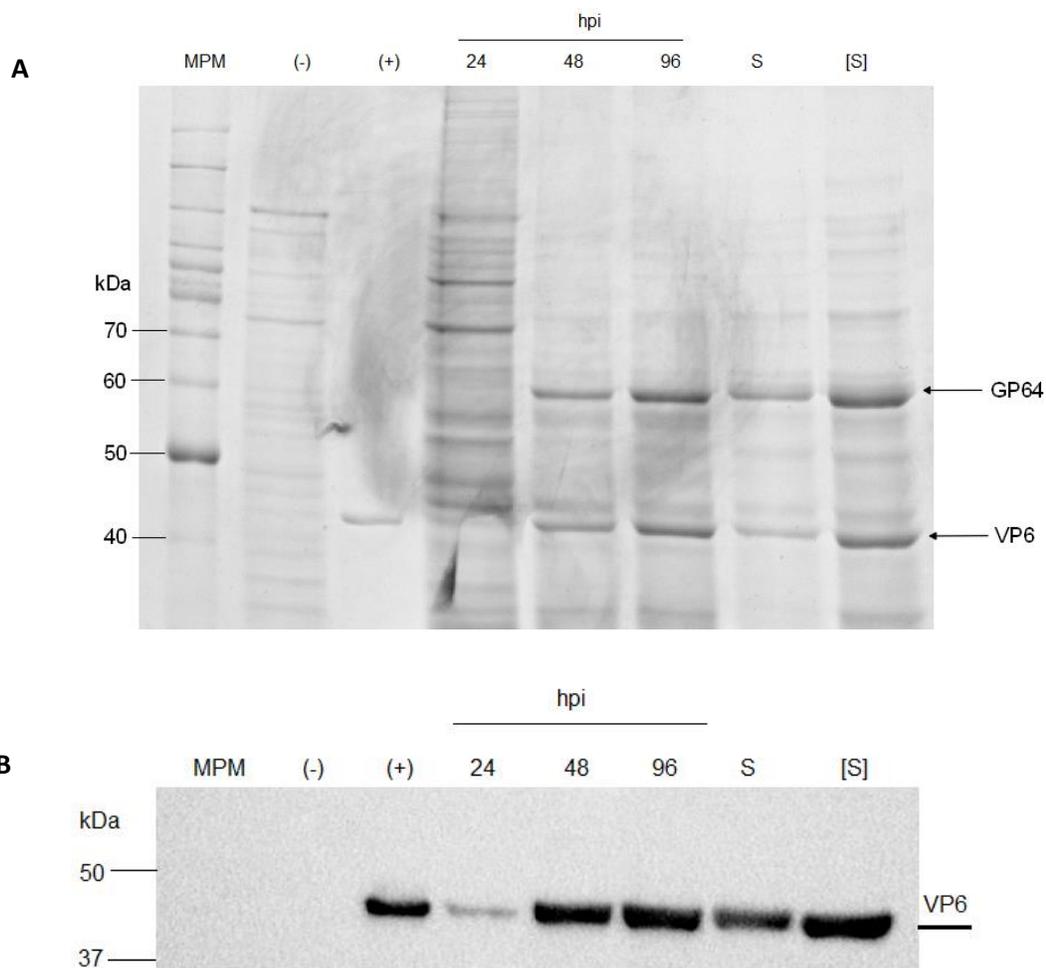


Figura 16: Cinética de producción de VP6.

Se infectaron células con el baculovirus bacVP6pl, se cosechó el sobrenadante de cultivo y se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes. **A)** Tinción con azul de Coomassie. **B)** Western blot para la detección de VP6. Carril 1: MPM. Carril 2: control negativo células sin infectar. Carril 3: control positivo VP6 a 25 µg/mL. Carril 4: 24 hpi. Carril 5: 48 hpi. Carril 6: 96 hpi. Carril 7: sobrenadante clarificado. Carril 8: sobrenadante clarificado concentrado 3 veces.

4.2 Purificación de VP6 a partir de sobrenadante de cultivo.

Cromatografía de intercambio aniónico.

Como primer paso de purificación, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico. El cromatograma correspondiente se muestra en la *figura 17A*, construido a partir de la detección de moléculas por medio de la lectura de absorbancia a 280 nm. El volumen “no pegado” (pico 1 del cromatograma) corresponde a la proteína VP6, debido a que su carga neta está cercana a la

neutralidad y por tanto no interactúa electrostáticamente con la columna. El volumen retenido (pico 2 del cromatograma) corresponde a las moléculas con carga negativa adsorbidas en la columna (probablemente gp64), estas moléculas son removidas aumentando la fuerza iónica en la fase móvil (buffer B 1M de NaCl). En la figura 17B se muestra el gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes donde se observa una proteína en menor proporción que VP6 pero de mayor peso molecular presente en el volumen “no pegado” de la purificación anterior. En la figura 17C se presenta el western blot correspondiente a la figura 17B en el cual no se detecta la proteína de mayor peso molecular antes observada. La presencia de esta proteína nos indica que es necesario otro paso de purificación para aumentar la calidad del producto obtenido.

Cromatografía de exclusión molecular.

Como siguiente paso de purificación se realizó una cromatografía de premiación en gel. Se realizaron inyecciones de 30 mL, utilizando el buffer Tris-HCl pH 8.0 como fase móvil. Los nanotubos de VP6 en el pico 1 del cromatograma, cercano a los 1000 mL de volumen de corrida, mientras que en el pico 2 eluyen proteínas de menor tamaño así como VP6 desensamblada (*figura 18A*). Se observa la baja absorbancia del pico 1 que representa una pobre producción de nanotubos de VP6. En el pico 2 se obtienen mayor proporción de estructuras, esto nos indica una probable ineficiencia de ensamblaje de VP6 durante su producción o el desensamblaje a lo largo del proceso de purificación hasta este paso. En *figura 18B* se muestra la detección de VP6 en el pico 2 por western blot, confirmando la presencia de monómeros o/y trímeros en la muestra analizada.

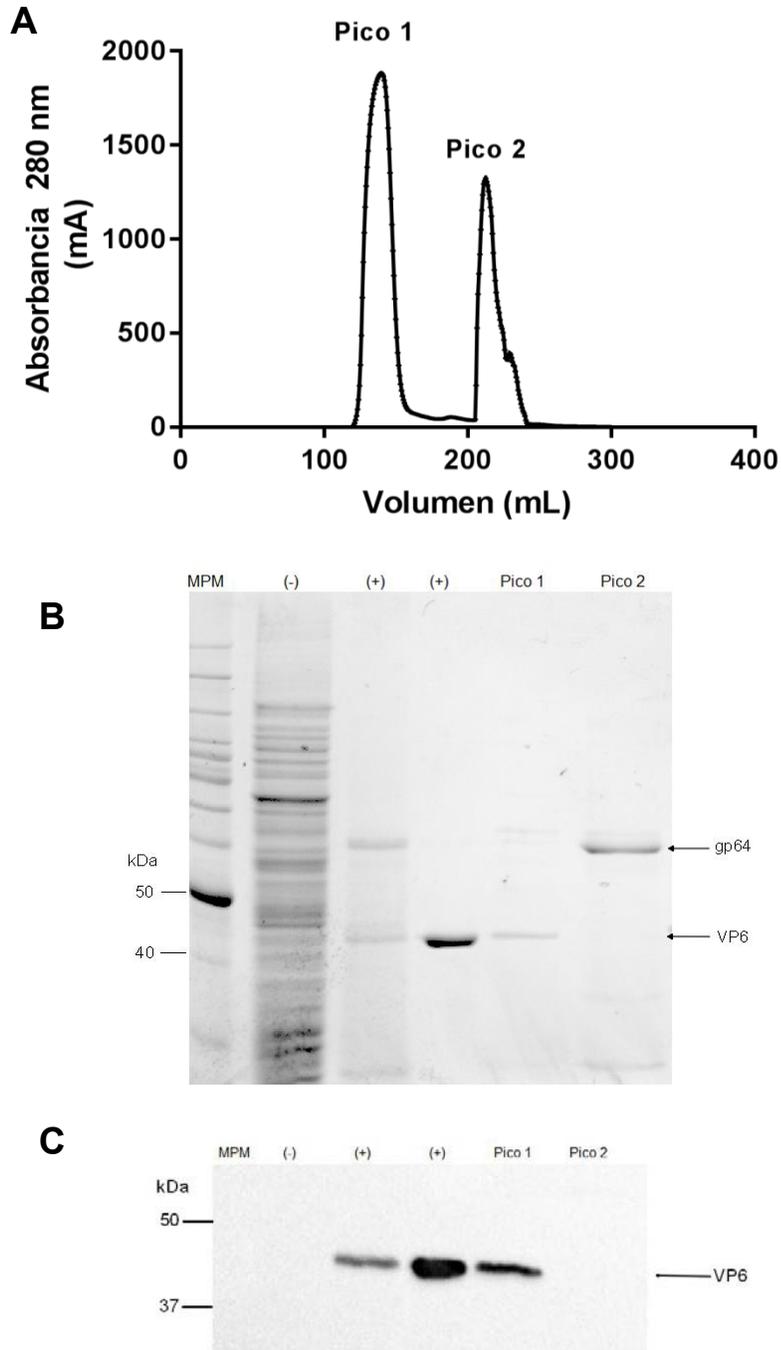


Figura 17: Cromatografía de intercambio aniónico.

A) Cromatograma de intercambio aniónico a pH 6.16, el primer pico recolectado a los 150 mL corresponde a VP6. Los picos subsiguientes a 200 mL fueron eluidos con buffer B, moléculas con carga neta negativa a pH 6.16, probablemente proteínas de cápside viral, ácidos nucleicos. **Control de calidad:** electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. **B)** Tinción con azul de Coomassie. **C)** Western blot para la detección de VP6. Carril 1: MPM. Carril 2: células H5 sin infectar como control negativo. Carril 3: control positivo procedente de una purificación ineficiente anterior (se observa gp64). Carril 4: control positivo VP6 25µg/mL. Carril 5: Fracción “no pegada” (pico 1 del cromatograma). Carril 6: Fracción adsorbida en columna y eluida con buffer con alto contenido de sal (pico 2 del cromatograma).

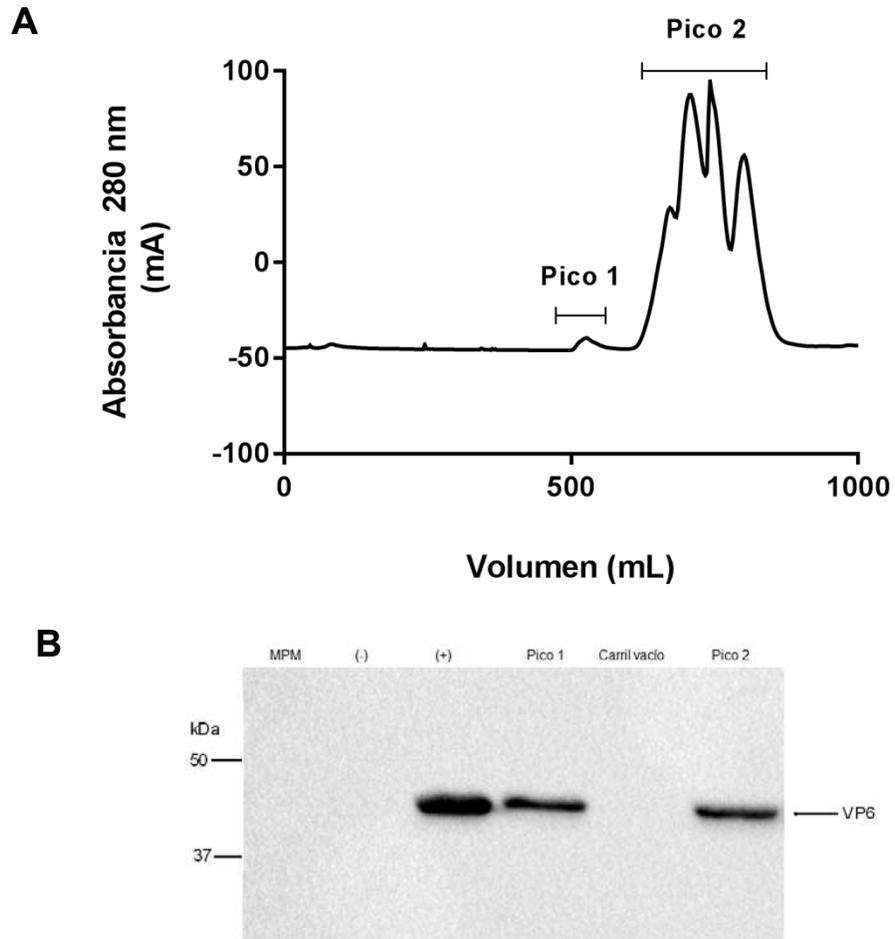


Figura 18: Cromatografía de exclusión molecular.

A) Cromatograma de exclusión molecular, pico 1 corresponde a VP6 en forma de macroestructuras, pico 2 a VP6 en monómero o trímero y a estructuras de menor tamaño.

B) Western blot para la detección de VP6 en gel de poliacrilamida 10% en condiciones desnaturalizantes, correspondiente a las fracciones recolectadas de la cromatografía de (A). Carril 1 MPM. Carril 2: células H5 sin infectar como control negativo. Carril 3: control positivo de VP6 (25 µg/mL). Carril 4: pico 1 del cromatograma. Carril 5: vacío. Carril 6: pico 2 del cromatograma.

4.3 Purificación de VP6 a partir de pellet.

Debido a que de la purificación de VP6 a partir de sobrenadante de cultivo, se obtuvo poca cantidad de nanotubos ensamblados, se decidió proceder a la purificación de VP6 del pellet celular. Como paso previo a la purificación, se realizó una precipitación con buffer de acetatos en condiciones ácidas, donde se obtienen VP6 en su forma de trímero. En la *figura 19A* se muestra gel de poliacrilamida donde observamos que se eliminan casi por completo las moléculas contaminantes después de la precipitación a partir del carril 5. En la *figura 19B* se muestra la detección inmuno-específica de VP6 por western blot, se decidió no filtrar la muestra debido a que se tenían pérdidas importantes de proteína (*figura 19B-carril 7*).

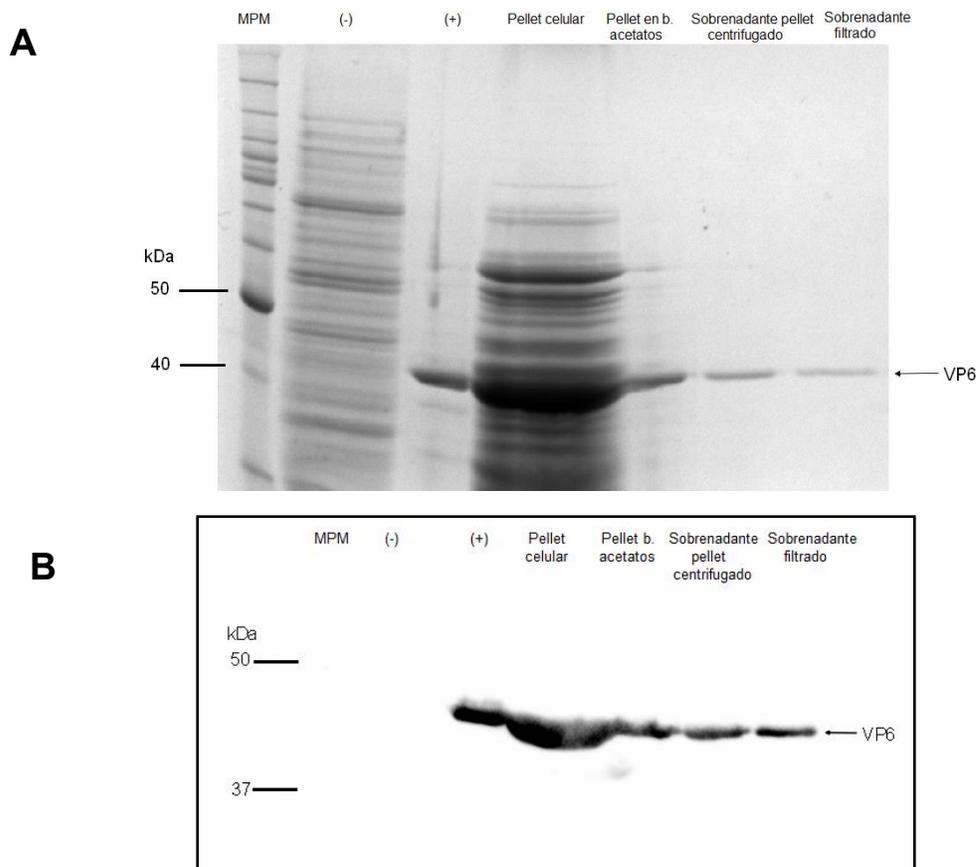


Figura 19: Precipitación de VP6 con acetato de sodio al 40%.

Gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. **A)** Tinción azul con Commassie.

B) Western blot para la detección de VP6. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: células sin infectar como control negativo. Carril 3: control positivo de VP6 (25 µg/mL). Carril 4: pellet celular. Carril 5: pellet re-suspendido en buffer de acetatos. Carril 6: sobrenadante de pellet re-suspendido centrifugado. Carril 7: sobrenadante filtrado por filtro de 0.8 µm.

Cromatografía de intercambio catiónico.

En la cromatografía de intercambio catiónico la resina tiene cargas negativas y por tanto las moléculas con carga positiva se quedan adsorbidas. Tal es el caso de VP6 a pH 3.0. La elución de la proteína es llevada a cabo por un aumento en la fuerza iónica en el buffer de trabajo (30 mM Tris-HCl, 1 M NaCl a pH 8) y es recolectada en la fracción retenida (pico 2 del cromatograma), mientras que en el volumen “no pegado” (pico 1) se eliminan moléculas contaminantes. En la *figura 20* se muestra el cromatograma correspondiente a esta parte de purificación. Debido a su polimorfismo [4], VP6 solo sufrió desensamble, probablemente a monómeros.

Con el fin de comprobar la ausencia de nanotubos en la fracción retenida y en busca de observar trímeros, se realizó una micrografía electrónica, sin embargo sólo se observaron agregados amorfos (*figura 21*). La fracción retenida se concentró por ultrafiltración. En la *figura 22* se muestra el gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes teñido con azul de Commassie y Western blot para la inmuno-detección de VP6 que corresponden a las muestras obtenidas de la cromatografía de intercambio catiónico (pico 2), concentrado de la fracción retenida y el ensamblaje de VP6 en nanotubos por medio de diálisis.

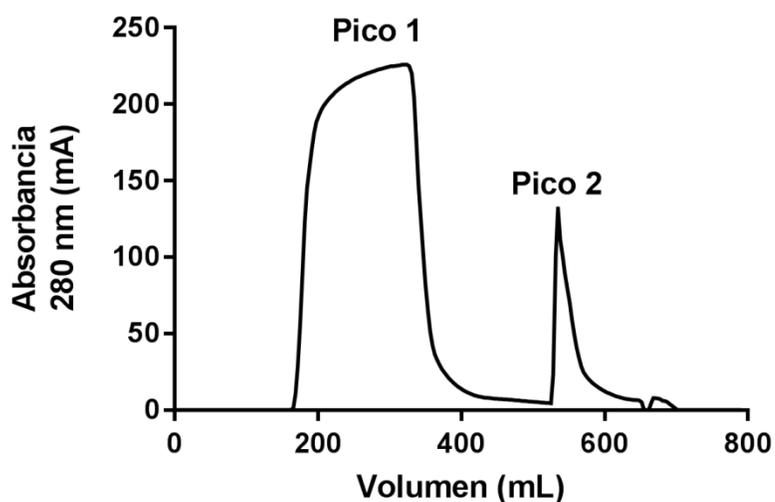


Figura 20: Cromatograma de purificación a partir de pellet.

El pico 1 corresponde a moléculas contaminantes con carga neutra o negativa. El pico 2 corresponde a VP6 en su forma monomérica y/o trimérica.

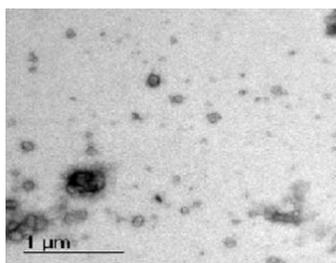


Figura 21: Micrografía electrónica de la fracción retenida en la cromatografía de intercambio catiónico.

El pico 2 del proceso de purificación, tinción con acetato de uranilo. Aumento 6300X

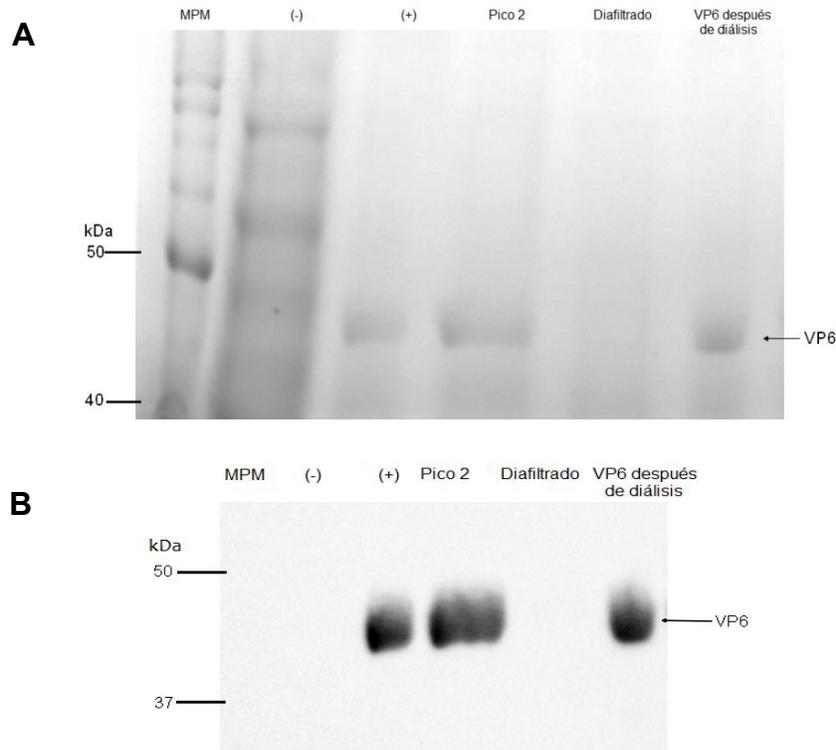


Figura 22: Proceso de concentrado y ensamblaje de VP6 purificada de pellet.

Gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. **A)** Tinción de azul de Commassie. **B)** Western blot para la detección de VP6. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: células H5 sin infectar como control negativo. Carril 3: control positivo de VP6 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Carril 4: fracción retenida en la columna (pico 2 del cromatograma). Carril 5: diafiltrado del proceso de concentrado. Carril 6: VP6 después de diálisis.

4.4 Integridad de los nanotubos.

Para la obtención de nanotubos a partir de sobrenadante de cultivo se realizó un paso de desensamble y reensamblaje. En la *figura 23* se muestran las micrografías electrónicas a diferentes aumentos del reensamblaje de VP6 de la purificación de sobrenadante. Se determinaron estructuras no identificadas, las cuales podrían deberse a un proceso ineficiente de purificación.

En la *figura 24* se muestran los nanotubos obtenidos del proceso de purificación de pellet, se observan muestras más limpias, aparentemente libre de moléculas no identificadas, esta evidencia sugiere una mayor eficiencia del proceso de purificación de pellet comparado con el proceso de purificación de sobrenadante.

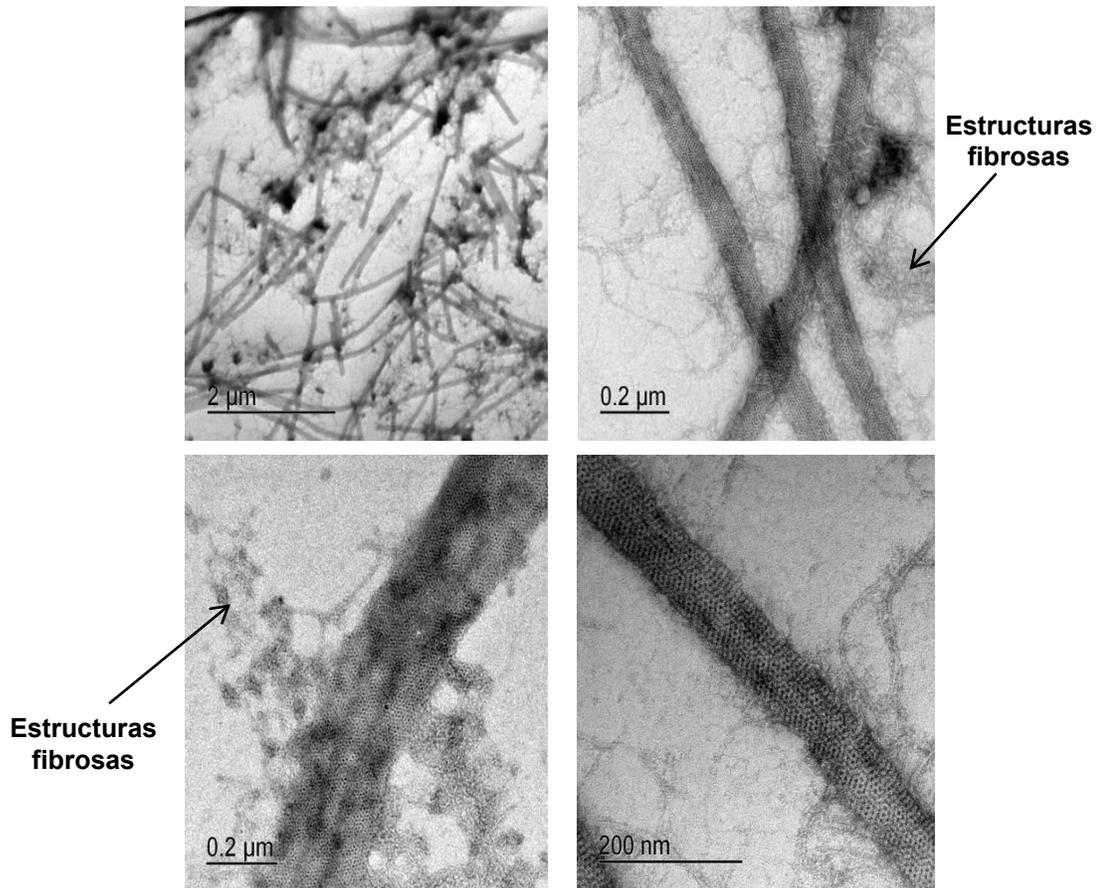


Figura 23: Micrografías electrónicas de nanotubos de VP6 obtenidos de purificación sobrenadante.

Se presentan diferentes aumentos, tinción negativa con acetato de uranilo. Se observan abundantes estructuras fibrosas señaladas con flechas.

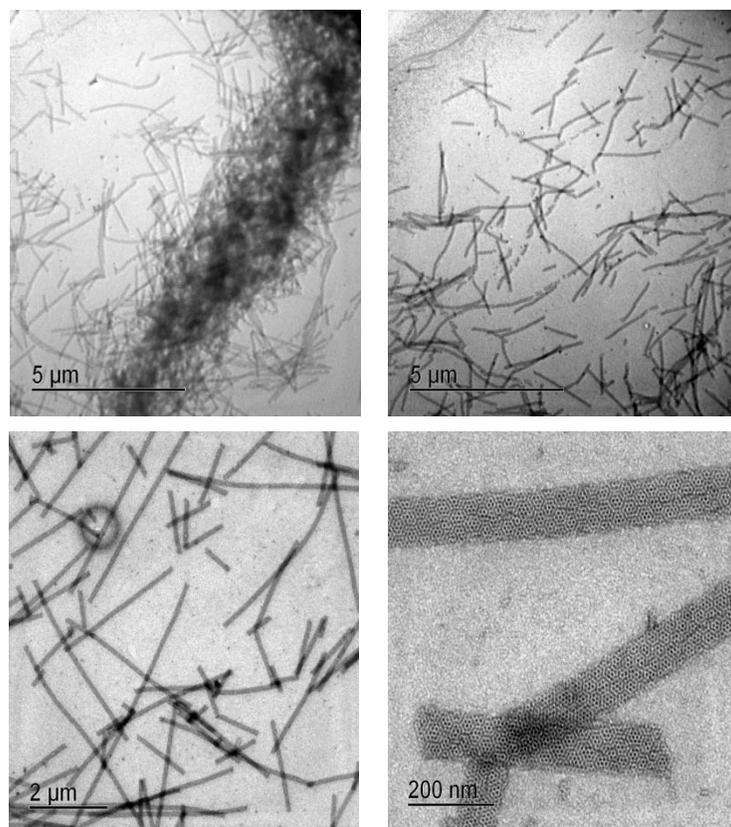


Figura 24: Micrografías electrónicas de nanotubos purificados a partir de pellet celular. Tinción acetato de uranilo a diferentes aumentos.

4.5 Comparación de rendimientos.

Para el cálculo de rendimiento de purificación es necesaria la utilización de un método de detección específico para VP6 con el cual no se contaba en el momento, por tanto los rendimientos fueron obtenidos a partir de la cuantificación de proteína total por el método de Bradford.

En las *tablas 9 y 10* se presentan los datos obtenidos a lo largo de los procesos de purificación, calculados a partir de la curva estándar de BSA. Se determinó que se obtiene rendimientos de al menos 10 veces más purificando de pellet celular (5.8%) y utilizando un solo paso de cromatografía que purificando de sobrenadante de cultivo (0.41%). Se puede observar que el porcentaje de recuperación final resulta baja tanto del proceso de purificación de pellet como de sobrenadante, comparado con lo reportado previamente por Plascencia-Villa y

colaboradores [6], donde se obtiene rendimientos superiores al 20% del proceso de purificación de sobrenadante. Estas diferencias de producción de proteína recombinante, podría deberse a problemas metabólicos y/o estrés presentes en las células utilizadas para la expresión de la VP6 recombinante (H5), como es la alta producción de lactato y amonio, por un alto consumo de nutrientes o bien por la falta de oxígeno disuelto en el medio de cultivo celular. Se podrían emplear estrategias para aumentar la producción como es aumentar la multiplicidad de infección, o bien disminuir el volumen de medio de cultivo durante la infección viral para aumentar la probabilidad de entrada del virus a las células blanco. Es necesario rediseñar los protocolos de purificación de sobrenadante y estandarizar el protocolo para la purificación a partir de pellet celular, para la obtención de mejores rendimientos de recuperación de la proteína VP6, con el fin de generar métodos más robustos y reproducibles.

Tabla 8: Rendimientos del proceso de purificación de sobrenadante

Muestra	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	mg totales	Rendimientos (%)
Sobrenadante clarificado	696	280	194.8	100
Muestra “no pegado” de cromatografía de intercambio aniónico concentrada	439	25	10.9	5.5
Muestra “volumen vacío” de cromatografía de exclusión molecular concentrada	57	15	0.8	0.41

Tabla 9: Rendimientos del proceso de purificación de pellet

Muestra	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	mg totales	Rendimientos (%)
Pellet en buffer de acetatos	177.5	250	44.3	100
Sobrenadante de pellet centrifugado	21.6	250	5.4	12.1
Muestra eluída de cromatografía de intercambio catiónico concentrada y dializada	130	20	2.6	5.8

4.6 Funcionalización de nanotubos de VP6.

La funcionalización se realizó usando 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanotubos de VP6, 1 mM de HAuCl_2 y promoviendo la reducción de Au^{+3} a Au^0 con 1 mM de NaBH_4 para la formación de las nanopartículas metálicas. En la *figura 25* se muestran micrografías a diferentes aumentos, resultado de la conjugación con proteína purificada de sobrenadante. Se observan partículas de oro agregadas en distintas zonas, pudiendo ser producto de la afinidad del oro a proteína desensamblada o algún contaminante de la muestra. En la *figura 26* se presentan las micrografías de la funcionalización de proteína purificada de pellet. Se observan agrupaciones de nanotubos funcionalizados a lo largo de la rejilla con ocasionales nanotubos dispersos, sin cúmulo de nanopartículas, al menos estas características para los campos observados.

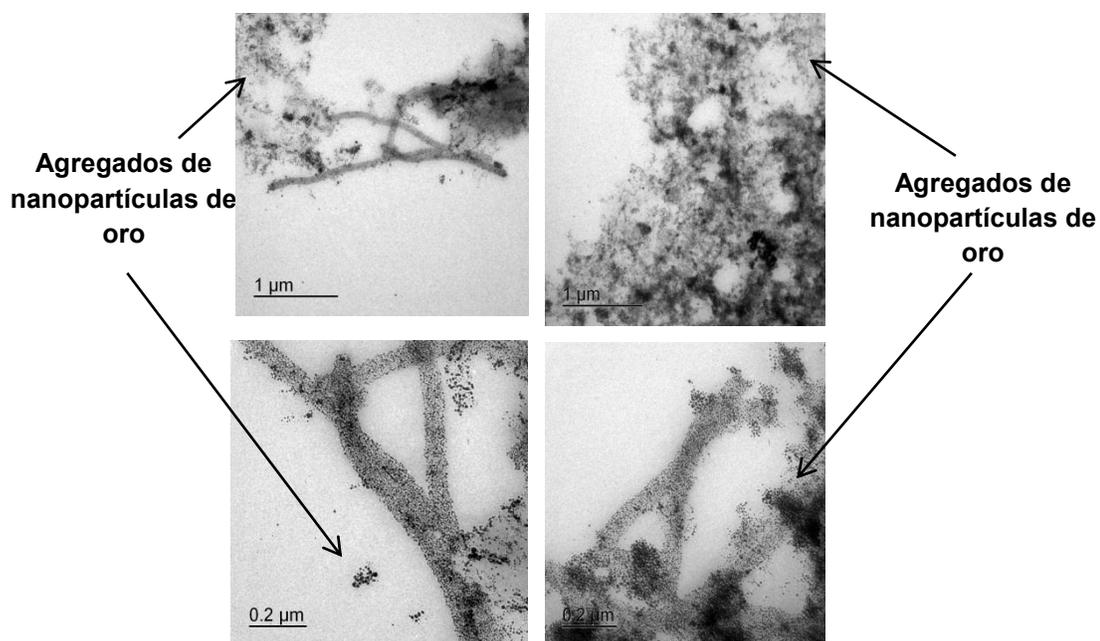


Figura 25: Micrografías electrónicas de nanotubos purificados y funcionalizados de sobrenadante.

Funcionalizados con oro sin teñir, a diferentes aumentos.

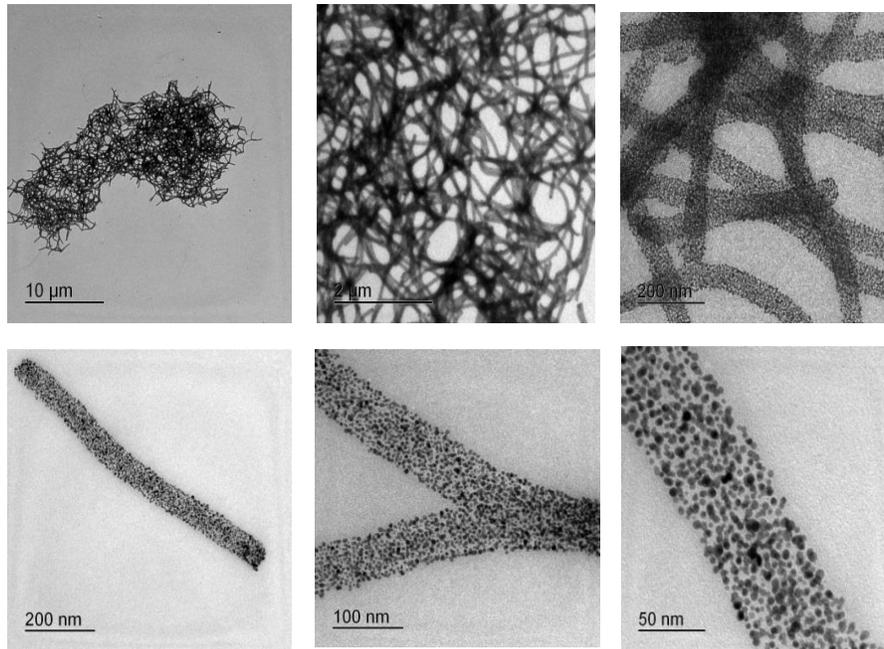


Figura 26: Micrografías electrónicas a diferentes aumentos de nanotubos purificados y funcionalizados de pellet.

Funcionalización con oro. Imágenes capturadas sin tinción de contraste en las muestras.

La presencia de agregados (estructuras fibrosas de *figura 23*) en los nanotubos de VP6 purificados a partir de sobrenadante de cultivo, pudieran estar interaccionando con el precursor metálico al momento de la funcionalización, ocasionado conjugaciones arbitrarias en todos los componentes de la muestra. A diferencia de los nanotubos de VP6 purificados a partir de pellet celular, se observa la formación de nanopartículas de oro sólo sobre la superficie de los nanotubos. Es necesario mejorar el proceso de purificación para la síntesis adecuada de nanotubos funcionalizados, con el fin de no tener variaciones entre experimentos próximos.

4.6.1 Comparativo entre los dos procesos de purificación y la funcionalización con oro.

La purificación a partir de pellet resultó tener mayor porcentaje de recuperación que de sobrenadante. Sin embargo, cuando se eliminaron las sales para la funcionalización de los nanotubos de VP6 bajo las mismas condiciones, en los nanotubos provenientes de pellet, se observó una pérdida por arriba del 50% de proteína total con respecto a la muestra antes de eliminar sales por medio filtración por centricon con membrana de 100 kDa. Esto sugiere que la estructura podría ser más frágil, debido a que probablemente la proteína se desensamble y quede atrapada en los poros de la membrana. Para comprobar esto es necesario un análisis estructural profundo como el análisis por microscopía de fuerza atómica para poder tener una conclusión sólida (*Tabla 11*).

Tabla 10: Comparativo de pérdida de proteína por desalado entre purificación de pellet y sobrenadante

	Paso	[μg/mL]	Volumen (mL)	mg totales	% Recuperación en Bradford
Muestras purificación sobrenadante	Nanotubos de VP6	57	15	0.86	100
	VP6 desalada	57	15	0.86	100
Muestras purificación pellet	Nanotubos de VP6 (M1)	130	2	0.26	100
	Desalado M1	25	2	0.05	19.2
	Nanotubos de VP6 (M2)	77.5	10	0.77	100
	Desalado M2	30	10	0.3	38.7

4.7 Determinación de eficiencia de reducción de $Au^{+3} \rightarrow Au^0$ en los nanotubos de VP6.

Para conocer la cantidad de oro sobre el nanotubo de VP6, se montó un método para determinar la eficiencia de reducción del precursor metálico, este

parámetro daría información sobre el área superficial activa del nanotubo funcionalizado que podría ser aprovechada en el diseño de soportes para el crecimiento celular. El método se basa en la medición de absorbancia producida por la formación del complejo oro (III)-tiamina-floxina B, que es proporcional a la cantidad de oro (III) presente en la muestra. Este método espectrofotométrico, presenta la ventaja de no necesitar la extracción del complejo resultante, con algún compuesto orgánico, ya que es soluble en agua.

4.7.1 Preparación de curva estándar.

El rango de trabajo fue determinado a partir de la reproducibilidad del ensayo, en experimentos realizados independientemente. En la *figura 27* se muestra el resultado de dos experimentos independientes realizados para encontrar el rango de trabajo a utilizar, obteniéndose una zona lineal de concentraciones y reproducible entre diferentes repeticiones en el rango de 4×10^{-3} mM a 8×10^{-3} mM de $\text{AuHCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Sin embargo para validar el resultado es necesaria la comparación de los resultados obtenidos con una técnica estándar como espectroscopia de absorción atómica.

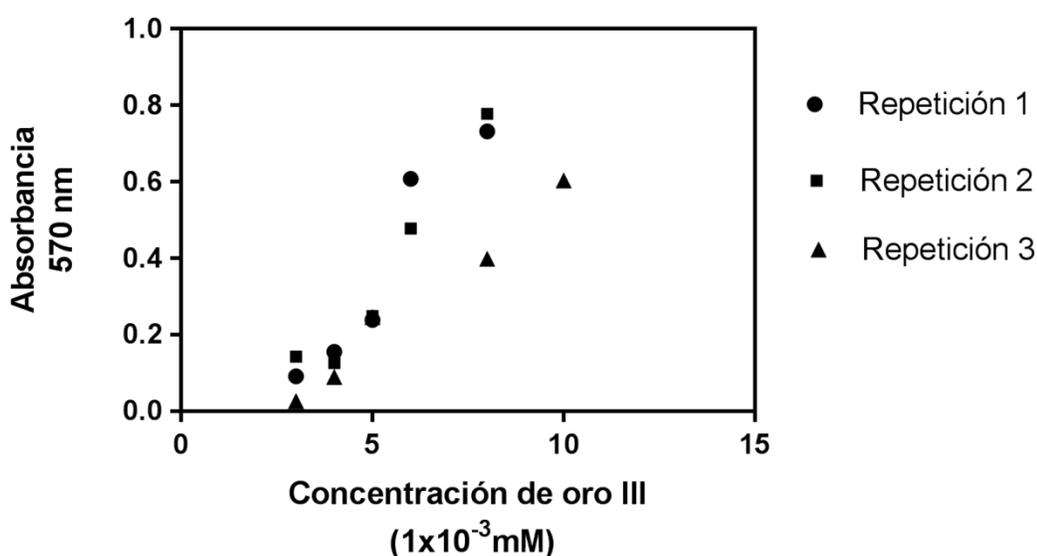


Figura 27: Determinación del intervalo de trabajo para la cuantificación de oro (III). Se montaron experimentos de manera independiente. Se eligió el intervalo de trabajo de $4-8 \times 10^{-3}$ mM debido a que existe una correlación lineal en esta zona, constante entre las diferentes repeticiones de los experimentos realizados.

En la *figura 28* se muestra la curva estándar obtenida, así como su ajuste de correlación lineal. Se determinó una eficiencia de reducción $\text{Au}^3 \rightarrow \text{Au}^0$ fue del $99.1\% \pm 2.8\%$. Sin embargo, aún es necesario el análisis de los nanotubos funcionalizados así como la repetición del ensayo con diferentes lotes de nanotubos.

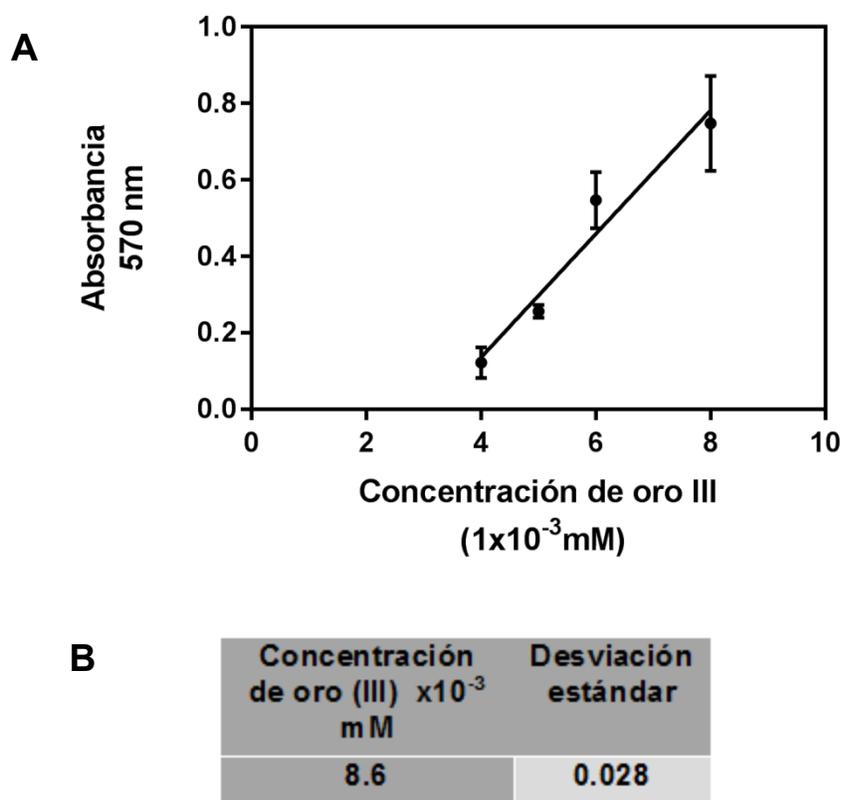


Figura 28: Cuantificación de oro (III).

A) Curva estándar, con el ajuste de regresión lineal para la obtención de la concentración de oro (III). **B)** Concentración obtenida a partir de la curva estándar.

4.8 Caracterización electroquímica.

4.8.1 Evaluación de la Inmovilización de la proteína VP6

Dado las propiedades de solubilidad VP6, se utilizó el polímero como molécula encapsulante para mantener a la proteína en el electrodo de carbón vítreo. Para demostrar que la presencia del nafion en la interfase, no intervendría en la respuesta de la proteína VP6 al ser analizada, se depositaron películas de nafion sobre electrodo de trabajo de GC (carbón vítreo). Se utilizó 0.2% y 0.05% p/v de nafion. Los resultados obtenidos de la voltamperometría de los electrodos con nafion, fueron empleados como controles de respuesta eléctrica negativa, mientras que la respuesta del electrodo de GC, fue tomado como control de respuesta positiva de un proceso redox.

En la *figura 29* se muestra la comparación de la respuesta obtenida en el sistema de estudio entre los electrodos de la *tabla 3*. Se observa que para el caso del carbón vítreo se favorece la reacción reversible redox de ferricianuro [68], mientras que la respuesta del electrodo de trabajo cubierto con nafion existe una disminución en los picos de oxidación-reducción. Esto es debido a las propiedades de impermeabilidad de electrones del nafion y por tanto no se da la transferencia de carga [69]. Las diferentes respuestas en los voltamperogramas obtenidas según la concentración de nafion utilizada, indican el grado de recubrimiento del GC, que concuerda con lo demostrado en [70] donde se propone que nafion podría formar cubiertas tipo poros sobre carbón vítreo y por esto se observa la variación de la densidad de corriente en los picos de oxidación y reducción del ferricianuro. Tales respuestas son atenuadas al aumentar la concentración de nafion sobre la superficie de GC, confirmando la efectividad del nafion como cubierta para el GC.

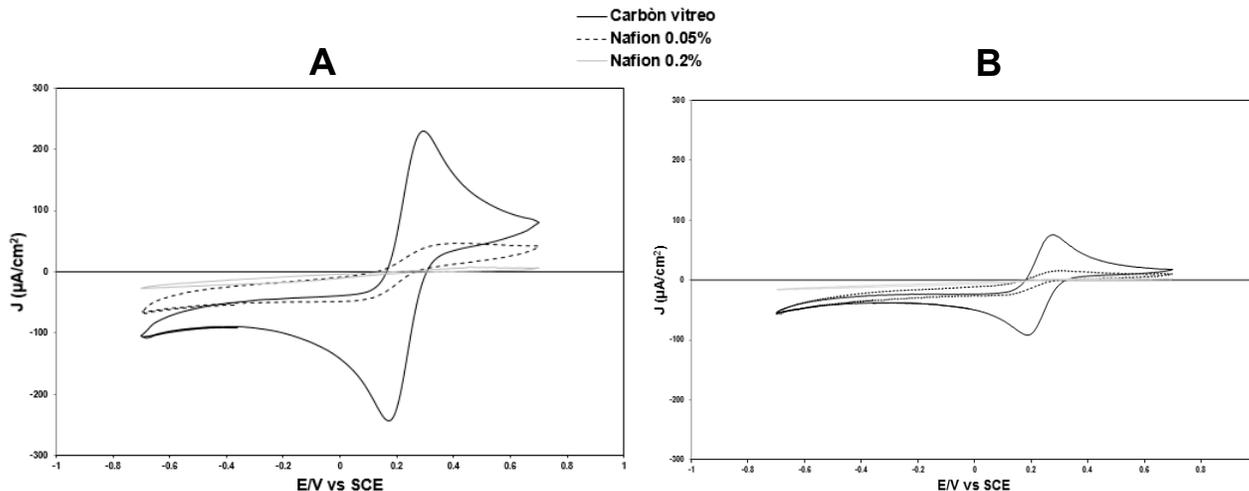


Figura 29: Comparación de respuestas voltamperométricas entre GC y diferentes concentraciones de nafion.

Se observa una respuesta disminuida de los picos máximos de densidad de corriente en los electrodos con nafion proporcional a su concentración. **A)** Voltamperograma a 200 mV/s. **B)** Voltamperograma a 20 mV/s.

4.8.2 Determinación del potencial de circuito abierto (OCP)

Se utilizó el potencial de circuito abierto (OCP) como una manera indirecta de demostrar la presencia de los diferentes encapsulados sobre el electrodo de carbón vítreo. En la *figura 30* se muestra el gráfico de las respuestas obtenidas durante la determinación del OCP por un minuto, para cada uno de los electrodos de las *tablas 3 y 4*. Se puede observar que el OCP cambia según el encapsulado en el electrodo de trabajo. Esta variación indica que existen diferentes interacciones entre los componentes del electrodo y la solución electroactiva, resultando en diferentes respuestas en la interfase, que puede relacionarse con las diferentes composiciones de los electrodos de trabajo. Todo lo anterior da un indicio de que el encapsulado funciona.

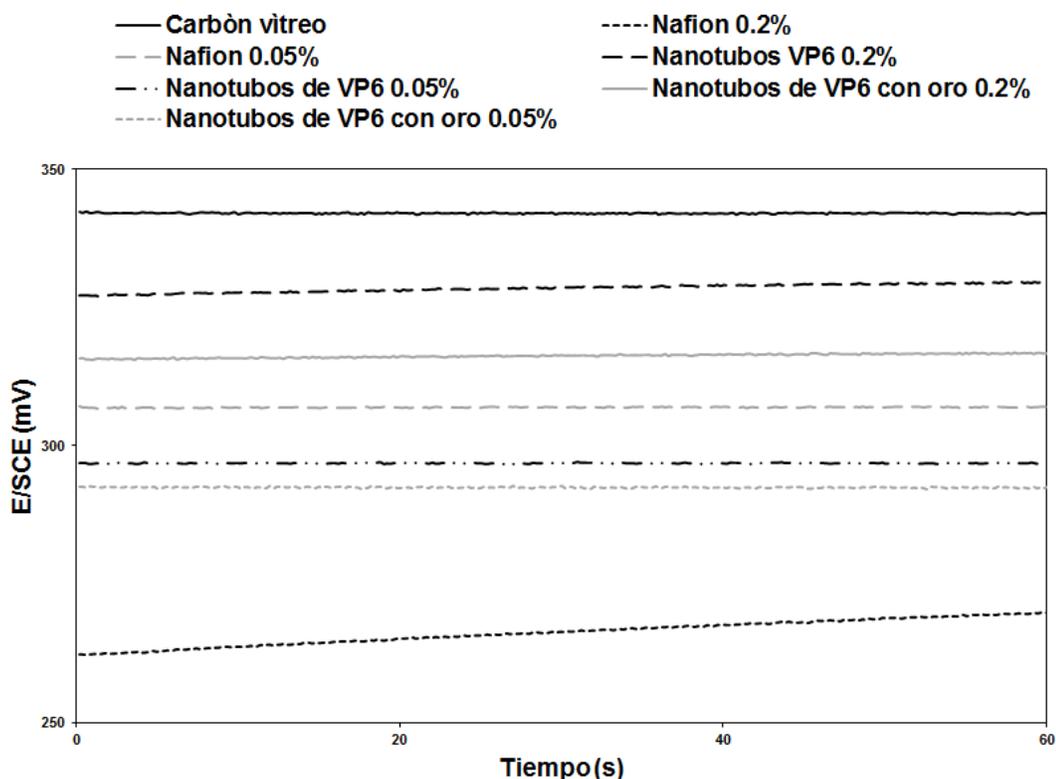


Figura 30: Determinación del potencial de circuito abierto (OCP).

La variación de potencial evidencia el cambio de interfase según la composición del electrodo de trabajo analizado.

4.8.3 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).

Esta prueba fue utilizada para evaluar el comportamiento de la resistencia a la polarización de carga eléctrica (R_{ct}) de VP6 con respecto al potencial aplicado, esperándose una disminución de esta resistencia conforme el potencial aplicado se acerque al potencial de reducción del ferricianuro de potasio y de manera indirecta asociar esta respuesta a fenómenos físicos como la conductividad de la proteína VP6. Se realizaron pruebas de EIS para los electrodos de las *tablas 3 y 4*. Dado que las respuestas voltamperométricas entre los encapsulados con proteína y carbón vítreo eran similares, los potenciales de trabajo fueron seleccionados con base en la respuesta voltamperométrica del ferricianuro usando carbón vítreo como electrodo de trabajo. El potencial inicial seleccionado fue el OCP de cada electrodo,

se seleccionaron potenciales tanto alejados como cercanos del pico de reducción de la reacción del ferricianuro (*figura 31*).

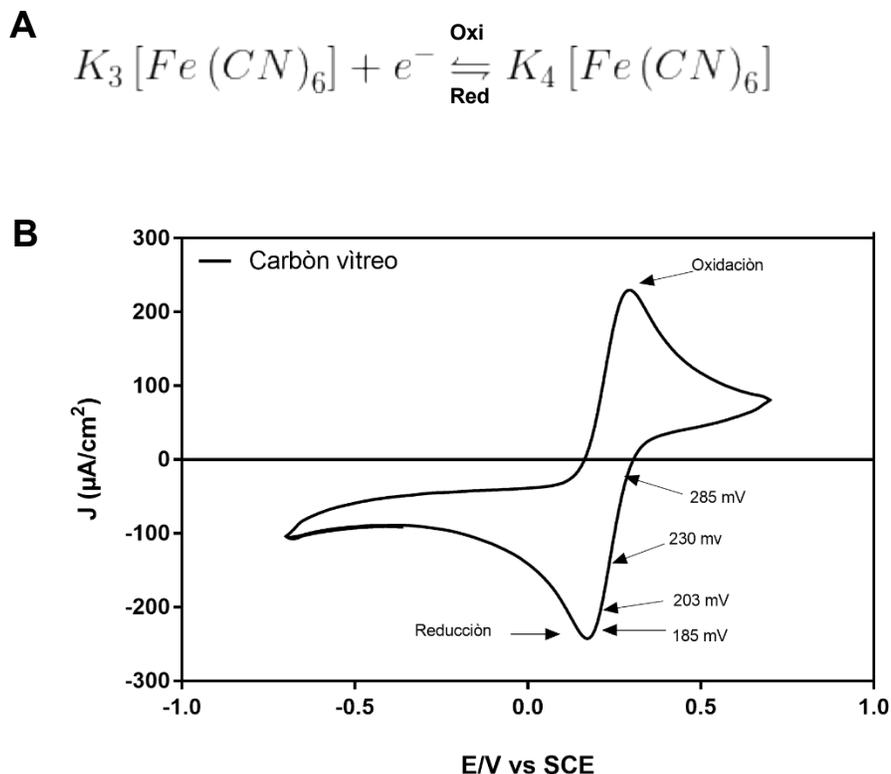


Figura 31: Selección de potenciales de trabajo para EIS.

A) Se muestra la reacción reversible del ferricianuro de potasio al incidir un potencial eléctrico. **B)** Respuesta voltamperométrica de carbón vítreo en ferricianuro de potasio. Se indican los potenciales de trabajo seleccionados para los ensayos de EIS

En las *figuras 32 y 33* se presentan los diagramas de Nyquist que muestran la respuesta obtenida para cada uno de los potenciales analizados para los encapsulados de VP6 con y sin funcionalizar. Se observó que la Z real es decir la resistencia del encapsulado disminuye para todos los casos analizados conforme el potencial aplicado se acerca al potencial de reducción del ferricianuro (160-170 mV en este sistema), donde la transferencia de carga entre la solución electroactiva y el electrodo de trabajo se ve favorecida cuando se incide esa energía.

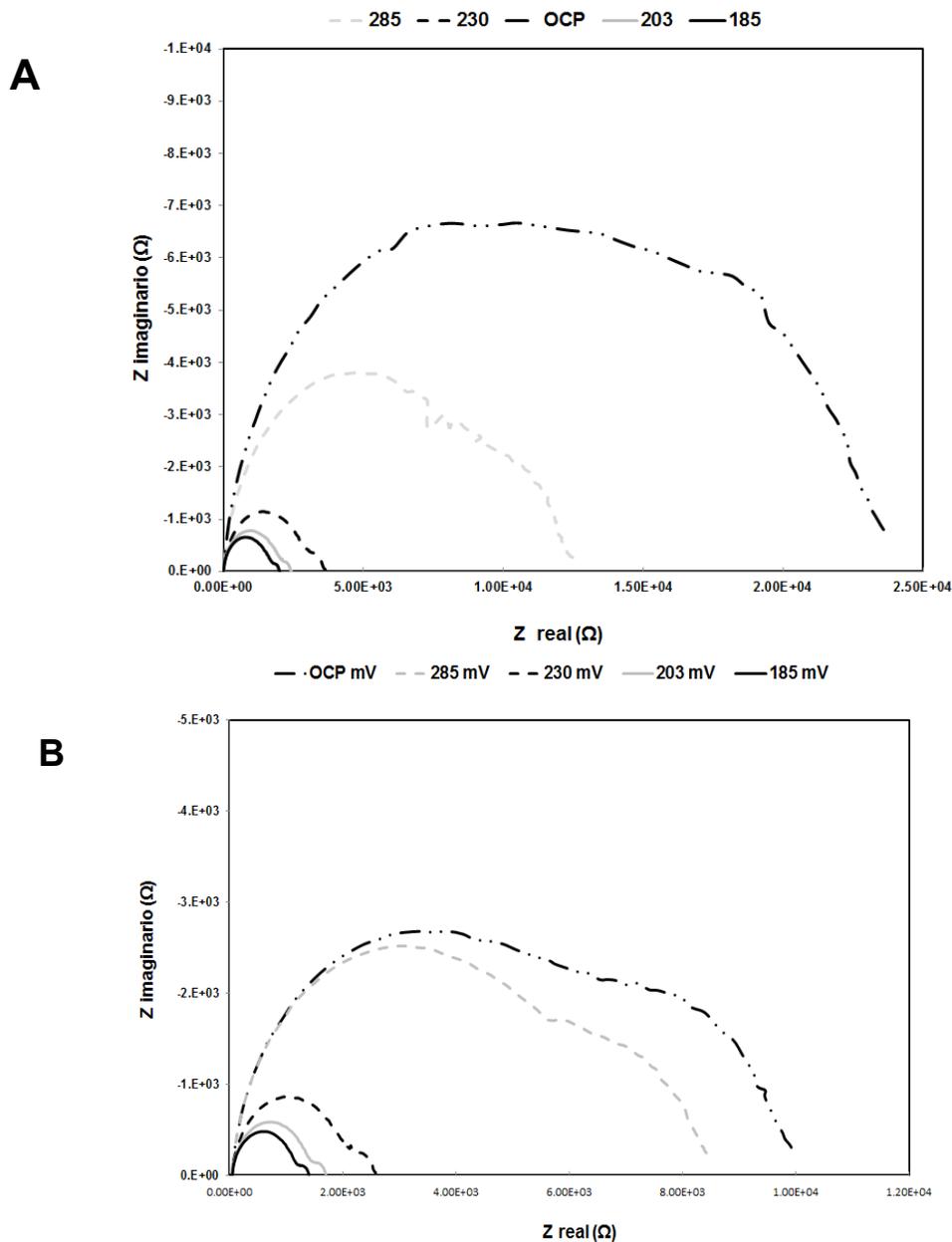


Figura 32: Evolución de la resistencia a la transferencia de carga con respecto al potencial aplicado de los encapsulados de nanotubos de VP6.

Se presenta diagrama de Nyquist de los resultados obtenidos. Se inició en una frecuencia de 50 kHz terminando en una frecuencia de 1 Hz. **A)** Encapsulados de nanotubos de VP6 con 0.2% de nafion. **B)** Encapsulados de nanotubos de VP6 con 0.05% de nafion.

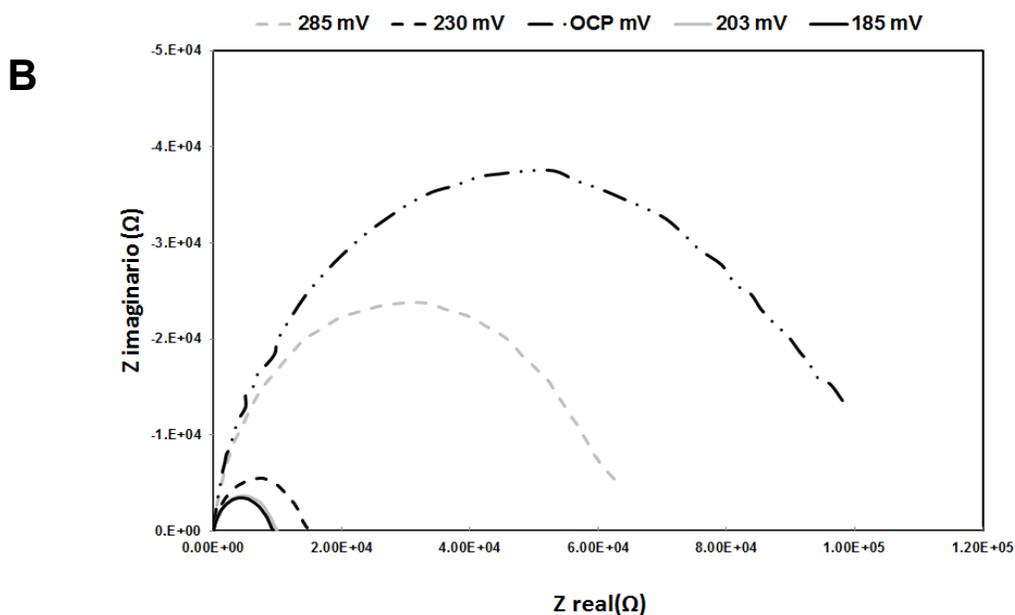
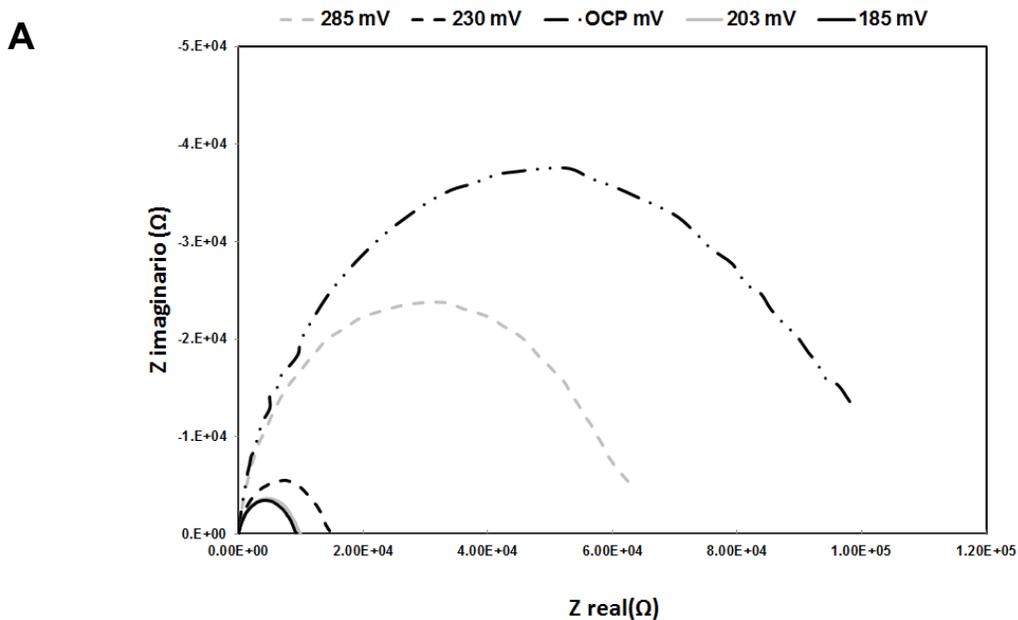


Figura 33: Evolución de la resistencia a la transferencia de carga con respecto al potencial aplicado de los encapsulados de nanotubos de VP6 con oro.

Se presenta diagrama de Nyquist de los resultados obtenidos. Se inició en una frecuencia de 50 kHz terminando en una frecuencia de 1 Hz. **A)** Encapsulados de nanotubos de VP6 con oro con 0.2% de nafion. **B)** Encapsulados de nanotubos de VP6 con oro con 0.05% de nafion.

Se determinó la resistencia a la transferencia (R_{ct}) de carga para cada uno de los encapsulados de las *tablas 3 y 4* por medio de un ajuste no lineal de circuito equivalente, obtenido en el programa *Equivcrt-Boukamp*, con ayuda y asesoría de la Dra. Margarita Miranda del Instituto de Energías Renovables UNAM (los datos del ajuste realizado se encuentran en apéndice). Se observó una tendencia entre los diferentes electrodos de trabajo y la variación de la resistencia a la polarización de carga según el electrodo utilizado. Se presentaron valores menores de R_{ct} para los electrodos de carbón vítreo, mientras que los electrodos con nafion presentan un mayor valor de R_{ct} , el cual aumenta conforme aumenta la concentración del polímero. Estos datos son congruentes con lo observado en la voltamperometría cíclica donde se observa una disminución en los picos máximos de corriente generada en los electrodos recubiertos con nafion. En la *figura 34* se muestra el gráfico comparativo de las diferentes R_{ct} de los encapsulados, para cada uno de los potenciales analizados. Los resultados mostraron que el carbón vítreo es el electrodo menos resistivo y que es posible lograr una pasivación del electrodo al recubrirlo con el polímero nafion y que esta pasivación dependerá de la cantidad de polímero utilizado. Además los resultados presentados sobre el encapsulado concuerdan con lo reportado en [70] donde observan que es posible retener a los nanotubos de carbono en la interfase con nafion sin interferir con las propiedades eléctricas de los nanotubos. Para todos los casos una disminución de la resistencia a la transferencia de carga una vez incorporada VP6, tanto sin funcionalizar como funcionalizada, con respecto a los electrodos solo con nafion. Lo anterior indica que la proteína VP6 tiene propiedades de conducción eléctrica por sí misma.

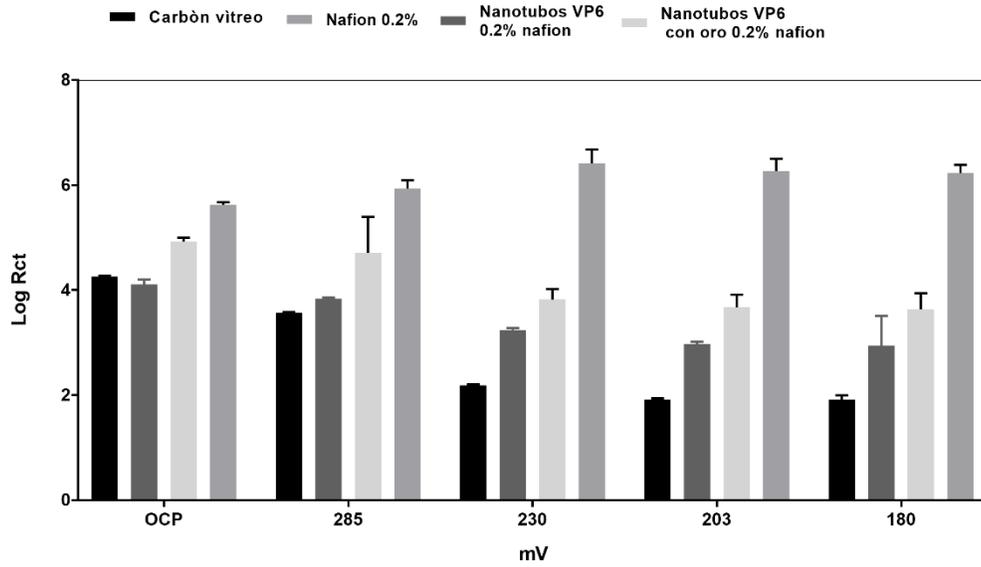
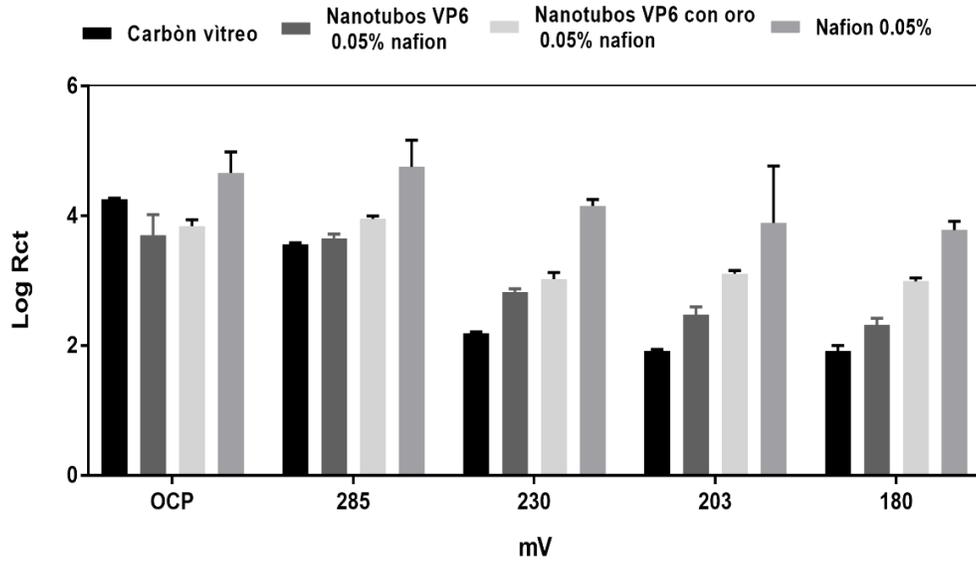
A**B**

Figura 34: Comparativa de resistencias de los diferentes encapsulados en los electrodos de trabajo.

Se presenta las resistencias obtenidas a partir del circuito equivalente. **A)** Encapsulados con 0.2% de nafion **B)** Encapsulados con 0.05% de nafion.

4.8.4 Voltamperometría cíclica (CV)

Dado a los resultados de impedancia, se evaluó VP6 como material componente de un electrodo de trabajo. Se realizaron CV a diferentes velocidades de barrido, en el sistema electroquímico descrito en la *figura 12*, con inmovilizados a dos concentraciones distintas de nafion, con el fin de evaluar si la tendencia de la respuesta voltamperométrica permanecía. Se utilizó GC como respuesta de referencia positiva. En la *figura 35* se muestran los electrodos de trabajo con nanotubos de VP6. Se observa que la proteína puede realizar un proceso de transferencia de carga, este fenómeno se presenta para las dos velocidades de barrido estudiadas. Con estos resultados se comprobó que VP6 es un buen candidato para ser usado como material de electrodo aún sin nanopartículas metálicas.

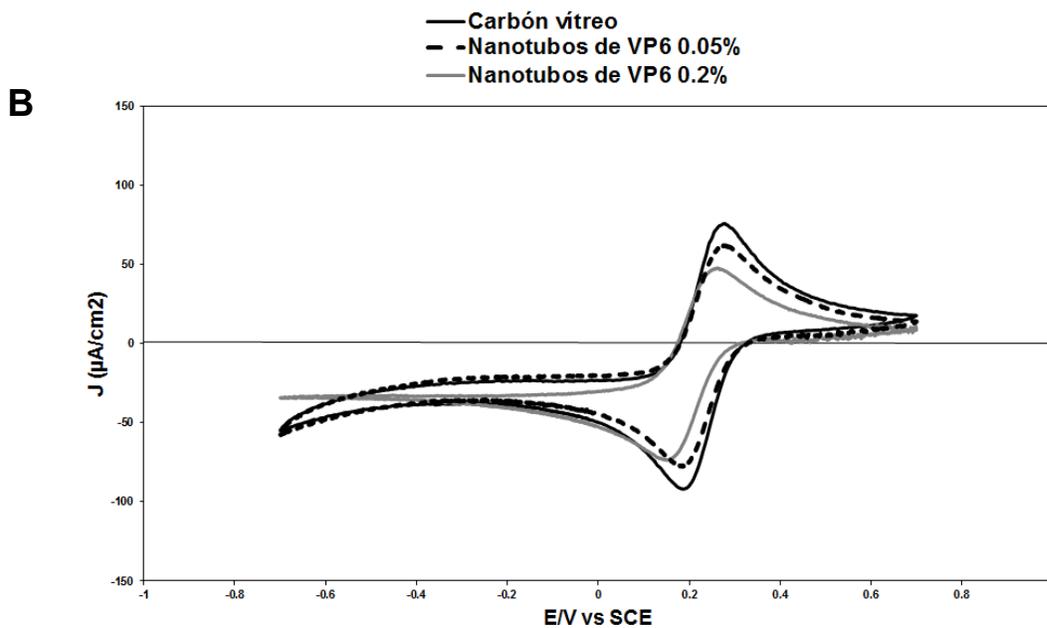
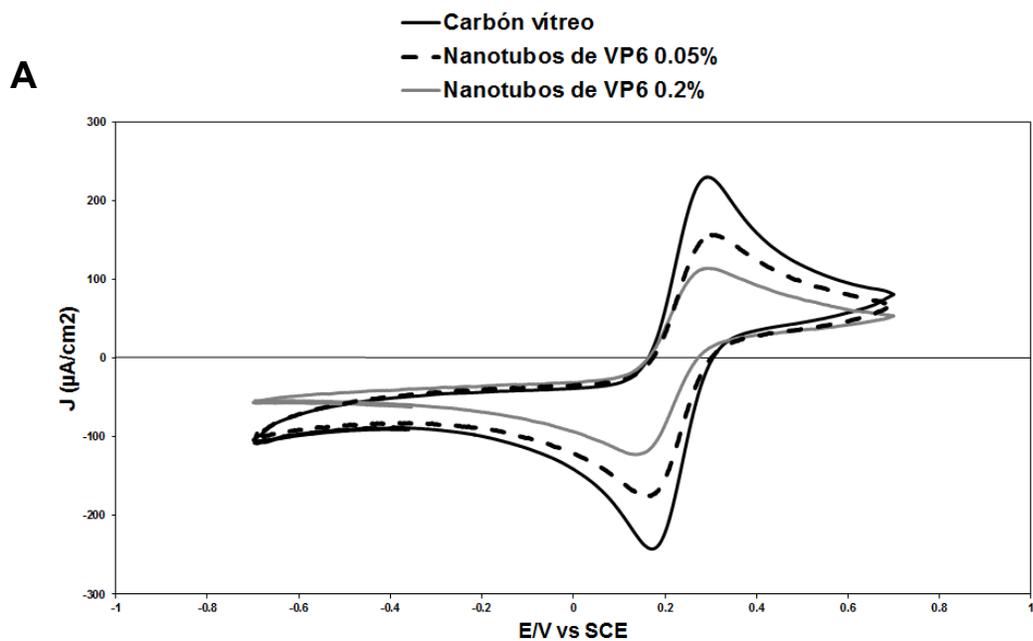


Figura 35: Respuesta voltamperométrica de los electrodos de trabajo con nanotubos de VP6.

Se utilizó en $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, a diferentes velocidades de barrido y diferente concentración de nafion en el encapsulado, iniciando en el OCP. **A)** 200 mV/s. **B)** 20 mV/s.

En la *figura 36* se muestran los voltamperogramas de los electrodos con nanotubos de VP6 con oro, bajo las mismas condiciones que el experimento anterior. Se observa una disminución en los picos máximos de oxidación-reducción con respecto al GC, pero se da la transferencia de carga.

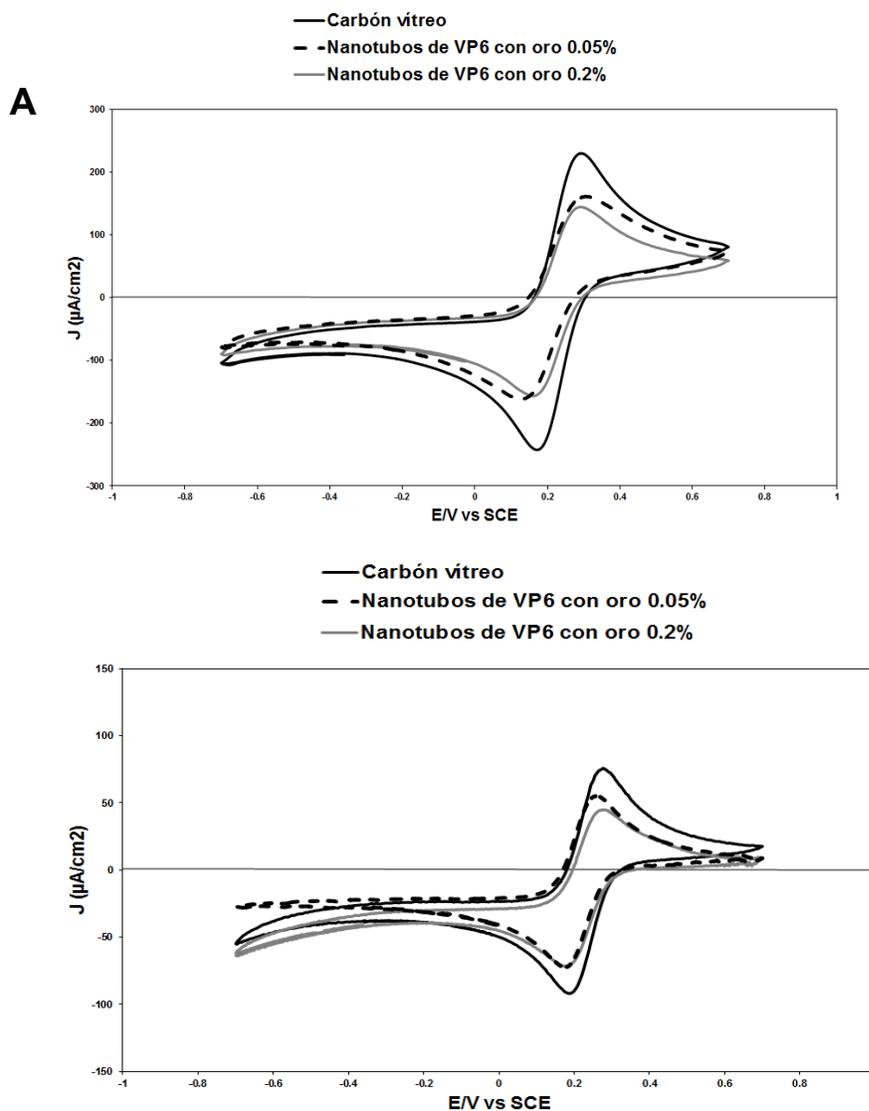


Figura 36: Respuesta voltamperométrica de los electrodos de trabajo con nanotubos de VP6 con oro.

Se utilizó $K_3[Fe(CN)_6]$, a diferentes velocidades de barrido, y diferente concentración de nafion en el encapsulado, iniciando en el OCP. **A)** 200 mV/s. **B)**

Con el fin de discernir si el proceso de transferencia de carga observado era específico a VP6 o bien si se trataba de algún fenómeno genérico asociado a la

presencia de material proteico o inclusive a algún error en la preparación de los electrodos (*tabla 5*), se prepararon electrodos de trabajo con albumina bovina (BSA), como proteína de control negativo para la transferencia de carga, En la *figura 37* se muestran los resultados de las determinaciones empleando BSA. Estos experimentos se realizaron bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores. Se observa la disminución de los picos de oxidación y reducción, para los dos electrodos con BSA probados con respecto al carbón vítreo, en ambas velocidades de barrido. Estos resultados demuestran que la preparación de nuestros electrodos es correcta y que el fenómeno observado en los electrodos con VP6, se debe a las propiedades eléctricas específicas de los nanotubos de VP6.

Para tratar de elucidar el mecanismo de transferencia de carga y si este se debía a la estructura del nanotubo, se construyeron electrodos de trabajo bajo las mismas condiciones con VP6 desensamblada, para esto se tomó una muestra directamente de la cromatografía de intercambio catiónico (ver *figura 21*), como se muestra en la *figura 38*, se obtuvo un perfil redox similar al de VP6 ensamblada en nanotubos, lo cual nos indica que VP6 en su estructura trimérica y/o monomérica puede realizar dicha transferencia.

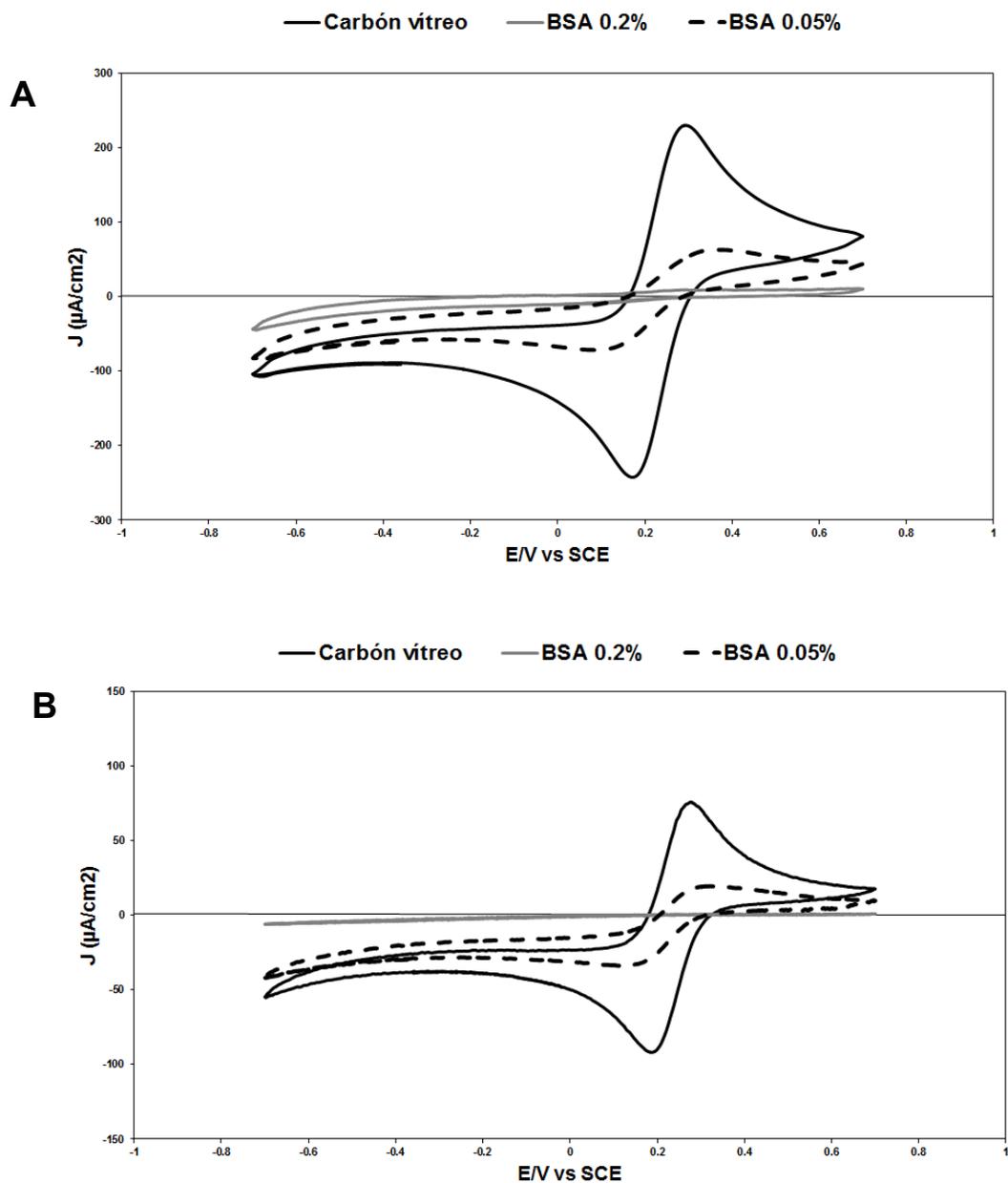


Figura 37: Respuesta voltamperométrica de los electrodos de trabajo con BSA. Se utilizó $K_3[Fe(CN)_6]$, a diferentes velocidades de barrido, y diferente concentración de nafion en el encapsulado, iniciando en el OCP. **A)** 200 mV/s. **B)** 20 mV/s.

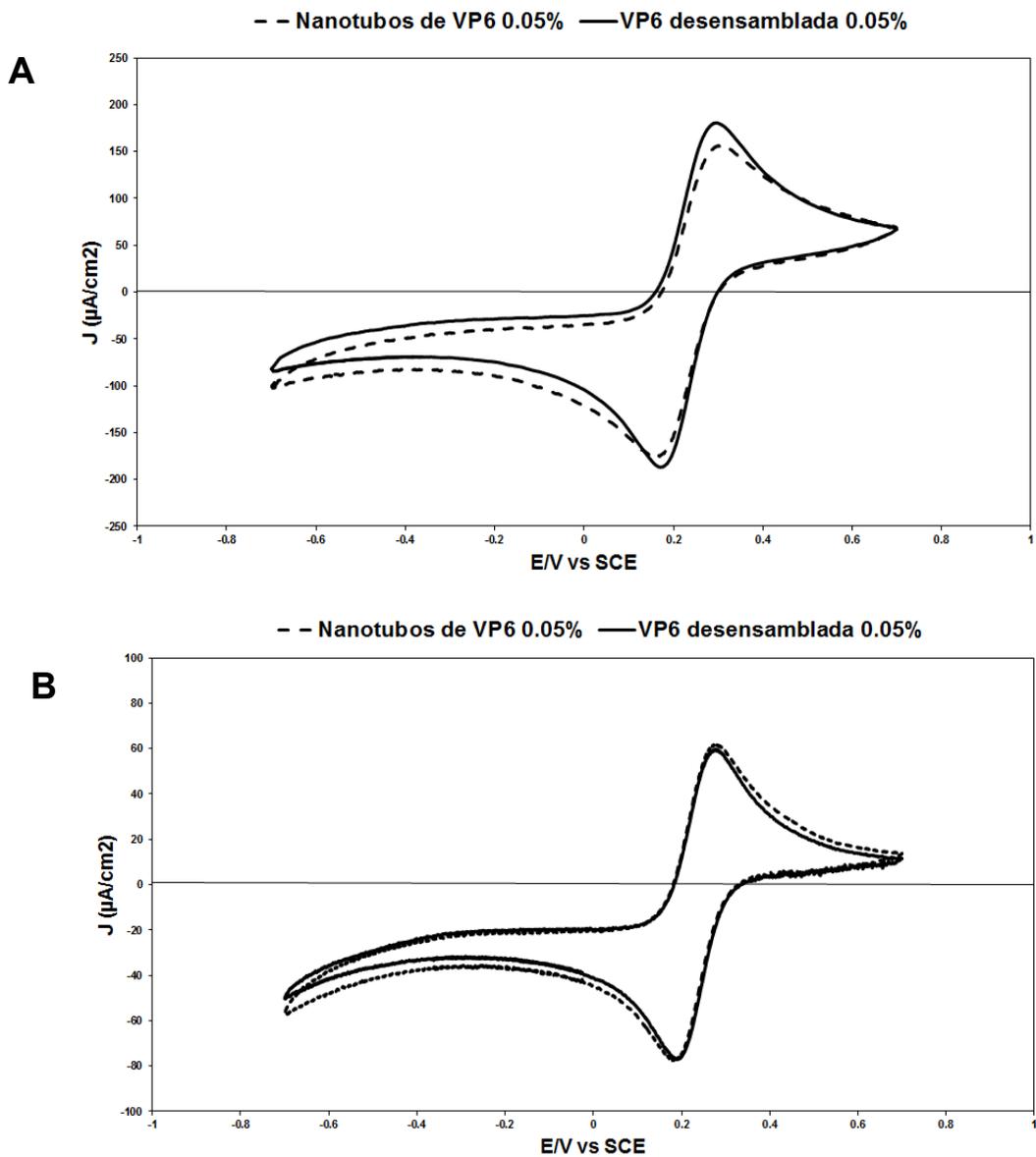


Figura 38: Respuesta voltamperométrica de los electrodos de trabajo con VP6 desensamblada vs VP6 en nanotubos.

Se utilizó $K_3[Fe(CN)_6]$, a diferentes velocidades de barrido, y diferente concentración de nafion en el encapsulado, iniciando en el OCP. **A)** 200 mV/s. **B)** 20 mV/s.

Podemos concluir dado los resultados hasta aquí obtenidos, que la proteína VP6 puede realizar un proceso la transferencia de carga pudiera no ser dependiente de la formación de nanotubos y probablemente se deba la estructura terciaria del trímero o inclusive a su secuencia de aminoácidos, es decir a la estructura primaria del monómero. Es necesario un análisis mucho más profundo para explicar este mecanismo.

A partir de la evidencia generada, se generan interrogantes sobre el mecanismo de transferencia de carga de VP6, tanto en nanotubos como desensamblada. Se sabe, según lo reportado en la literatura, que las moléculas orgánicas como proteínas y DNA transportan cargas netas principalmente en disolventes y son dependientes del medio, pH, estabilidad, temperatura, estructura, concentración y el tiempo, así como el grado de hidratación que presenten (los puentes de hidrógeno pueden ayudar al acarreamiento de protones). La composición de las proteínas también es importante: los aminoácidos aromáticos debido a sus enlaces pi, o bien a las aminas que actúan como donadoras de carga, también podrían ser responsables de la transferencia de carga. No obstante, el mecanismo de transferencia de carga puede ser consecuencia de todos los elementos mencionados combinados. Se han propuesto dos modelos de transporte de carga, uno por tunelamiento y otro por bien salto de electrones de molécula a molécula. Sin embargo, elucidar el mecanismo de conducción resulta altamente complejo debido a las múltiples variables que influyen en los ensayos, que dependerán también de la configuración de los ensayos [71]–[74].

Otra interrogante importante es *¿porqué con los nanotubos con oro no tenemos una mayor respuesta en la transferencia de carga o bien una menor resistencia a la polarización de carga?* Esto puede ser debido a las interacciones que se generan en la doble capa. Como ya se mencionó, estas interacciones podrían disminuir la transferencia de electrones en los nanotubos de VP6 funcionalizados con oro [49], o bien deberse a las diferencias energéticas entre los nanotubos de VP6 (aminoácidos) y las nanopartículas metálicas, donde pudiera no existir una transferencia de carga eficiente que favorezca la conducción eléctrica [75]

Para la determinación la reproducibilidad del método de encapsulado, se realizaron voltamperometrías cíclicas, para cada uno de los electrodos de trabajo mostrados en las *tablas 3, 4 y 5*, preparados independientes por triplicado (*Figuras 39 y 40*). Se observa una efectiva reproducibilidad, lo que confirma que las metodologías electroquímicas son adecuadas para la caracterización de las propiedades eléctricas de los nanotubos de VP6 y nanotubos de VP6 funcionalizados con oro.

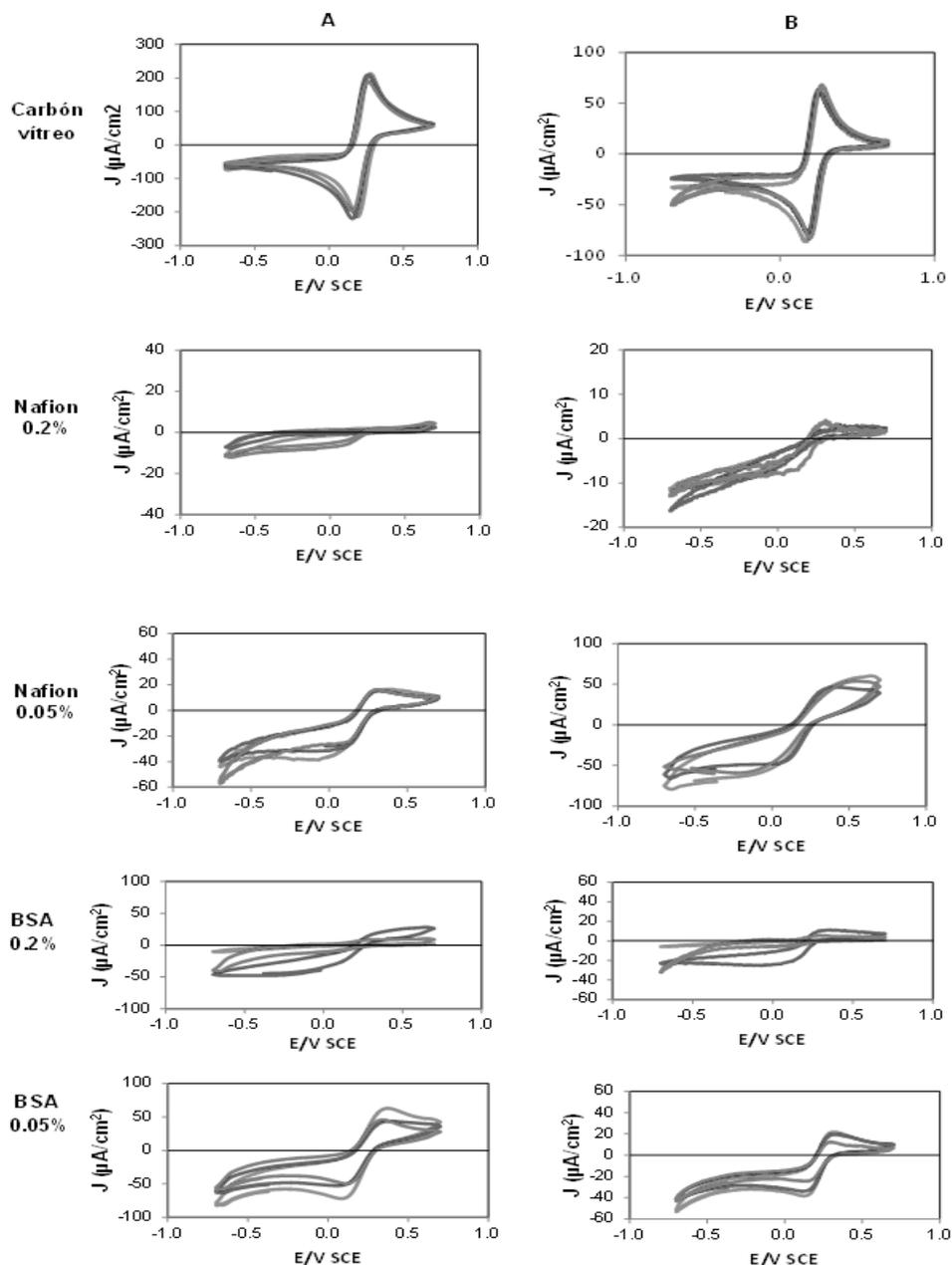


Figura 39: Repeticiones de montaje de electrodos de trabajo de tablas 3 y 5. Respuesta voltamperométrica, cada ciclo representa una repetición distinta. Se observa una reproducibilidad del métodos de encapsulado. **A)** Gráficas a una velocidad de barrido de 200 mV/s **B)** Gráficas a velocidad de barrido de 20 mV/s. El experimento fue iniciado en el valor de potencial de circuito abierto para cada electrodo de trabajo, en una ventana de potencial de -0.7 V a 0.7 V.

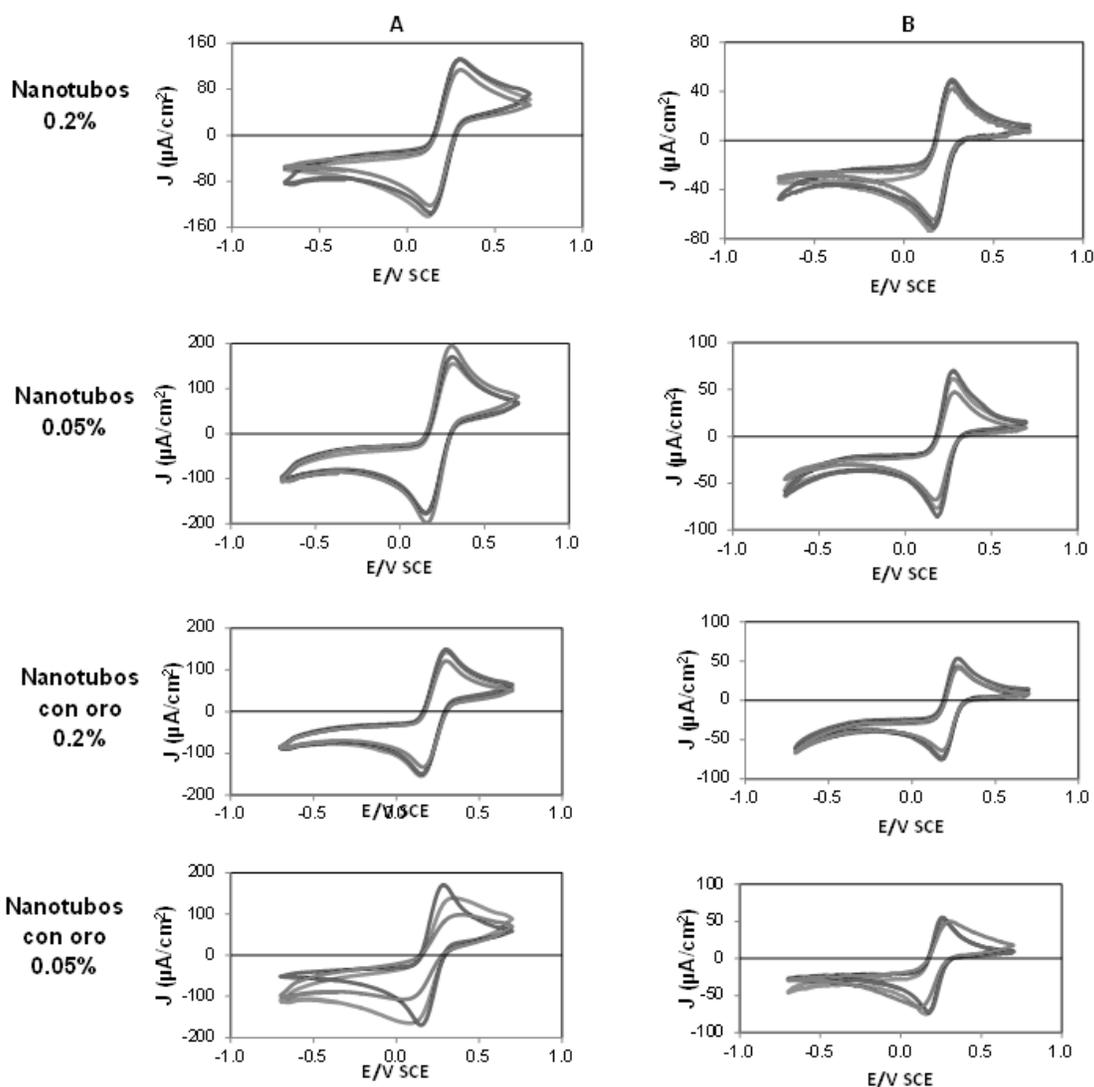


Figura 40: Repeticiones de montaje de electrodos de trabajo de tabla 4.

Respuesta voltamperométrica, cada ciclo representa una repetición distinta. **A)** Gráficas a una velocidad de barrido de 200 mV/s **B)** Gráficas a velocidad de barrido de 20 mV/s. El experimento fue iniciado en el valor de potencial de circuito abierto para cada electrodo de trabajo, en una ventana de potencial de -0.7 V a 0.7 V.

4.8.5 Análisis estructural de la interacción con nafion.

Para demostrar que la interacción con nafion no afectaba la estructura de los nanotubos, se montaron en rejillas para microscopía electrónica de transmisión inmobilizados de proteína simulando la superficie del electrodo de trabajo. En la *figura 41* se muestran las micrografías electrónicas correspondientes. Se puede observar que no hubo daño aparente de la estructura de los nanotubos ya sea con y sin oro.

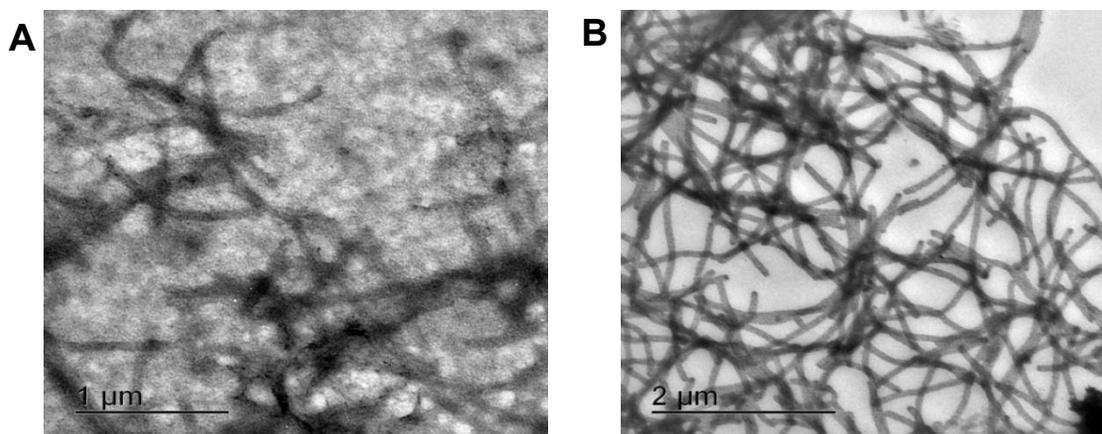


Figura 41: Micrografías electrónicas de transmisión de la simulación de los encapsulados.

A) Nanotubos sin oro, tinción negativa con acetato de uranilo, aumento 6300X. **B)** Nanotubos con oro, sin tinción. Aumento 4000X.

4.8.6 Caracterización estructural.

Para demostrar la presencia física de los nanotubos de VP6 con y sin oro presentes en la superficie del electrodo de trabajo se obtuvieron imágenes por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB). En la *figura 42* se muestran las micrografías electrónicas de diferentes electrodos utilizados en los ensayos electroquímicos. En la *figura 42 A* se muestra la imagen del carbón vítreo, pudiéndose observar la superficie plana. En la *figura 42 B* se muestra el encapsulado con nanotubos de VP6 con 0.05% de nafion. Se observan estructuras tridimensionales sobre la superficie del electrodo, indicando una superficie

recubierta comparada con el electrodo de carbón vítreo. Este recubrimiento observado se le atribuye a la presencia de VP6 en la superficie del electrodo. En la figura 42 C se muestra el electrodo con el encapsulado de nanotubos de VP6 funcionalizados con oro con 0.05% de nafion. Esta imagen muestra la presencia de los nanotubos de VP6 con oro en la superficie del electrodo. Para comprobar si lo observado correspondía a los nanotubos con oro, se realizó un análisis elemental por medio de difracción de rayos X, (figura 42 E). Para el análisis se seleccionó al azar una zona de elevada electrododensidad. Se identificaron tres elementos en la muestra; fluor (en menor proporción) que correspondería al polímero nafion, oro a las nanopartículas de los nanotubos de VP6 funcionalizados y carbono (en mayor proporción) que pudiera corresponder a la proteína o/y al carbón vítreo utilizado como soporte para el montaje de los encapsulados. Se determinó si los potenciales incididos sobre los electrodos afectaban o no a la estructura de los nanotubos de los electrodos analizados antes y después de incidir el potencial. Para los nanotubos con oro no se observan daños estructurales aparentes. No fue posible realizar el comparativo entre los nanotubos de VP6 sin oro, antes y después de incidir el potencial ni el análisis elemental debido a las características de la proteína (probablemente al contenido de agua), ya que la muestra colapsaba. Es necesaria la optimización del montaje para obtener imágenes de la estructura íntegra de los nanotubos de VP6 sin oro. Sin embargo si se obtuvo la evidencia de la proteína en el encapsulado con nafion.

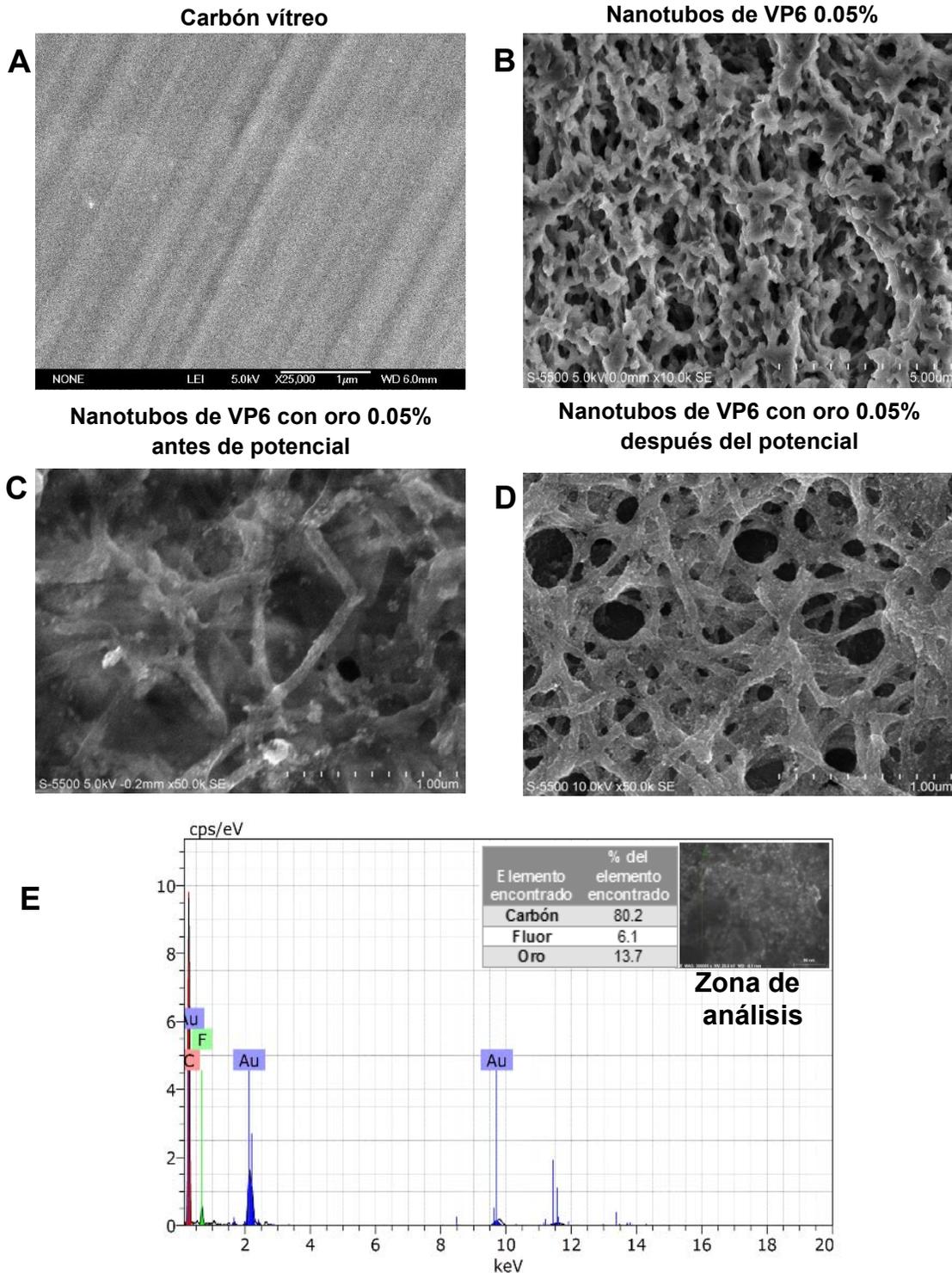


Figura 42: Micrografías electrónicas de electrodos con nanotubos de VP6.

A) Electrodo de trabajo de carbón vítreo (imagen proporcionada por el MC Andrés Arrocha del Instituto de energías Renovables UNAM). **B)** Electrodo de trabajo con encapsulados de nanotubos de VP6 con 0.05% de nafion. **C)** Electrodo de trabajo antes de incidir perturbación eléctrica. **D)** Electrodo de trabajo después de voltamperometría cíclica. No se observan daños estructurales aparentes. **E)** Análisis elemental por rayos X de la figura **C**. Los electros de las imágenes **B)**, **C)** y **D)** fueron inmovilizados con nafion al 0.05%.

4.8.7 Voltamperometría cíclica medio de cultivo celular.

Debido a que el electrodo de trabajo con el encapsulado de nanotubos de VP6 sería utilizado como soporte de crecimiento celular, se realizaron voltamperometrías cíclicas en el medio de cultivo que se utilizaría para el crecimiento celular. En las *figura 43* se muestran los voltamperogramas de los electrodos con nanotubos de VP6 y nanotubos de VP6 funcionalizados con oro respectivamente. En ningún caso se observan reacciones oxidación/reducción, al menos para la ventana de potencial analizada. Esto sugiere que tras incidir un potencial en un cultivo celular, al usar los nanotubos de VP6 o los nanotubos de VP6 funcionalizados con oro como sustrato para el crecimiento celular, los nanotubos no transferirían carga al medio de cultivo y por ende conllevará a la alteración de alguno de los componentes del medio, pudiendo generar estrés oxidativo que activara alguna vía de muerte celular [10], [16].

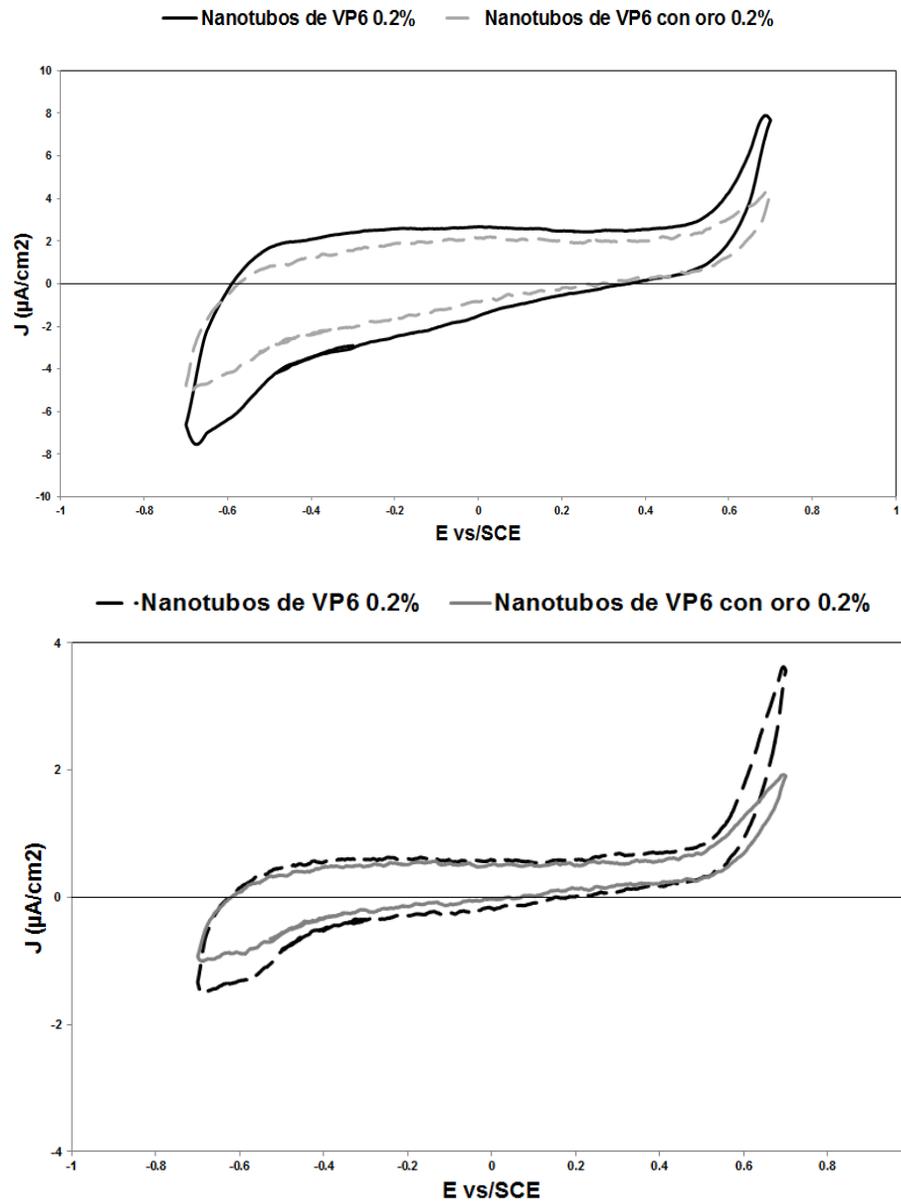


Figura 43: Respuestas voltamperométricas de nanotubos de VP6 en medio de cultivo. Inicio en el potencial de circuito abierto. **A)** Velocidad de barrido 200 mV/s. **B)** Velocidad de barrido 20 mV/s.

4.9 Manejo de líneas celulares

Después de sacar las líneas celulares de la crio-preservación y antes de realizar algún experimento, se realizaron al menos tres pases, para asegurar el correcto estado de las líneas celulares.

4.10 Pruebas de citotoxicidad

Para descartar un posible efecto citotóxico de los nanotubos de VP6 con y sin oro al ser expuestos en cultivos celulares, se realizó un ensayo enzimático de actividad mitocondrial, en donde la disminución de la actividad enzimática se relaciona con un efecto citotóxico. El ensayo consiste en la reducción del bromuro del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), en una sal de formazan colorida por acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, siendo la actividad enzimática proporcional al producto generado [66]. Se observó una respuesta similar para las dos líneas celulares estudiadas. En las células expuestas a los nanotubos sin funcionalizar se observó una actividad mitocondrial normalizada con respecto a las células sin exponer a las nanoestructuras por arriba del 90% indicando que no se produce un efecto citotóxico. En las células expuestas a los nanotubos con oro se observa un efecto citotóxico, que aumenta conforme se incrementa la cantidad de nanotubos en los pozos de cultivo (*Figura 44*). Se realizó un análisis de varianza, que demuestra que las diferencias entre las células expuestas a los nanotubos de VP6 con oro con respecto al control de células sin exponer, son estadísticamente significativas. Estos resultados sugieren que el uso de nanotubos funcionalizados con oro como soporte para el crecimiento celular no es una opción viable, debido a que se podrían generar respuestas celulares negativas en caso de ser utilizadas las nanoestructuras.

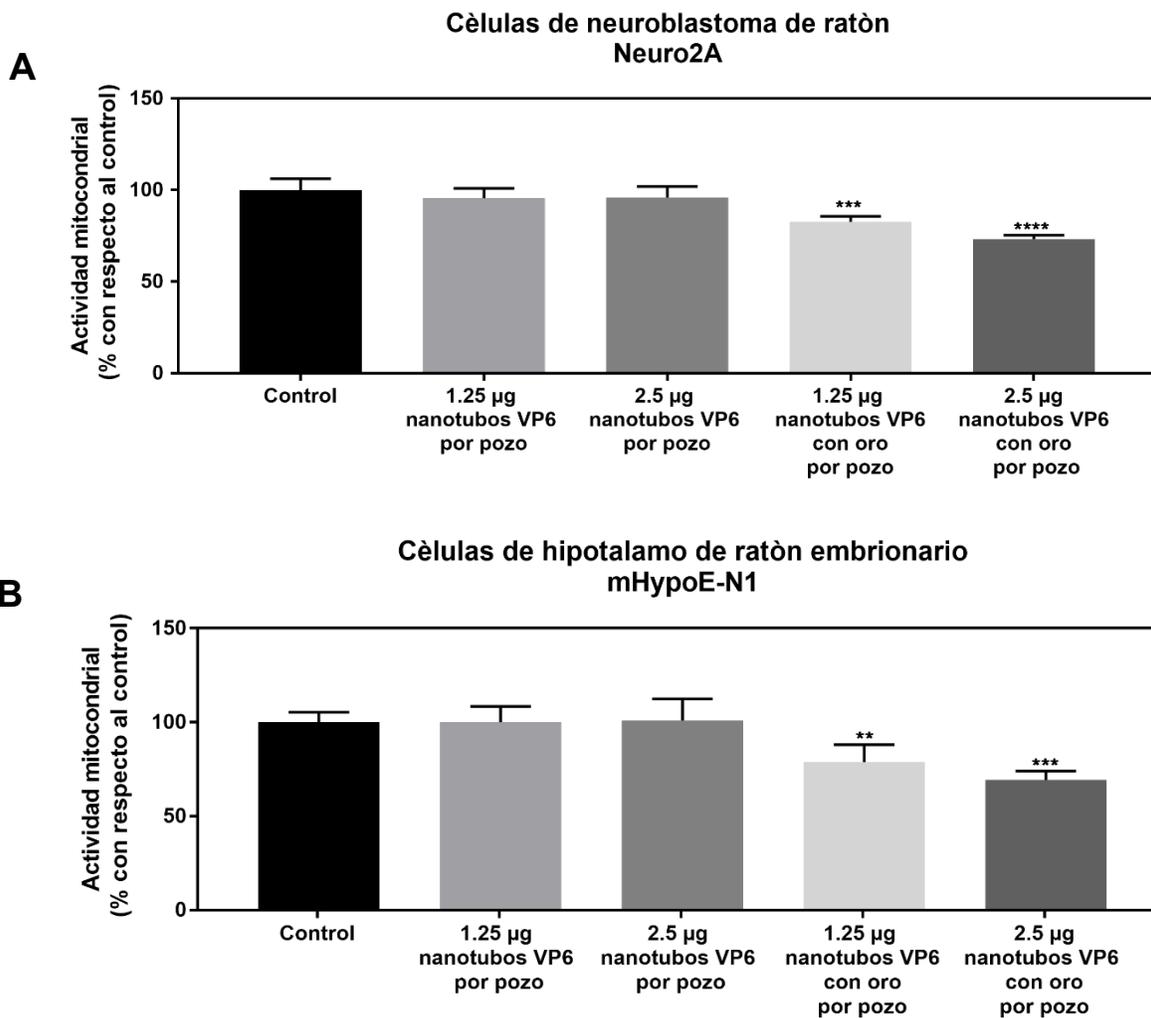


Figura 44: Determinación de actividad mitocondrial por medio de MTT.

El tiempo de exposición a las nanoestructuras fue de 52 h. **A)** Neuro 2A. **B)** mHypoE-N1.

(**)= $P \leq 0.01$. (***)= $P \leq 0.001$. (****)= $P \leq 0.0001$

4.11 Uso de nanotubos como sustrato celular.

4.11.1 Crecimiento celular.

Previamente se han tenido reportes donde se favorece la diferenciación y/o proliferación celular modificando el sustrato o bien modificando el ambiente de crecimiento celular [76]–[78]. Por esta razón las células (Neuro 2A y mHypoE-N1) fueron crecidas sobre los encapsulados de la *tabla 5 (a-e)*. Las respuestas generadas fueron muy similares para las dos concentraciones de nafion utilizadas. Para ambas líneas celulares, se observó que en los encapsulados con nanotubos de VP6 disminución de la proliferación celular, así como un cambio en la morfología de las células, debido a estrés aparente provocado por la presencia de nanotubos de VP6. Estos cambios no se observaron en los pozos de control de células y en los pozos que contenían solamente el polímero nafion (*Figuras 45 y 46*).

El efecto visto en los nanotubos de VP6 sobre la proliferación celular pudiera estar relacionado con la capacidad de VP6 para transferir carga, según la evidencia presentada anteriormente. Se pudiera estar afectando la comunicación celular como la sinapsis. Otra posible causa según lo observado por Castro-Acosta y colaboradores [79], es que VP6 en forma de nanotubos presenta mayor resistencia a estrés oxidante, comparada con VP6 desensamblada o BSA. Esto sugiere que el papel de los aminoácidos hidrofílicos en el nanotubo de VP6, pudiera ser el de interactuar con especies reactivas de oxígeno. En el contexto celular, esta interacción pudiera generar intermediarios que modifiquen el ambiente celular y afecten la supervivencia de las células en cultivo. Ante la evidencia presentada, el uso de los nanotubos de VP6 como sustrato para el crecimiento celular, no resulta ser una opción viable. Es necesario realizar más ensayos para poder elucidar cual es mecanismo de daño que generaran los nanotubos de VP6 a las células en cultivo.

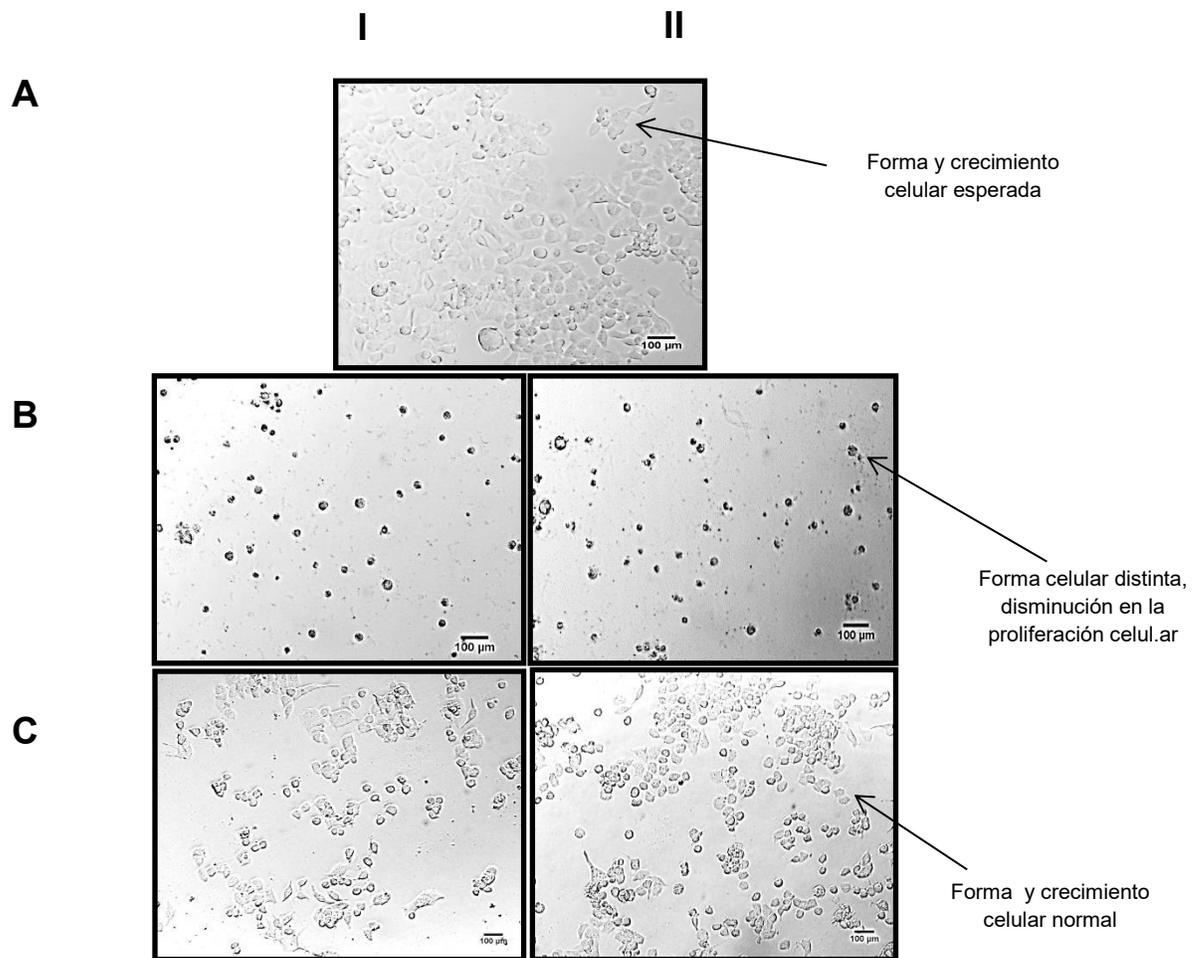


Figura 45: Nanotubos utilizados como sustrato de crecimiento celular, células Neuro 2A, a las 52 h de cultivo.

AI-II) Células control. **BI y BII)** Células crecidas sobre encapsulados de nanotubos de VP6 con 0.2% y 0.05% de nafion respectivamente. **CI y CII)** Células crecidas sobre nafion 0.2% y 0.05% respectivamente.

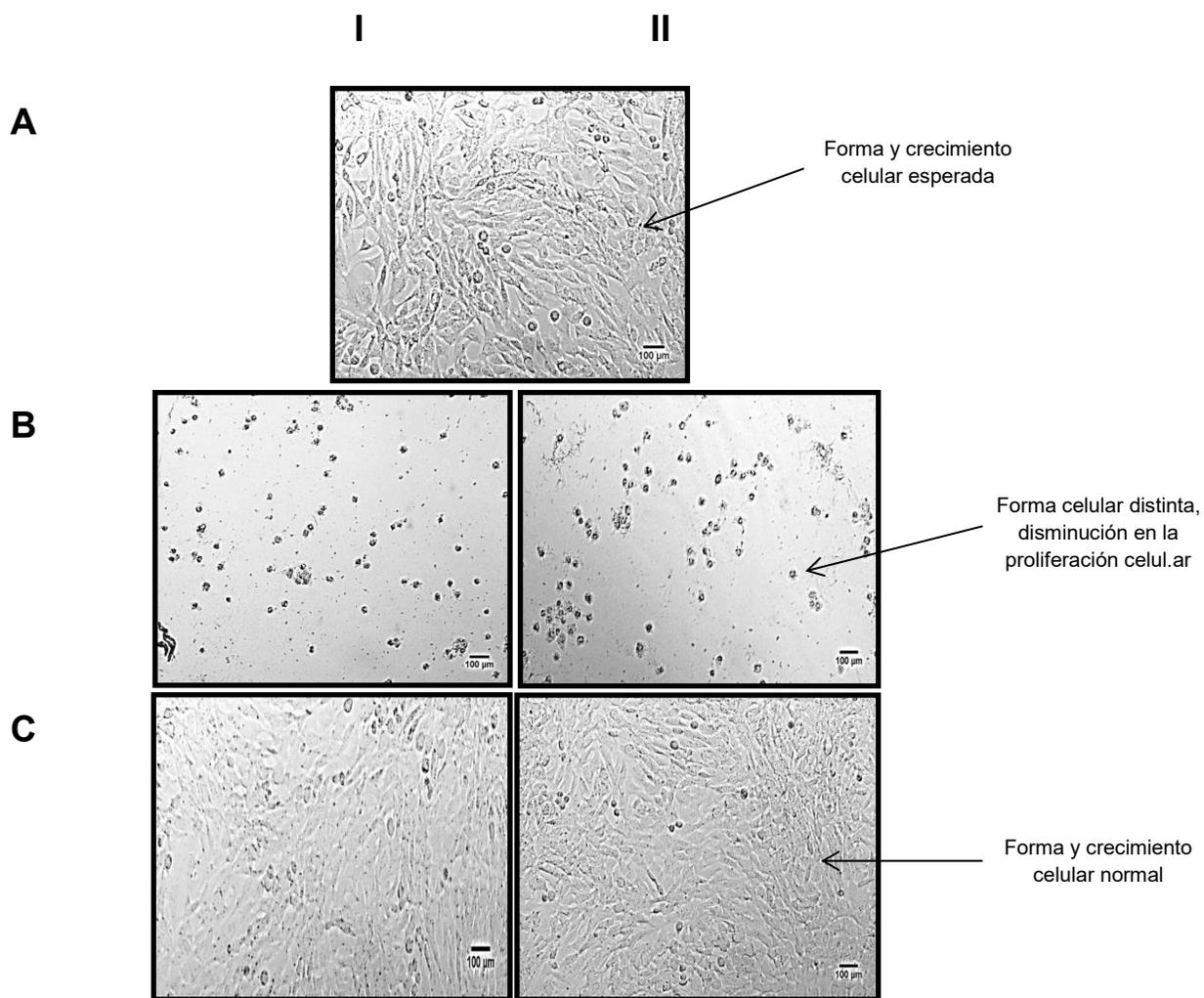


Figura 46: Nanotubos utilizados como sustrato de crecimiento celular, células mHypoE-N1 a las 52 h de cultivo.

AI-II) Células control. **BI y II)** Células crecidas sobre encapsulados de nanotubos de VP6 0.2% y 0.05% de nafion respectivamente. **CI y II)** Células crecidas sobre nafion 0.2% y 0.05% respectivamente.

4.11.2 Determinación de distribución aparente de nanotubos en los pozos.

Se realizó la detección de VP6 por ELISA (ver materiales y métodos) sobre los pozos utilizados como soporte para el crecimiento celular tal como se muestra en la *tabla 5* (a-e). En la *figura 47 A* se muestra la placa de cultivo a la cual se le realizó un barrido de fluorescencia (cada condición se realizó por duplicado). Se observó que nafion presenta una fluorescencia no significativa con respecto a los pozos que contienen VP6, lo que sugiere que la señal es debida a la detección de VP6. Las unidades de fluorescencia mostradas en la *figura 47 B* corresponden a cada uno de los pozos de la *figura 47 A*. Se observó que las unidades de fluorescencia determinada para los pozos con VP6 son mayores, por al menos seis veces más, que en los pozos con solamente nafion. La mayor fluorescencia detectada de VP6 fue en la periferia del pozo, así como en los pozos con nanotubos re-ensamblados (fueron sometidos a desensamble con 150 mM de CaCl₂ y re-ensamblados por diálisis antes de la realización del experimento). Esta diferencia con respecto a los pozos con nanotubos del lote 1 (obtenidos de la purificación de pellet con 7 meses de almacenaje a 8 °C) refleja un posible desensamble de VP6 a través del tiempo. Este inmunoensayo ayuda a ratificar que el encapsulado con nafion funciona, debido a que observamos a VP6 retenida en los pozos de cultivo a través de la reacción antígeno anticuerpo. Es necesaria la estandarización del método para obtener resultados más certeros.

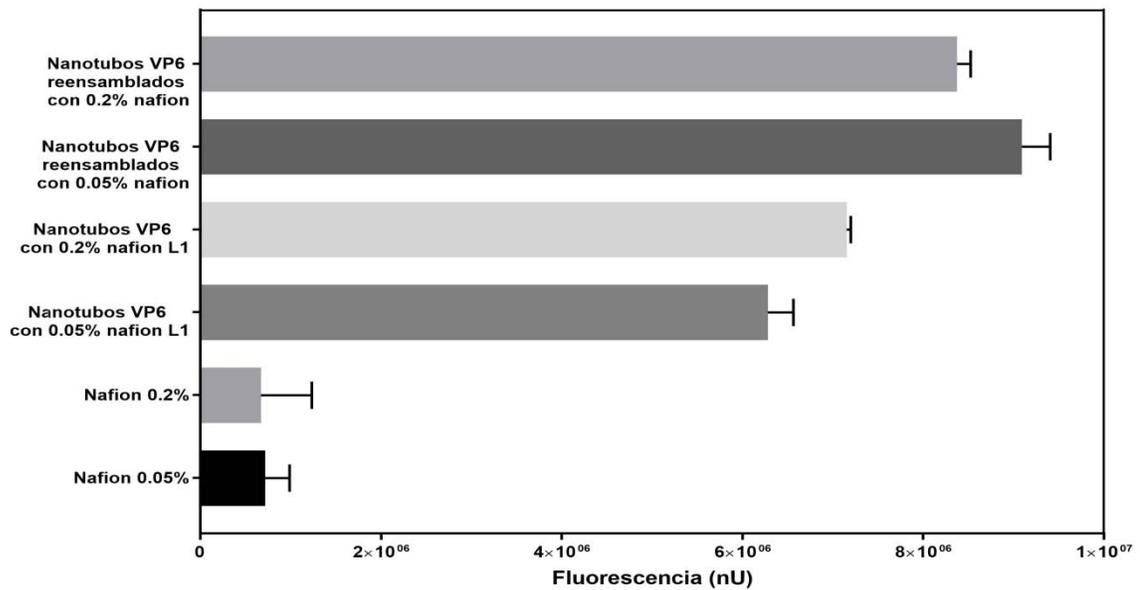
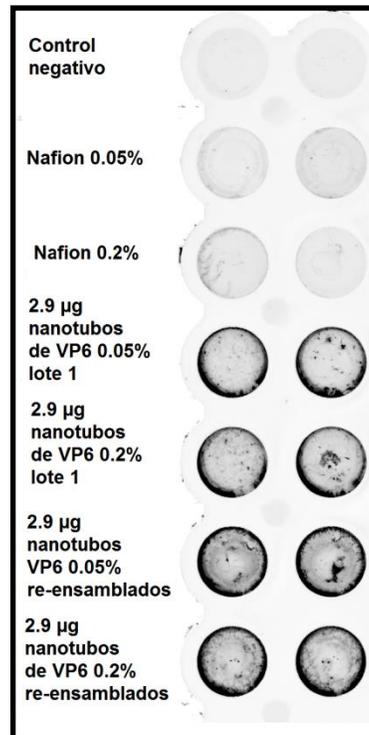


Figura 47: Prueba de inmunofluorescencia para observar la distribución de VP6 en los pozos de crecimiento celular.

A) Resultado del barrido de fluorescencia con *Typhoon*TM. **B)** Grafica de unidades de fluorescencia obtenidas de A, se eliminó la fluorescencia basal del control negativo (buffer de fosfatos).

4.11.3 Evaluación de la cantidad de VP6 en el soporte celular.

Dado lo obtenido previamente en el ensayo de actividad mitocondrial, así como lo reportado previamente en nuestro grupo [7], [46], se esperaba un resultado favorable al utilizar los nanotubos de VP6 sin oro como soporte para el crecimiento celular. Sin embargo, se observó claramente la disminución de la viabilidad celular. Se realizaron diferentes soportes variando la cantidad de VP6 en cada uno de ellos, con el objetivo de elucidar si la disminución de la viabilidad celular dependía de la cantidad de proteína que componía al soporte. En la *figura 48*, se muestra el comportamiento de las dos líneas neuronales analizadas. Se observó que la viabilidad, al menos para el tiempo analizado (52 h de exposición al soporte), aumenta conforme disminuye la cantidad de proteína contenida en el soporte. Para ambas líneas celulares la viabilidad disminuyó por debajo del 60% desde cantidades de 0.25 µg de proteína VP6, llegando hasta casi 0% de viabilidad en cantidades de 2.9 µg de proteína en el soporte (cantidad de proteína utilizada en el análisis electroquímico). Estos resultados confirman que la presencia de VP6 en el soporte celular afecta a la viabilidad y proliferación celular. Este fenómeno es dependiente de la cantidad de proteína en el soporte celular. Se realizó un análisis de varianza encontrando que nuestros resultados son estadísticamente significativos.

Con el fin de observar si el efecto negativo persistía en células no neuronales, se realizó el ensayo bajo las mismas condiciones que el ensayo anterior pero utilizando células de pulmón humano (A-549) y células de riñón de hámster bebe (BHK), ambas líneas celulares crecen en adherencia, donde se observó una tendencia similar a las células neuronales. Sin embargo la supervivencia es mayor para las líneas no neuronales. *Figura 49*.

La variabilidad observada entre las líneas celulares estudiadas y la correlación de la viabilidad celular, en función a la cantidad de proteína en el soporte utilizado puede deberse a los requerimientos particulares de cada línea celular. Estos dependerán del tipo celular y su función particular, que van desde la composición proteica de la matriz extracelular, así como el mecanismo por el cual

se lleva el anclaje y proliferación celular. La proteína VP6, podría estar llevando a cabo procesos de bloqueo o desvío de biomoléculas necesarias para la supervivencia o bien las propiedades físicas del soporte como rigidez, curvatura y distribución espacial de las nanoestructuras, que pudieran activar mecanismos de muerte celular o interferir con la adecuada proliferación celular [76], [80]–[82].

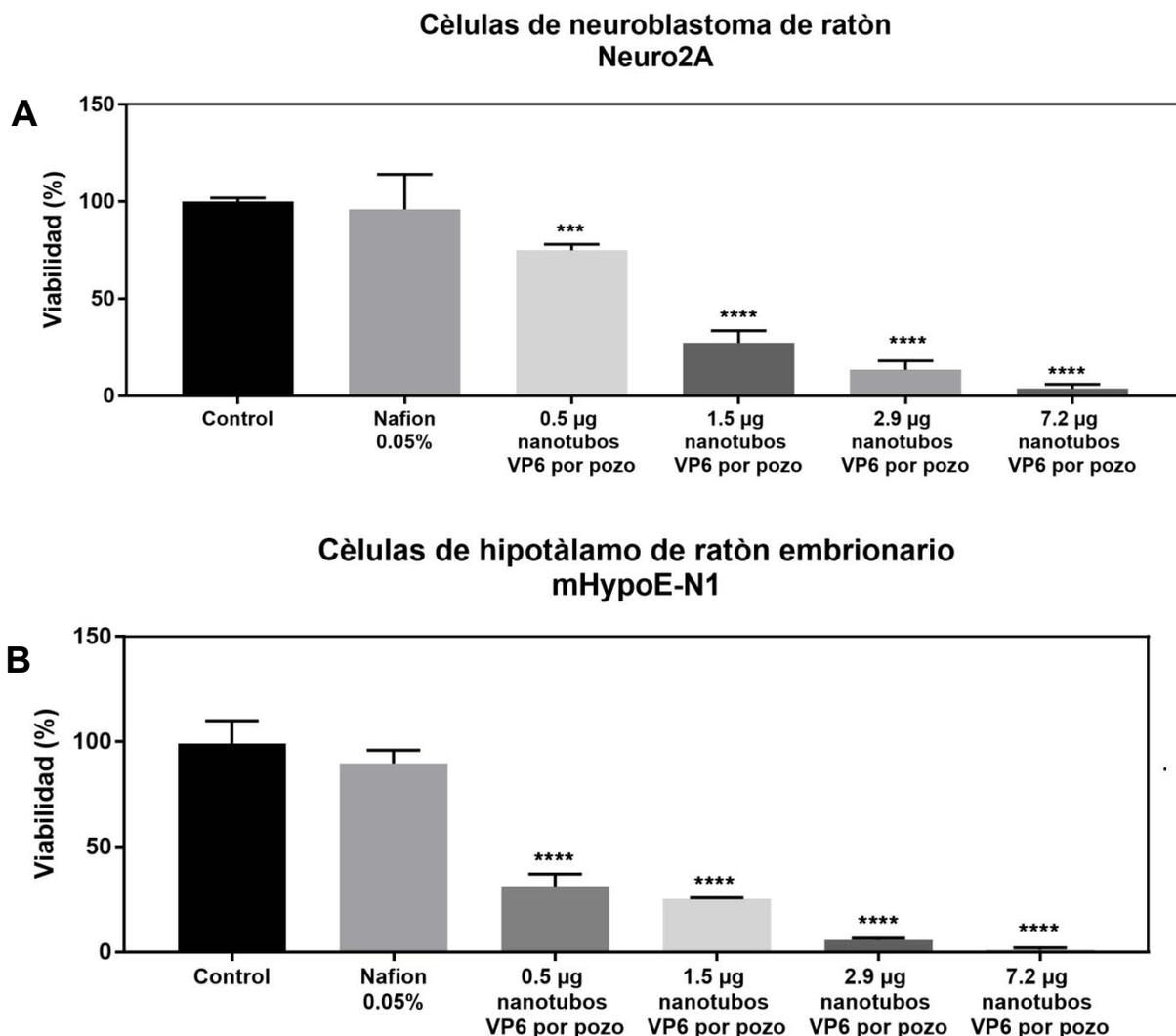


Figura 48: Viabilidad celular normalizada de células neuronales.

Los resultados fueron normalizados con respecto a las células crecidas directamente en los pozos de cultivo. Tiempo de exposición al soporte celular: 52 h. A) Neuro 2A. B) mHypoE-N1. (***)= $P \leq 0.001$. (****)= $P \leq 0.0001$.

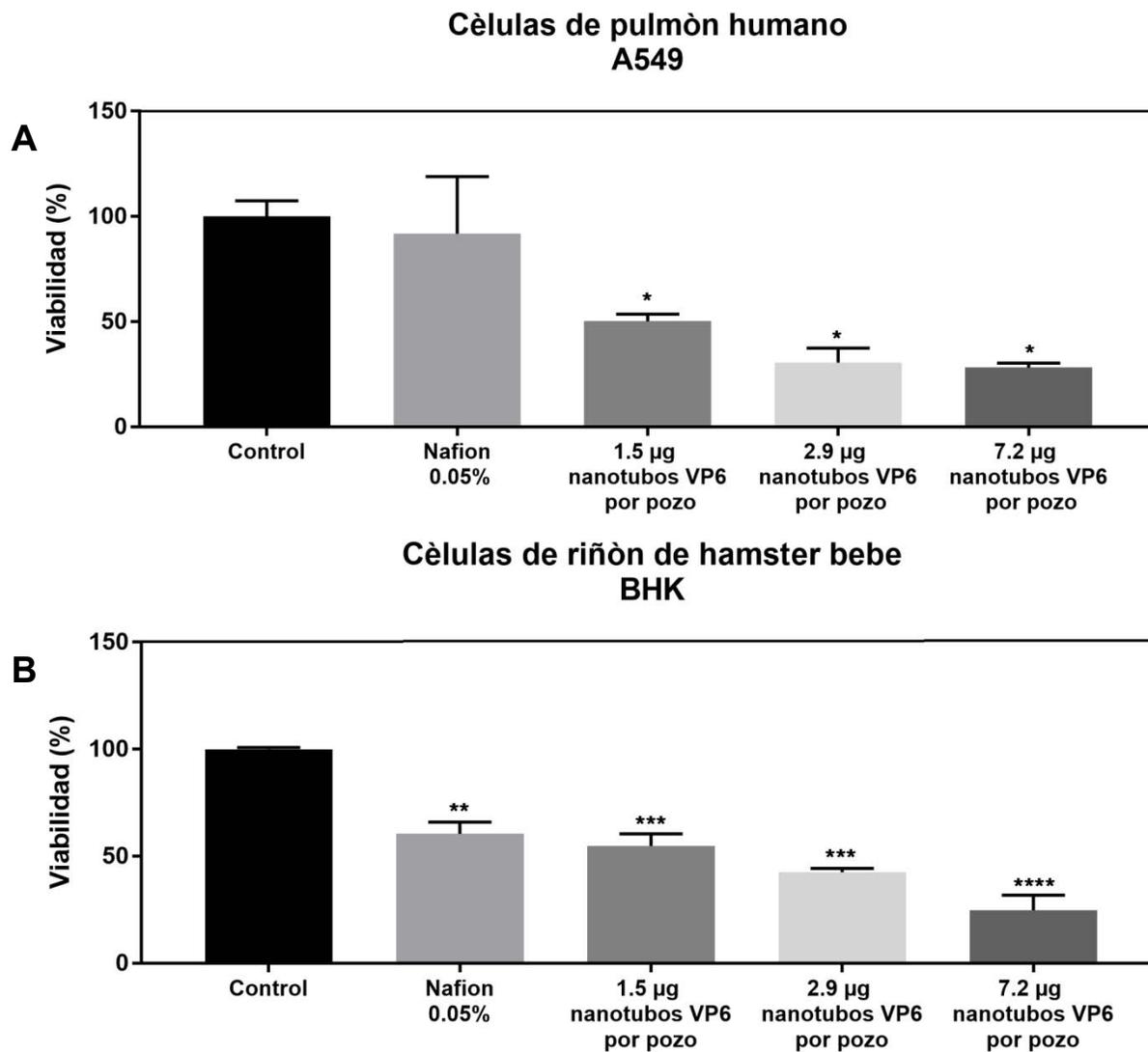


Figura 49: Viabilidad celular normalizada de células no neuronales.

Los resultados fueron normalizados con respecto a las células crecidas directamente en los pozos de cultivo. Tiempo de exposición al soporte celular: 52 h. A) A-549. B) BHK.

(*)= $P \leq 0.05$. (**)= $P \leq 0.01$. (***)= $P \leq 0.001$. (****)= $P \leq 0.0001$.

Capítulo 5. Conclusiones

La evidencia experimental del presente trabajo demostró que la purificación de proteína recombinante VP6 a partir de pellet celular resulta en un proceso de mayor eficiencia comparado con la purificación de proteína del sobrenadante, los rendimientos obtenidos fueron de 0.4% de proteína total recuperada a partir de sobrenadante, mientras que se recuperó 5% de proteína total a partir de la purificación de pellet. A partir de fracción purificada de pellet, se pudo llevar a cabo un proceso de funcionalización más homogéneo, convirtiéndolo en un método escalable para la producción de nanobiomateriales funcionales. La obtención de nanobiomateriales homogéneos posibilita su aplicación para el desarrollo de dispositivos nanoestructurados.

El conocer la eficiencia de reducción de oro (III) sobre los nanotubos de VP6 brinda conocimiento sobre su funcionalización, lo cual permite tener parámetros de calidad durante la producción de nanobiomateriales. Esto se logró a partir de la implementación del método para la cuantificación de oro (III) por medio de espectrofotometría, que permitió reducir el tiempo para obtener resultados, así como la reducción del uso de varios solventes orgánicos comparado con otros métodos. Los resultados del presente trabajo muestran que se trata de un método reproducible.

Se caracterizaron las propiedades eléctricas de los nanotubos de VP6, funcionalizados y sin funcionalizar. Se demostró que nafion puede encapsular a nanotubos de VP6, sin funcionalizar y funcionalizados, presentándose una interacción electrostática que no afecta la forma del nanotubo. Esta interacción es resistente a procesos de solubilidad, manteniendo una interfase estable para su análisis electroquímico. Además, tal encapsulado no interfiere con la transferencia de carga en los análisis electroquímicos, lo que permite una caracterización adecuada de las propiedades eléctricas de VP6. Por medio de espectroscopia de impedancia electroquímica se determinó la transferencia de carga de diferentes encapsulados por medio de un análisis de circuito equivalente, demostrando que los encapsulados con la proteína VP6 presentan una resistencia a la transferencia de carga menor que los encapsulados sólo

con polímero. Se corroboraron por voltamperometría cíclica las respuestas obtenidas mediante espectroscopia de impedancia electroquímica. Esto es, que los electrodos de trabajo que contenían a la proteína VP6 mejoraban la respuesta eléctrica y que podían realizar la reacción redox del ferricianuro de potasio comparada con los electrodos de trabajo que contenían solamente al polímero nafion. Respuestas similares se presentaron en los nanotubos de VP6 con y sin oro. Se observó que para las condiciones estudiadas la proteína VP6 puede transferir carga y que esta transferencia no es debida a su arreglo en nanotubos, sino probablemente a su estructura trimérica.

Se realizaron ensayos con células en cultivo y la proteína VP6, funcionalizada y no funcionalizada. Se evaluó el efecto sobre la actividad mitocondrial de células neuronales en cultivo, determinándose que no existían efectos adversos sobre el metabolismo mitocondrial para los nanotubos de VP6, mientras que los nanotubos de VP6 con oro causaron un efecto citotóxico en las células estudiadas. Sin embargo, cuando se utilizaron las nanoestructuras como soporte para el crecimiento celular se observaron daños que afectan a la proliferación y viabilidad celular. Se observó que la viabilidad celular era dependiente de la cantidad de proteína utilizada en el soporte, así como tipo y función celular. Los resultados obtenidos indican que el uso de VP6 en sistemas biológicos no resulta una opción viable en periodos prolongados.

Capítulo 6. Perspectivas

Es necesario mejorar los procesos de producción en el sistema células de insecto-baculovirus, ya que los rendimientos que se obtuvieron fueron bajos comparados con la literatura [6], además la calidad de los nanotubos generados fue muy variable según la fuente de purificación utilizada. Para tener sistemas de producción más eficientes, es necesario el diseño de ensayos como qPCR para asegurar que el baculovirus a utilizar porte el gen que codifique para VP6. Para la obtención de nanotubos de VP6 a partir de pellet celular, sería importante implementar métodos de extracción o lisis celular para disminuir las pérdidas de proteína en este paso. Por ejemplo, se podrían implementar gradientes salinos para optimizar los tiempos y volúmenes de elución de la proteína. Es importante definir y estandarizar un proceso más eficiente de purificación que conlleve la reducción de costos, aumento de los rendimientos y calidad de nanomateriales obtenido.

Se observó que los nanotubos de VP6, obtenidos a partir de pellet celular, eran más frágiles a procesos de centrifugado, comparado con nanotubos de VP6 obtenidos a partir de sobrenadante de cultivo. El realizar pruebas de microscopia de fuerza atómica permitiría determinar las propiedades físicas de los nanotubos de VP6 obtenidos a partir de pellet celular y con esto poder definir de forma más racional las condiciones límites del bioproceso.

Sería importante realizar estudios de estabilidad, como la exposición de los nanotubos de VP6 a diferentes temperaturas, determinar el tiempo real en el que el ensamblaje no se ve afectado cuando son almacenados o al exponerlos a diferentes moléculas como alcoholes, tensoactivos, etc. De esta forma se podría explotar al máximo las propiedades de los nanotubos de VP6 y ampliar sus posibles aplicaciones.

Se necesita mejorar el proceso de funcionalización y establecer los factores que lo afectan, como temperatura, tiempo de funcionalización, fotosensibilidad, etc, para hacerlo un proceso robusto y escalable. De

lograrlo, resultaría en la obtención de nanobiomateriales más homogéneos, aumentando la reproducibilidad de fenómenos al utilizar a los nanotubos de VP6 funcionalizados con oro como material de electrodo.

Se demostró que la proteína VP6 es capaz de realizar procesos de transferencia de carga, aún sin estar funcionalizada. Es importante elucidar el mecanismo por el cual VP6 puede transferir la carga, ya que resulta sumamente interesante este fenómeno en proteínas. Se podrían realizar estudios de microscopia de tunelamiento así como simular la ruta de transferencia de carga con ayuda de programas computacionales para tratar de esclarecer el mecanismo de transferencia de carga en la proteína VP6. A partir de los resultados del presente trabajo se generan varias interrogantes, tales como: ¿La transferencia de carga es propiedad única de VP6?, o bien ¿es propiedad de proteínas virales? Y de ser así, ¿estará relacionada la transferencia de carga con algún proceso de infección celular *in vivo* de algunos virus?

Los resultados obtenidos en este trabajo, contribuyen a establecer las bases del conocimiento para el desarrollo de microelectrodos empleando partículas pseudovirales. Si bien se demostró que los nanotubos de VP6 no fueron un biomaterial efectivo para ser utilizado en células en cultivo, las propiedades conductoras, así como el polimorfismo de VP6 pudieran ser utilizadas para la formación de monocapas autoensambladas que resulten en arreglos nanoestructurados para el mejoramiento y/o desarrollo de microelectrodos. La proteína VP6 podría ser utilizada como estructura de anclaje de otras biomoléculas como por ejemplo enzimas. Dada su naturaleza biológica, VP6 pudiera favorecer la interacción proteína-proteína, permitiendo exponer el sitio activo de la enzima generando islas enzimáticas activas. Estas a su vez podrían resultar en la conversión de sustratos con mayor eficiencia que el uso de compuestos químicos para el anclaje de enzimas, como lo reportado comúnmente en la literatura para el desarrollo de biosensores.

Capítulo 7. Referencias

- [1] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, and V. M. Rotello, **“Gold nanoparticles in chemical and biological sensing,”** *Chem Rev* 2012, 112: 2739–79.
- [2] G. Plascencia-Villa, A. Medina, L. A. Palomares, O. T. Ramirez, and J. A. Ascencio, **“Structural Characterization of Rotavirus-Directed Synthesis and Assembly of Metallic Nanoparticle Arrays,”** *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2013, 13: 5572–5579.
- [3] H. Zhang, J. Shih, J. Zhu, and N. A. Kotov, **“Layered nanocomposites from gold nanoparticles for neural prosthetic devices”** *Nano Lett.* 2012, 12: 3391–8.
- [4] J. Lepault, I. Petitpas, I. Erk, and J. Navaza, **“Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus”** *EMBO J* 2001, 20: 1498-1507.
- [5] G. Plascencia-Villa, J. M. Saniger, J. a Ascencio, L. A. Palomares, and O. T. Ramírez, **“Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals.,”** *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 104: 871–81.
- [6] G. Plascencia-Villa, J. A. Mena, R. M. Castro-Acosta, J. C. Fabián, O. T. Ramírez, and L. A. Palomares, **“Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials.,”** *J. Chromatogr. B.* 2011, 879: 1105–11.
- [7] M. Rodríguez, C. Wood, R. Sanchez-López, R. M. Castro-Acosta, O. T. Ramírez, and L. A. Palomares, **“Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine.,”** *Arch. Virol.* 2013, 159: 1005–1015,
- [8] G. Plascencia-Villa, L. Carreño-Fuentes, D. Bahena, M. José-Yacamán, L. A. Palomares, and O. T. Ramírez, **“Characterization of conductive nanobiomaterials derived from viral assemblies by low-voltage STEM imaging and Raman scattering.,”** *IOP Nanotechnology* 2014, 25:1-11.
- [9] A. Tooker, E. Meng, J. Erickson, Y. Tai and J. Pine, **“Biocompatible Parylene Neurocages,”** *IEEE* 2005, 739: 30–33..
- [10] L. Kam, W. Shain, J. N. Turner, and R. Bizios, **“Axonal outgrowth of hippocampal neurons on micro-scale networks of polylysine-conjugated laminin,”** *Biomaterials* 2001, 22: 1049–1054.
- [11] A. Hai, J. Shappir, and M. E. Spira, **“In-cell recordings by extracellular microelectrodes.,”** *Nat. Methods* 2010, 7: 200–203.

-
-
- [12] A. Hai, J. Shappir, and M. E. Spira, **“Long-term, multisite, parallel, in-cell recording and stimulation by an array of extracellular microelectrodes.”** *J. Neurophysiol.* 2010, 104: 559–568.
- [13] M. Yu, Y. Huang, J. Ballweg, H. Shin, M. Huang, and D. E. Savage, **“Semiconductor Nanomembrane Tubes: Three-Dimensional Confinement for Controlled Neurite,”** *ACSNan* 2011, 5: 2447–2457.
- [14] X. Xie, A. M. Xu, M. R. Angle, N. Tayebi, P. Verma, and N. a Melosh, **“Mechanical model of vertical nanowire cell penetration,”** *Nano Lett.* 2013, 13: 6002–6008.
- [15] S. Bonde, T. Berthing, M. H. Madsen, T. K. Andersen, N. Buch-Månson, L. Guo, X. Li, F. Badique, K. Anselme, J. Nygård, and K. L. Martinez, **“Tuning InAs nanowire density for HEK293 cell viability, adhesion, and morphology: perspectives for nanowire-based biosensors,”** *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013, 5: 10510–10519.
- [16] P. Fattahi, G. Yang, G. Kim, and M. R. Abidian, **“A review of organic and inorganic biomaterials for neural interfaces,”** *Adv. Mater.* 2014, 26: 846–885.
- [17] M. HajjHassan, V. Chodavarapu, and S. Musallam, **“NeuroMEMS: Neural Probe Microtechnologies,”** *Sensors* 2008, 8: 6704–6726.
- [18] N. a. Kotov, J. O. Winter, I. P. Clements, E. Jan, B. P. Timko, S. Campidelli, S. Pathak, A. Mazzatenta, C. M. Lieber, M. Prato, R. V. Bellamkonda, G. A. Silva, N. W. S. Kam, F. Patolsky, and L. Ballerini, **“Nanomaterials for Neural Interfaces,”** *Adv. Mater.* 2009, 21: 3970–4004.
- [19] S. Zhang, **“Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly,”** *Nat. Biotechnol.* 2003, 21: 1171–1178.
- [20] P. Zhao, N. Li, and D. Astruc, **“State of the art in gold nanoparticle synthesis,”** *Coord. Chem. Revi.* 2013, 257: 638–665.
- [21] S. K. Sohaebuddin, P. T. Thevenot, D. Baker, J. W. Eaton, and L. Tang, **“Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent,”** *Part. Fibre Toxicol.* 2010, 7: 22
- [22] H. Gao, **“Probing mechanical principles of cell–nanomaterial interactions,”** *J. Mech. Phys. Solids* 2014, 62: 312–339
- [23] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, and M. Thompson, **“Understanding**

biophysicochemical interactions at the nano-bio interface.,” *Nat. Mater.* 2009, 8: 543–557.

- [24] R. S. Kane and A. D. Stroock, **“Nanobiotechnology: Protein - Nanomaterial Interactions,”** *Biotech.Prog.* 2007, 23: 316–319.
- [25] A. Albanese, P. S. Tang, and W. C. W. Chan, **“The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems.,”** *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2012, 14: 1–16.
- [26] M. E. Spira and A. Hai, **“Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology.,”** *Nat. Nanotechnol.* 2013, 8: 83–94.
- [27] S. Jain, A. Sharma, and B. Basu, **“Vertical electric field stimulated neural cell functionality on porous amorphous carbon electrodes.,”** *Biomaterials* 2013, 34: 9252–9263.
- [28] I. I. Bobrinetskiy, A. S. Seleznev, I. A. Gayduchenko, G. E. Fedorov, A. G. Domantovskiy, M. Y. Presnyakov, R. Y. Podchernyaeva, G. R. Mikhailova, and I. A. Suetina, **“The interaction between nerve cells and carbon nanotube networks made by CVD process investigation,”** *Biophysics (Oxf).* 2013, 58: 409–414.
- [29] L. Bareket-Keren and Y. Hanein, **“Carbon nanotube-based multi electrode arrays for neuronal interfacing: progress and prospects.,”** *Front. Neural Circuits* 2012, 6: 122-138.
- [30] R. F. Vreeland, C. W. Atcherley, W. S. Russell, J. Y. Xie, D. Lu, N. D. Laude, F. Porreca, and M. L. Heien, **“Biocompatible PEDOT:Nafion composite electrode coatings for selective detection of neurotransmitters in vivo.,”** *Anal. Chem.* 2015, 87: 2600–2607.
- [31] P. Hashemi, P. L. Walsh, T. S. Guillot, J. Gras-Najjar, P. Takmakov, F. T. Crews, and R. M. Wightman, **“Chronically Implanted, Nafion-Coated Ag/AgCl Reference Electrodes for Neurochemical Applications.,”** *ACS Chem. Neurosci.* 2011, 2: 658–666.
- [32] J. M. Slocik, S. N. Kim, T. A. Whitehead, D. S. Clark, and R. R. Naik, **“Biotemplated metal nanowires using hyperthermophilic protein filaments.,”** *Small* 2009, 5: 2038–2042.
- [33] Y. Loo, S. Zhang, and C. A. E. Hauser, **“From short peptides to nanofibers to macromolecular assemblies in biomedicine.,”** *Biotechnol. Adv.* 2012, 30: 593–603.

-
-
- [34] A. Lakshmanan, S. Zhang, and C. A. E. Hauser, "**Short self-assembling peptides as building blocks for modern nanodevices.**," *Trends Biotechnol.* 2012, 30: 155–165.
- [35] M. B. Taskin, L. Sasso, M. Dimaki, W. E. Svendsen, and J. Castillo-leo, "**Combined Cell Culture-Biosensing Platform Using Vertically Aligned Patterned Peptide Nano fibers for Cellular Studies,**" *ACS App. Mater. Interfaces.* 2013, 5: 3323-3328.
- [36] W. Putzbach and N. J. Ronkainen, "**Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review.**," *Sensors (Basel).* 2013, 13: 4811–4840.
- [37] J.-O. Baek, J.-W. Seo, I.-H. Kim, and C. H. Kim, "**Production and purification of human papillomavirus type 33 L1 virus-like particles from *Spodoptera frugiperda* 9 cells using two-step column chromatography.**," *Protein Expr. Purif.* 2011, 75: 211–217.
- [38] R. L. Ward and M. M. McNeal, "**VP6: A candidate rotavirus vaccine.**," *J. Infect. Dis.* 2010, 202: S101–S107.
- [39] W. A. Rodríguez-Limas, K. E. J. Tyo, J. Nielsen, O. T. Ramírez, and L. A. Palomares, "**Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*.**," *Microb. Cell Fact.* 2011, 10: 33.
- [40] L. Carreño-Fuentes, J. A. Ascencio, A. Medina, S. Aguila, L. A. Palomares, and O. T. Ramírez, "**Strategies for specifically directing metal functionalization of protein nanotubes: constructing protein coated silver nanowires.**," *IOP Nanotechnology* 2013, 24: 235602-8.
- [41] Z. Li, M. L. Baker, W. Jiang, M. K. Estes, and B. V. V. Prasad, "**Rotavirus architecture at subnanometer resolution.**," *J. Virol.* 2009, 83: 1754–1766.
- [42] I. Petitpas, J. Lepault, P. Vachette, M. Mathieu, E. Kohli, J. Cohen, F. A. Rey, A. Charpilienne, and P. Pothier, "**Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of Rotavirus Protein VP6**" *J. Virol.* 1998, 72: 7615-7619.
- [43] S. E. Crawford, M. Labbé, J. Cohen, M. H. Burroughs, Y. J. Zhou, and M. K. Estes, "**Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells.**," *J. Virol.* 1994, 68: 5945–5952.
- [44] M. Mathieu, I. Petitpas, J. Navaza, J. Lepault, E. Kohli, P. Pothier, B. V. V. Prasad, J. Cohen, and F. A. Rey, "**Atomic structure of the major capsid**

protein of rotavirus : implications for the architecture of the virion,” *The EMBO J.* 2001, 20: 1485-1497.

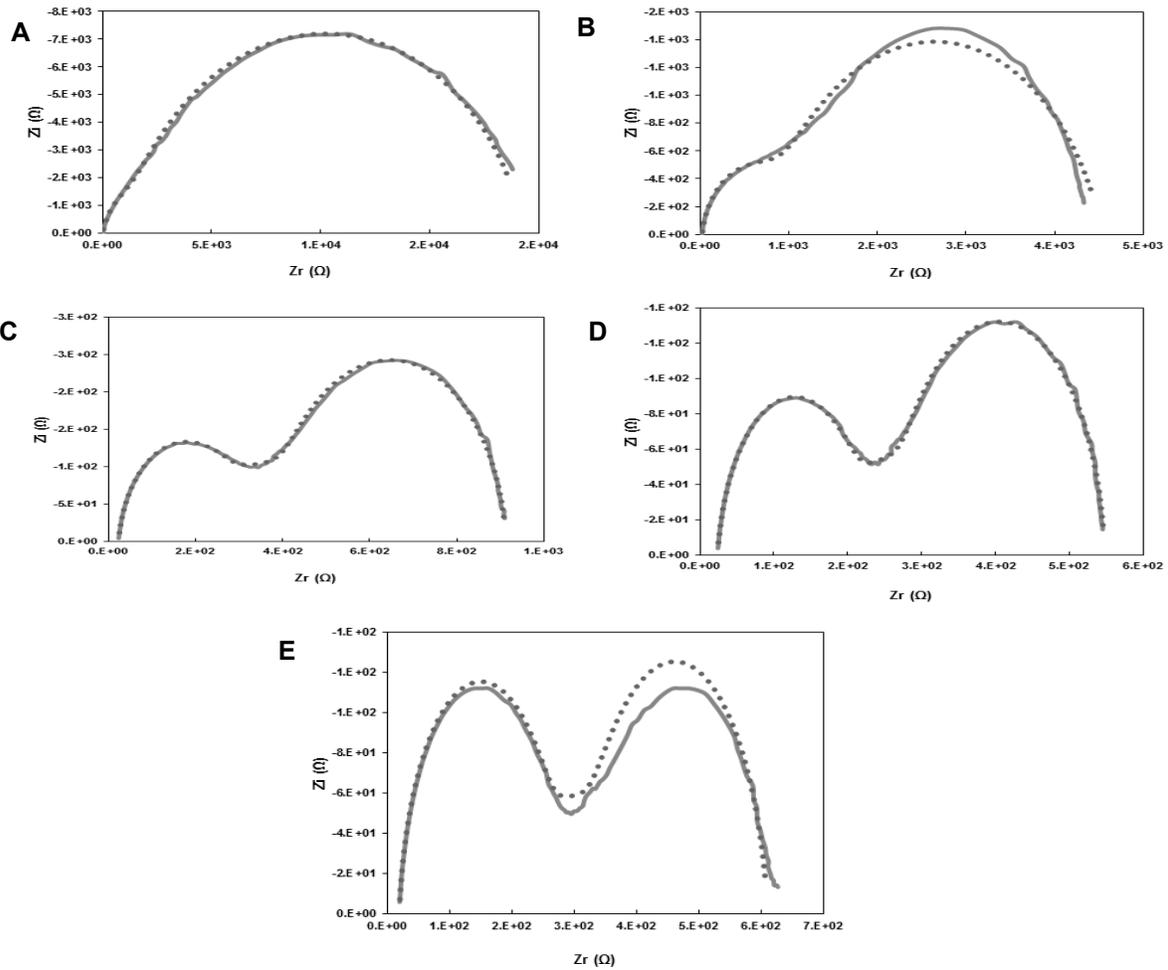
- [45] G. Plascencia-villa, L. A. Palomares, and T. Ramírez, **“Síntesis y Ensamblaje de Nanomateriales Usando Proteínas Virales Como Templados,”** *BioTecnol.* 2011,15: 50–77.
- [46] Carreño-Fuentes 2014. **“Funcionalización dirigida y localizada de nanotubos de VP6 de rotavirus”.** Tesis Doctorado Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología 2014, 127.
- [47] C. M. Mayer, L. J. Fick, S. Gingerich, and D. D. Belsham, **“Hypothalamic cell lines to investigate neuroendocrine control mechanisms.,”** *Front. Neuroendocrinol.* 2009, 30: 405–423.
- [48] K. T. LePage, R. W. Dickey, W. H. Gerwick, E. L. Jester, and T. F. Murray, **“On the Use of Neuro-2a Neuroblastoma Cells Versus Intact Neurons in Primary Culture for Neurotoxicity Studies,”** *Crit. Rev. Neurobiol.* 2005, 17: 27–50.
- [49] Z. Stojek, **“The Electrical Double Layer and Its Structure.”,** *Eleetroanaly. Meth.* 2002, 54: 3-9.
- [50] G. Perenlei, T. W. Tee, N. A. Yusof, and G. J. Kheng, **“Voltammetric Detection of Potassium Ferricyanide Mediated by Multi-walled Carbon Nanotube / Titanium Dioxide Composite Modified Glassy Carbon Electrode,”** *Int. J. Electrochem. Sci.* 2011, 6: 520–531.
- [51] M. H. Pournaghi-Azar, R. Ojani, **“Electrochemistry and electrocatalytic activity of polypyrrole / ferrocyanide films on a glassy carbon electrode,”** *J. Solid State Electrochem.* 2000, 4: 75–79.
- [52] E. P. Randviir and C. E. Banks, **“Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications,”** *Anal. Methods* 2013, 5: 1098-1115.
- [53] J. R. Macdonald, **“Impedance Spectroscopy,”** *Annals of Biomed. Engin.*1992, 20: 289–305.
- [54] S. B. Emery, J. L. Hubble, and D. Roy, **“Time resolved impedance spectroscopy as a probe of electrochemical kinetics: The ferro/ferricyanide redox reaction in the presence of anion adsorption on thin film gold,”** *Electrochim. Acta* 2005, 50: 5659–5672.

-
-
- [55] G. A. Mabbail, "**An Introduction to Cyclic Voltammetry**", *J. of Chem. Educ.* 1983, 60: 697–702.
- [56] P. T. Kissinger, W. Lafayette, and W. R. Heineman, "**Cyclic voltammetry**," *J. of Chem. Educ.* 1983, 60: 702–706.
- [57] H. Zheng, L. Lin, Y. Okezaki, R. Kawakami, H. Sakuraba, T. Ohshima, K. Takagi, and S.-I. Suye, "**Electrochemical behavior of dye-linked L-proline dehydrogenase on glassy carbon electrodes modified by multi-walled carbon nanotubes.**," *Beilstein J. Nanotechnol.* 2010, 1: 135–141.
- [58] A. Mena, and O. T. Ramírez, and L. A. Palomares, "**Titration of Non-Occcluded Baculovirus Using a Cell Viability Assay**," *BioTechniques* 2003, 34: 268–270.
- [59] J. a Mena, O. T. Ramírez, and L. A. Palomares, "**Population kinetics during simultaneous infection of insect cells with two different recombinant baculoviruses for the production of rotavirus-like particles.**," *BMC Biotechnol.* 2007, 7: 39.
- [60] J. A. Mena, "**Desarrollo de estrategias racionales de producción de pseudo-partículas virales en el sistema células de insecto-baculovirus.**", *Tesis Doctorado Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología* 2007, 145 p.
- [61] P. Aggarwal and M. A. Dobrovolskaia, "**Gold Nanoparticle Quantitation via Fluorescence in Solution and Cell Culture**," *Meth. in Molec. Biolog.* 2011, 697: 137–143.
- [62] Y. F. Ujita, I. M. Ori, and T. M. Atsuo, "**Spectrophotometric Determination of Gold (III) by an Association Complex Formation between Gold-Thiamine and Phloxine**," *Analy. Scien.* 1999, 15: 1009-1012.
- [63] M. A. Izquierdo-Gil, V. M. Barragán, J. P. G. Villaluenga, and M. P. Godino, "**Water uptake and salt transport through Nafion cation-exchange membranes with different thicknesses**," *Chem. Eng. Sci.* 2012, 72: 1–9.
- [64] P. Capellq, B. Ghasemzadeh, K. Mitchell, and N. Adams, "**Nafion-Coated Carbon Fiber Electrodes for Neurochemical Studies in Brain Tissue**," *Electroanalysis* 1990, 2:175–182.
- [65] Y. Park, S. Kim, I. H. Jang, Y. S. Nam, H. Hong, D. Choi, and W. G. Lee, "**Role of the electric field in selective ion filtration in nanostructures.**," *Analyst* 2016, 141: 1294-1300.

-
-
- [66] S. Vijayakumar and S. Ganesan, "***In Vitro Cytotoxicity Assay on Gold Nanoparticles with Different Stabilizing Agents,***" *J. Nanomater.* 2012, 2012: 9.
- [67] C. F. Shen, J. Meghrou, and A. Kamen, "***Quantitation of baculo virus particles by flow cytometry,***" *J. Viro. Meth.* 2002, 105: 321-330.
- [68] N. S. Neghmouche and T. Lanez, "***Calculation of Diffusion Coefficients and Layer Thickness for Oxidation the Ferrocene using Voltammetry Technique,***" *Inter. J. of Chem. Stud.* 2013, 1: 28–32, 2013.
- [69] F. Xu, M. Kameche, and C. Innocent, "***Transport of Ions and Solvent Through a Nafion Membrane Modified with Polypyrrole,***" *J. of Membra. Separa. Techn.* 2012, 1: 108–116.
- [70] A. A. Arrocha and M. Miranda-Hernández, "***Optimized MWCNT film electrodes for chemical and biochemical applications,***" *Carbon, submitted article,* CARBON-D-15-03373
- [71] E. M. Boon, D. M. Ceres, T. G. Drummond, M. G. Hill, and J. K. Barton, "***Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes,***" *Nature America Inc* 2000, 18: 1096-1100.
- [72] K. Bradley, M. Briman, A. Star, and G. Gru, "***Charge Transfer from Adsorbed Proteins,***" *NanoLetter* 2004, 4: 253-256.
- [73] M. Shim, A. Javey, N. W. Shi Kam, and H. Dai, "***Polymer Functionalization for Air-Stable n-Type Carbon Nanotube Field-Effect Transistors,***" *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123: 11512–11513.
- [74] M. Waleed Shinwari, M. Jamal Deen, E. B. Starikov, and G. Cuniberti, "***Electrical Conductance in Biological Molecules,***" *Adv. Funct. Mater.* 2010, 20: 1865–1883.
- [75] J. Kong and H. Dai, "***Full and Modulated Chemical Gating of Individual Carbon Nanotubes by Organic Amine Compounds,***" *J. Phys. Chem. B.* 2001, 105: 2890–2893.
- [76] S. Aota and M. Nomizu, "***The Short Amino Acid Sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in Human Fibronectin Enhances Cell-adhesive Function,***" *J. Biolo. Chem.* 1994, 269: 24756–24761.
- [77] Y. Loo, A. Lakshmanan, M. Ni, L. L. Toh, S. Wang, and C. A. E. Hauser, "***Peptide Bioink: Self-Assembling Nanofibrous Scaffolds for Three-Dimensional Organotypic Cultures,***" *Nano Lett.* 2015, 15: 6919–6925.

-
-
- [78] M. E. Evangelopoulos, J. Weis, and A. Krüttgen, "**Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR.**," *Oncogene* 2005, 24: 3309–3318.
- [79] R. M. Castro-Acosta, W. A. Rodríguez-Limas, B. Valderrama, O. T. Ramírez, and L. A. Palomares, "**Effect of metal catalyzed oxidation in recombinant viral protein assemblies.**," *Microb. Cell Fact.* 2014, 13: 25.
- [80] U. S. Schwarz and I. B. Bischofs, "**Physical determinants of cell organization in soft media.**," *Med. Eng. Phys.* 2005, 27: 763–772.
- [81] D. Vega and D. Boettiger, "**Modulation of Cell Proliferation and Differentiation through Substrate-dependent Changes in Fibronectin.**," *Mole. Biol. of the Cell* 1999, 10: 785–798, 1999.
- [82] R. M. Smeal and P. A. Tresco, "**The influence of substrate curvature on neurite outgrowth is cell type dependent.**," *Exp. Neurol.* 2008, 213: 281–292.

Apéndice

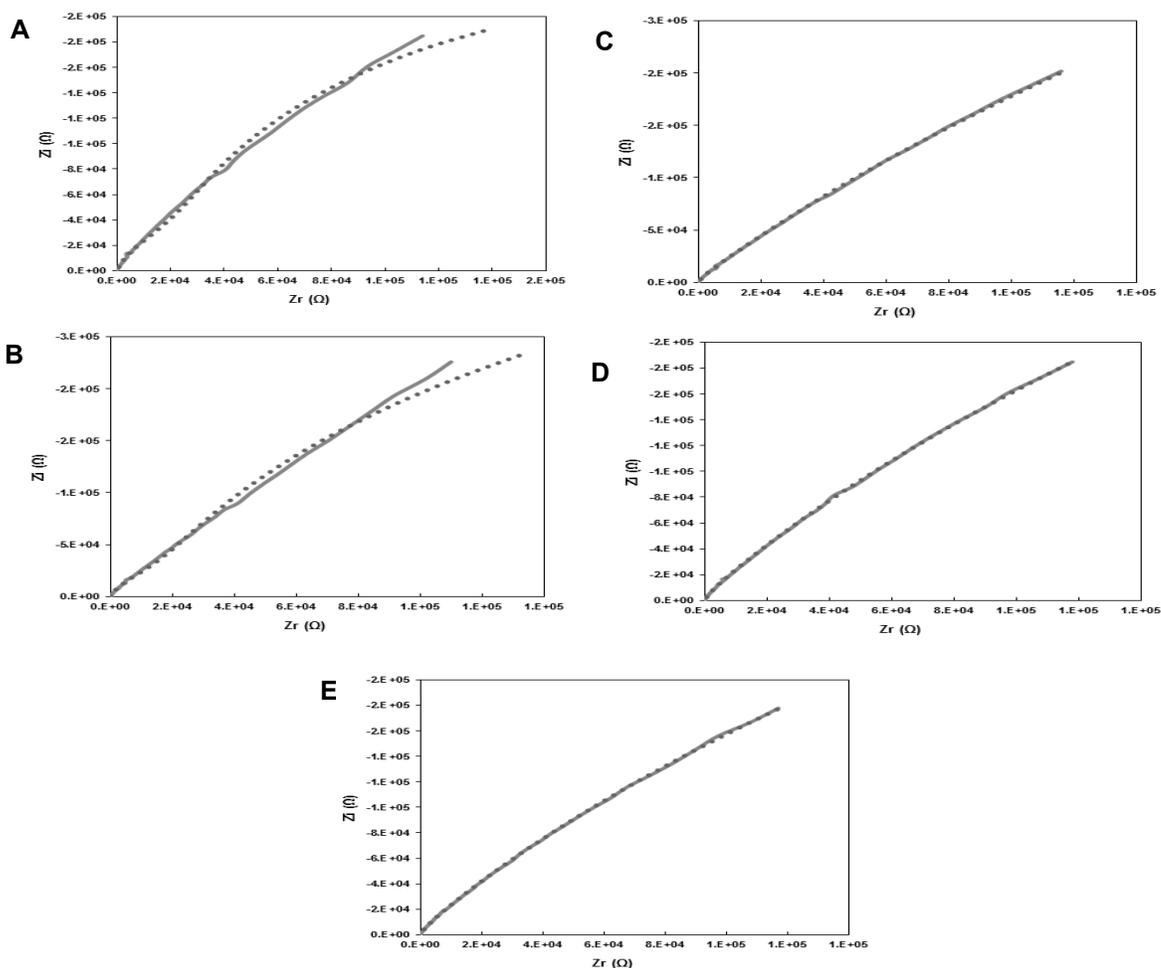


F

Electrodo de carbón vítreo							
Potencial analizado (mV)	Circuito equivalente	Resistencia de la solución (Rs) en Ω	SD de Rs (%)	Capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) en F	SD de Cdl (%)	Resistencia a la transferencia de carga (Rtc) en Ω	SD de Rtc (%)
OCP	R(RQ)(RQ)	2.08E+01	0.83	5.97E-06	4.74	1.80E+04	1.58
285	R(RQ)(RQC)	2.25E+01	0.94	3.75E-06	8.56	3.67E+03	2.07
230	R(RQ)(C[R(RQ)])	2.34E+01	0.27	2.75E-06	1.56	1.54E+02	2.25
203		2.37E+01	0.25	2.72E-06	1.6	8.26E+01	2.54
185		1.96E+01	0.95	1.44E-06	4.43	8.25E+01	8.45

Figura 50: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para carbón vítreo a diferentes potenciales.

Se presenta diagrama de Nyquist y los resultados obtenidos. Línea sólida corresponde a los datos experimentales. Línea discontinua resultados del ajuste. **A)** OCP. **B)** 285 mV. **C)** 230 mV. **D)** 203 mV. **E)** 185 mV. **F)** Parámetros eléctricos obtenidos del ajuste por circuito equivalente.

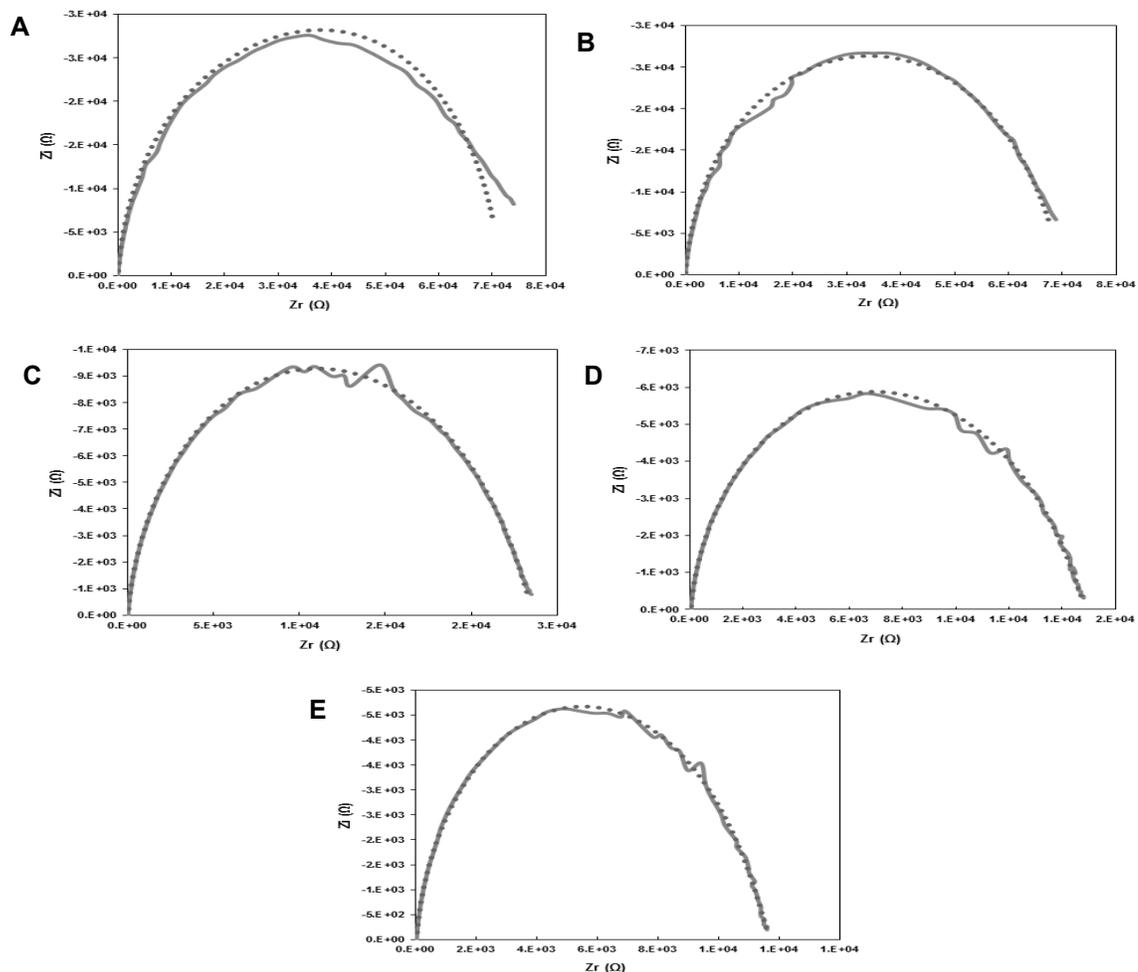


F

Electrodo de nafion 0.2%							
Potencial analizado (mV)	Circuito equivalente	Resistencia de la solución (Rs) en Ω	SD de Rs (%)	Capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) en F	SD de Cdl (%)	Resistencia a la transferencia de carga (Rtc) en Ω	SD de Rtc (%)
OCP	R(RQ)(RC)	2.52E+01	1.28	6.49E-06	2.36	4.26E+05	4.8
285	R(RQ)(RQ)	2.65E+01	1.04	7.56E-06	7.18	8.62E+05	15.95
230	R(RQ)(RQC)	2.79E+01	0.71	4.18E-05	34.92	2.58E+06	26.96
203		2.82E+01	0.86	5.82E-05	58.31	1.87E+06	23.18
185		2.86E+01	0.62	5.62E-05	41.58	1.70E+06	15.87

Figura 51: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de nafion 0.2% a diferentes potenciales.

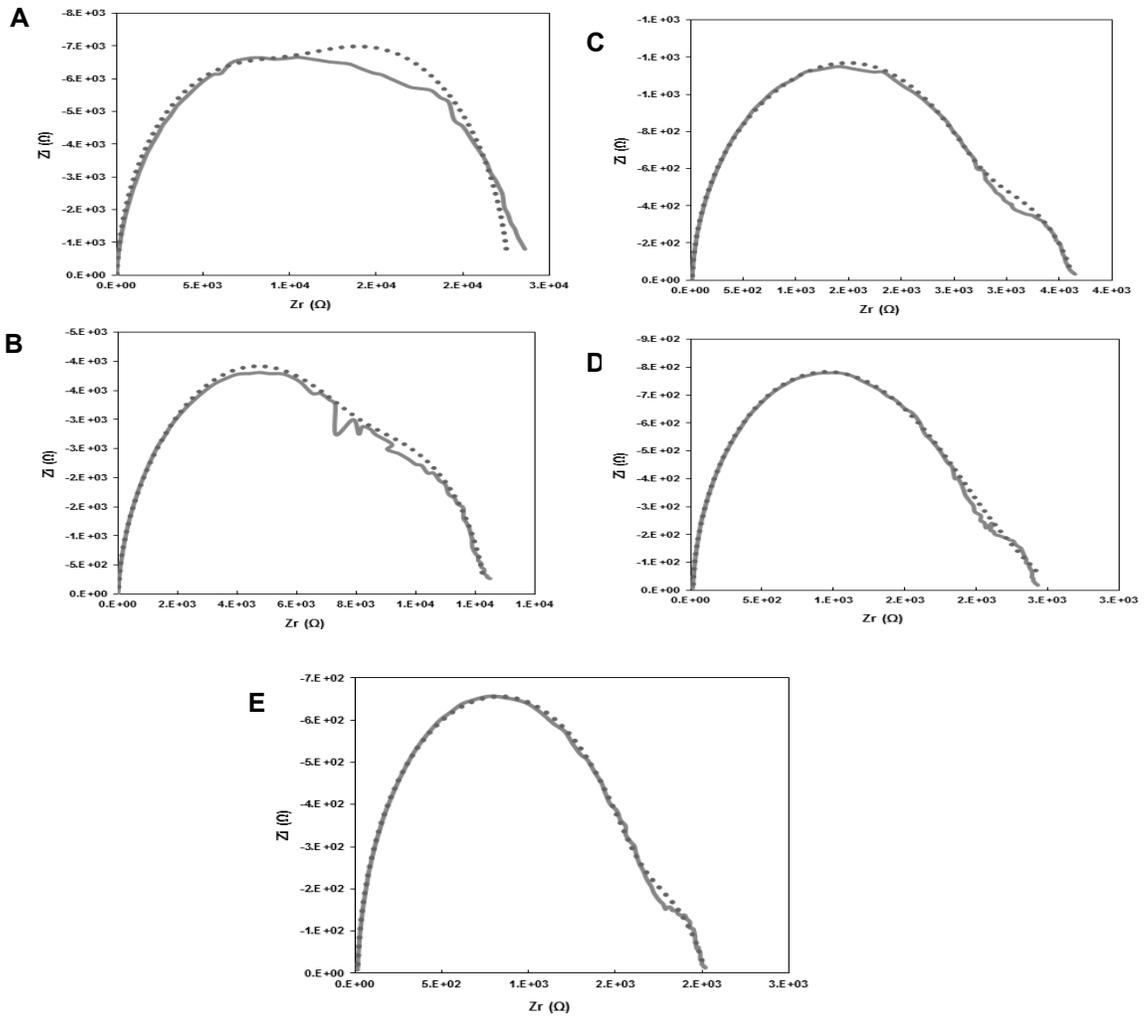
Se presenta diagrama de Nyquist y los resultados obtenidos. Línea sólida corresponde a los datos experimentales. Línea discontinua resultados del ajuste. **A)** OCP. **B)** 285 mV. **C)** 230 mV. **D)** 203 mV. **E)** 185 mV. **F)** Parámetros eléctricos obtenidos del ajuste por circuito equivalente.



Electrodo de nafion 0.05%							
Potencial analizado (mV)	Circuito equivalente	Resistencia de la solución (Rs) en Ω	SD de Rs (%)	Capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) en F	SD de Cdl (%)	Resistencia a la transferencia de carga (Rtc) en Ω	SD de Rtc (%)
OCP	R(RQ)(RQ)	4.40E+01	0.71	2.41E-06	24.63	4.61E+04	32.12
285	R(RQ)(RQC)	4.65E+01	1.6	3.02E-06	62.23	5.72E+04	40.93
230		4.76E+01	0.42	2.84E-06	16.7	1.42E+04	9.83
203		4.84E+01	0.38	2.34E-06	11.48	7.75E+03	8.78
185		4.91E+01	0.34	2.57E-06	19.4	6.01E+03	13.78

Figura 52: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de nafion 0.05% a diferentes potenciales.

Se presenta diagrama de Nyquist y los resultados obtenidos. Línea sólida corresponde a los datos experimentales. Línea discontinua resultados del ajuste. **A)** OCP. **B)** 285 mV. **C)** 230 mV. **D)** 203 mV. **E)** 185 mV. **F)** Parámetros eléctricos obtenidos del ajuste por circuito equivalente.

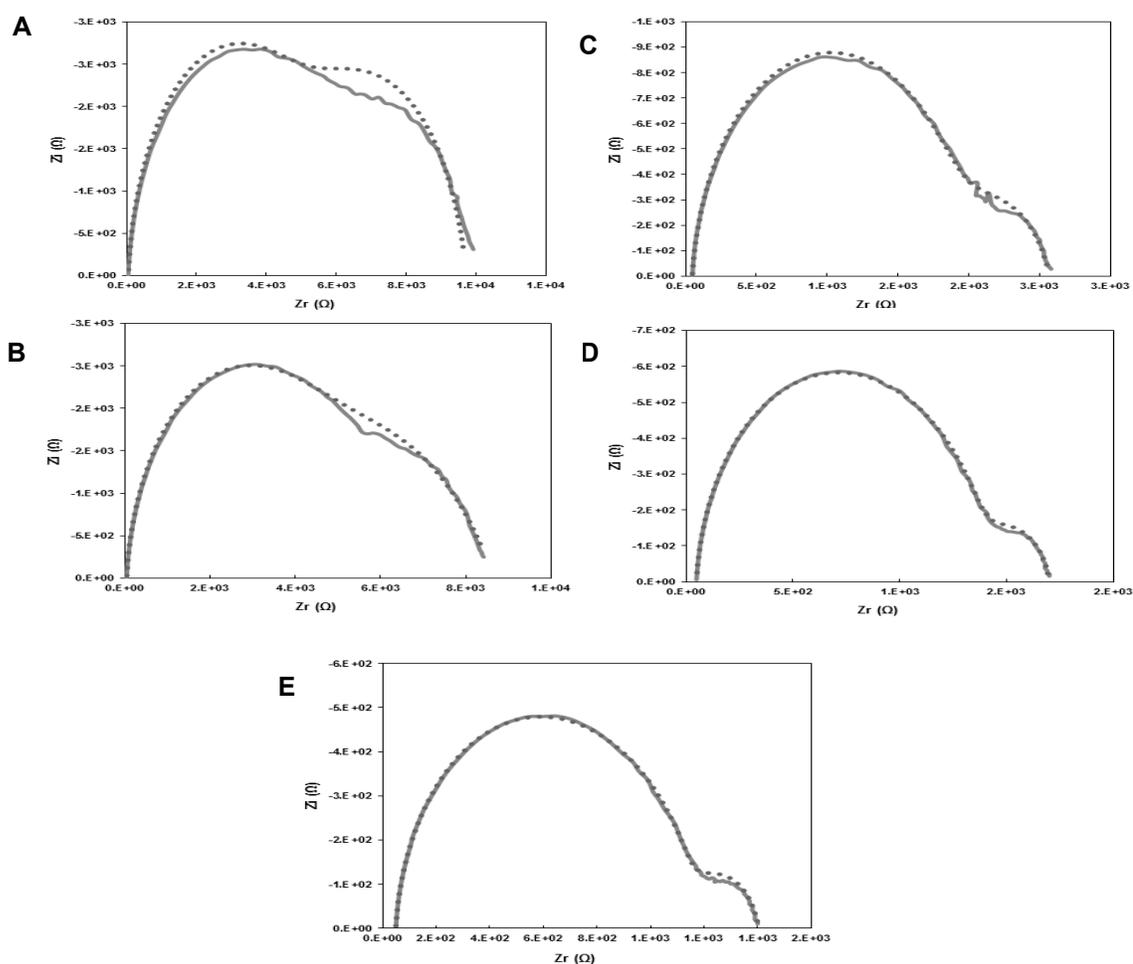


F Electrodo de nanotubos de VP6 con nafion 0.2%

Potencial analizado (mV)	Circuito equivalente	Resistencia de la solución (Rs) en Ω	SD de Rs (%)	Capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) en F	SD de Cdl (%)	Resistencia a la transferencia de carga (Rtc) en Ω	SD de Rtc (%)
OCP	R(RQ)(RQ)	1.47E+01	1.47	1.09E-06	2.17	1.28E+04	9.42
285	R(RQ)(C[R(RQ)])	1.53E+01	0.74	2.07E-06	8.6	6.95E+03	1.73
230	R(RQ)(C[R(RQ)])	1.54E+01	0.68	1.18E-06	6.32	1.74E+03	3.98
203	R(RQ)(RQC)	1.53E+01	0.67	2.05E-06	12.74	9.29E+02	5.25
185	R(RQ)(Q[R(RQ)])	1.53E+01	0.73	1.86E-06	14.46	8.88E+02	56.31

Figura 53: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de VP6 nafion 0.2% a diferentes potenciales.

Se presenta diagrama de Nyquist y los resultados obtenidos. Línea sólida corresponde a los datos experimentales. Línea discontinua resultados del ajuste. **A)** OCP. **B)** 285 mV. **C)** 230 mV. **D)** 203 mV. **E)** 185 mV. **F)** Parámetros eléctricos obtenidos del ajuste por circuito equivalente.

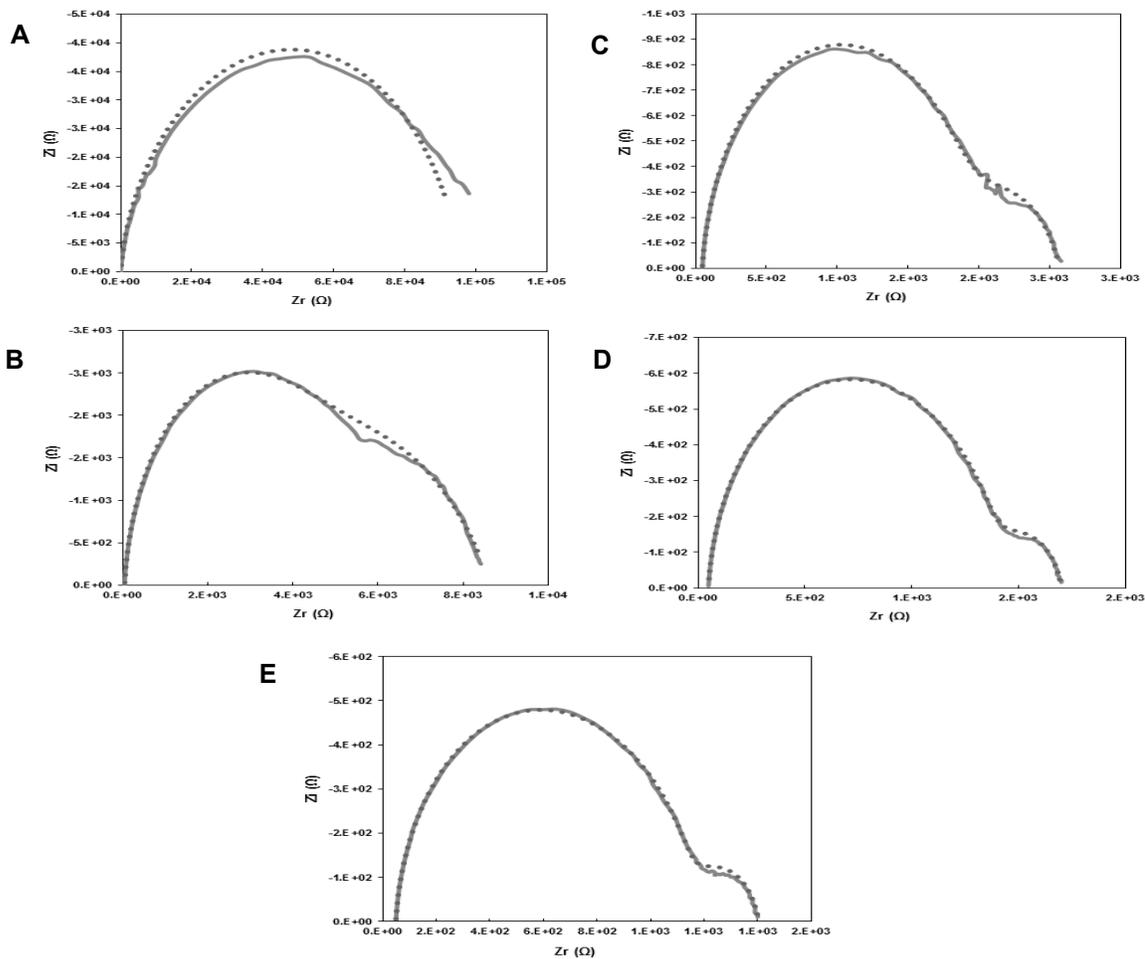


F Electrodo de nanotubos de VP6 con nafion 0.05%

Potencial analizado (mV)	Circuito equivalente	Resistencia de la solución (Rs) en Ω	SD de Rs (%)	Capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) en F	SD de Cdl (%)	Resistencia a la transferencia de carga (Rtc) en Ω	SD de Rtc (%)
OCP	R(RQ)(RQC)	4.02E+01	4.31	1.63E-06	15	5.07E+03	31.35
285		4.69E+01	0.57	1.49E-06	2.32	4.45E+03	7.14
230	R(RQ)(RQ)	4.73E+01	0.37	1.32E-06	1.72	6.63E+02	5.19
203	R(RQ)(C[R(RQ)])	4.84E+01	0.2	1.32E-06	2.07	3.01E+02	11.7
185		4.91E+01	0.18	1.27E-06	1.33	2.07E+02	10.27

Figura 54: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de VP6 nafion 0.05% a diferentes potenciales.

Se presenta diagrama de Nyquist y los resultados obtenidos. Línea sólida corresponde a los datos experimentales. Línea discontinua resultados del ajuste. **A)** OCP. **B)** 285 mV. **C)** 230 mV. **D)** 203 mV. **E)** 185 mV. **F)** Parámetros eléctricos obtenidos del ajuste por circuito equivalente.

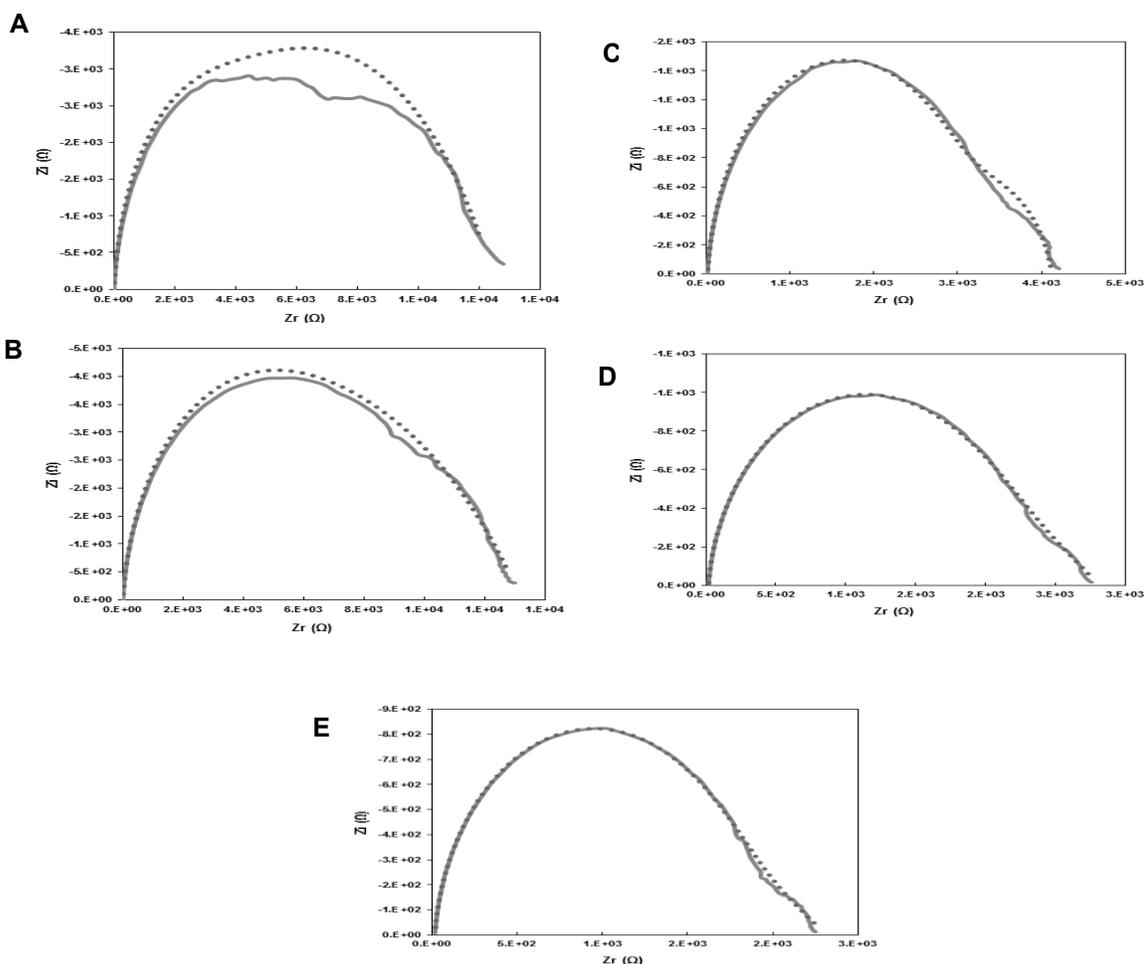


F Electrodo de nanotubos de VP6 funcionalizados con oro, nafion 0.2%

Potencial analizado (mV)	Circuito equivalente	Resistencia de la solución (Rs) en Ω	SD de Rs (%)	Capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) en F	SD de Cdl (%)	Resistencia a la transferencia de carga (Rtc) en Ω	SD de Rtc (%)
OCP	R(RQ)(RQC)	1.67E+01	1.33	7.85E-06	50.74	8.50E+04	7.36
285		1.70E+01	3.11	4.08E-06	132.6	5.16E+04	68.53
230		1.67E+01	0.67	3.66E-06	14.61	6.68E+03	19.56
203		1.68E+01	0.74	4.12E-06	15.6	4.72E+03	24.29
185		1.69E+01	0.77	4.26E-06	19.38	4.34E+03	30.4

Figura 55: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de NT Au nafion 0.2% a diferentes potenciales.

Se presenta diagrama de Nyquist y los resultados obtenidos. Línea sólida corresponde a los datos experimentales. Línea discontinua resultados del ajuste. **A)** OCP. **B)** 285 mV. **C)** 230 mV. **D)** 203 mV. **E)** 185 mV. **F)** Parámetros eléctricos obtenidos del ajuste por circuito equivalente.



F Electrodo de nanotubos de VP6 funcionalizados con oro, nafion 0.05%

Potencial analizado (mV)	Circuito equivalente	Resistencia de la solución (Rs) en Ω	SD de Rs (%)	Capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) en F	SD de Cdl (%)	Resistencia a la transferencia de carga (Rtc) en Ω	SD de Rtc (%)
OCP	R(RQ)(RQ)	1.82E+01	1.85	1.46E-06	4.76	6.93E+03	9.87
285	R(RQ)(RQC)	1.92E+01	1.11	1.71E-06	11.18	8.93E+03	4.82
230	R(RQ)(RQ)	1.85E+01	0.87	1.07E-06	2.37	1.07E+03	9.97
203	R(RQ)(RQC)	1.94E+01	0.68	1.24E-06	5.73	1.29E+03	4.77
185		1.95E+01	0.71	1.19E-06	5.85	9.77E+02	5.22

Figura 56: Ajuste no lineal por circuito equivalente de EIS para película de NT Au nafion 0.05% a diferentes potenciales.

Se presenta diagrama de Nyquist y los resultados obtenidos. Línea sólida corresponde a los datos experimentales. Línea discontinua resultados del ajuste. **A)** OCP. **B)** 285 mV. **C)** 230 mV. **D)** 203 mV. **E)** 185 mV. **F)** Parámetros eléctricos obtenidos del ajuste por circuito equivalente.