



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Posgrado en Ciencias Biomédicas**  
**Instituto De Fisiología Celular**

**“Obtención de biomateriales a partir del virus  
filamentoso fd”**

**TESIS**

**Que para optar por el grado de:  
Doctora en Ciencias Biomédicas**

**PRESENTA:**

**QBP Danaí Montalván Sorrosa**

**Tutor:**

**Dr. Rolando Castillo Caballero**  
**Instituto de Física, UNAM**

**Comité Tutor:**

**Dr. Jaime Mas Oliva**  
**Instituto de Fisiología Celular,**  
**UNAM**

**Dr. Abel Moreno Cárcamo**  
**Instituto de Química,**  
**UNAM**

**Ciudad de México, abril del 2016**

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Rolando Castillo Instituto de Física de la UNAM y del Dr. Jaime Mas Oliva del Instituto de Fisiología Celular.

Agradezco las facilidades que el Dr. Raúl Herrera proporcionó para realizar parte de los análisis en el laboratorio de Materiales Avanzados del Instituto de Física de la UNAM.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, Dr. Rolando castillo, Dr. Jaime Mas Oliva y Dr. Abel Moreno, por haberme guiado a lo largo de mis estudios y mostrarme el camino que debe seguir quien desea convertirse en un buen científico.

Asimismo, agradezco a los miembros del jurado, Dr. Abel Moreno, Dr. Roberto Arreguín, Dra. Beatriz Gómez, Dra. Bertha González y Dra. Laura Palomares, por el tiempo que dedicaron a la revisión de esta tesis y cuyas observaciones enriquecieron este trabajo.

Doy un agradecimiento especial a la M. en C. Blanca Delgado, al Esp. Rodolfo Paredes, al M. en C. Salvador Ramos y a la M. en C. Cristina Zorrilla, pues esta tesis fue posible también gracias a todo lo que me enseñaron y al apoyo que siempre estuvieron dispuestos a darme.

# AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría sido posible sin el invaluable apoyo brindado por el personal académico y administrativo que a continuación se mencionan.

## Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**M. en C. Blanca Delgado Coello, Sra. Guadalupe García López y Sra. Rosa María Arelio Nápoles**, del Laboratorio de Biomembranas del IFC

**Esp. Rodolfo Paredes**, de la Unidad de Imagenología del IFC

**Lic. Sara Méndez Ibañez**, de la Coordinación de enseñanza

**Lic. Gabriela Valdez Silva** (Dpto. de Genética Molecular) y **Lic. Rosario Villaseñor** (Dpto. de Biología Celular y del Desarrollo)

**Sr. Alfredo Octaviano**, del Dpto. de Genética Molecular del IFC

**Biol. Gerardo Coello Coutiño, Ing. Ivette Rosas Arciniega, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo y Biol. Ana María Escalante Gonzalbo** de la Unidad de Cómputo del IFC

**Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortíz Benavides** del Taller de mantenimiento electrónico, eléctrico y mecánico del IFC

**Nadia Brisa Robles Vidal, Patricia Morales de la Rosa y Maricela Buitrón**, De la Biblioteca Armando Gómez Puyou

## Instituto de Física, UNAM

**M. en C. Cristina Zorrilla Cangas**, del Laboratorio de Materiales Avanzados

**M. en C. Salvador Ramos Solórzano, M. en C. Cristina Garza y Erick Guzmán**, del Laboratorio de Fluidos complejos

**Arq. Diego Quiterio Vargas**, del Laboratorio Central de Microscopía

**M. en I. Hesiquio Vargas y el Ing. Marco A. Veyta Vidaña**, del Taller Central del IFUNAM

**Lic. Lucila Martínez Arellano y Guillermina Moreno Moreno**, de la Biblioteca Juan B. de Oyarzábal

**Lic. María Guadalupe Sánchez Rojas**, de la Coordinación docente del IFUNAM

**Dr. Luciano Antonio Gómez Cortés**, del Dpto. de Física Química del IFUNAM

## Instituto de Ingeniería, UNAM

**Dr. Daniel de los Cobos Vasconcelos**, de la Coordinación de Ingeniería Ambiental del IINGEN

**Lic. Elizabeth Plata García y Lic. Guillermina Sánchez Nahuacatl**, de la Unidad de Servicios de Información (USI), Biblioteca del IINGEN

## Universidad de Guadalajara

**Dr. José Luis González Solís** del Centro Universitario de los Lagos

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Agradecimientos	2
Índice general	2
Índice de tablas	3
Índice de figuras	3
Lista de abreviaturas	5
1. Resumen	6
2. Introducción	7
3. Antecedentes	10
3.1. Bioinspiración	10
3.2. Cristales líquidos	14
3.3. Bioconjugación	16
3.4. Bacteriófagos	19
3.5. Nanopartículas	23
3.6. Raman y SERS	25
3.7. Análisis multivariado: PCA	27
4. Métodos	32
4.1. Obtención del virus fd	32
4.2. Reacciones de bioconjugación con el virus fd	34
4.3. Obtención de bioconjugados virus-AuNP's	36
4.4. Reología	38
4.5. Microscopía electrónica de transmisión	39
4.6. Geles de poliacrilamida	40
4.7. AFM	40
4.8. Cristales líquidos del virus	40
4.9. Potencial zeta	40
4.10. Producción de AuNP's	41
4.11. Preparación de hidrogeles	42
4.12. Crecimiento de células HEPG2 en mezclas de virus modificados	42
4.13. SERS	43
4.14. PCA	43
5. Resultados y discusión	44
5.1. Síntesis de nanopartículas de oro	51
5.2. Reacciones de reducción de los virus	53
5.3. Reacciones de bioconjugación fd-cys	55
5.4. Formación de bionanocompositos fd-AuNP's	57
5.5. Reacciones de bioconjugación: fd- moléculas pequeñas	69
5.6. Hidrogeles y crecimiento celular	76
6. Conclusiones y perspectivas	79
7. Bibliografía	85
8. Apéndices	88
8.1. Apéndice I: Asignación de grupos funcionales de los espectros Raman y PCA	88
8.2. Apéndice II: PCA (Algoritmo en MatLab®)	100
8.3. Apéndice III: Infección, replicación y ensamblaje de los virus filamentosos	102
8.4. Apéndice IV: Artículos publicados y en proceso	105

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	13
Tabla 2	13
Tabla 3	22
Tabla 4	23
Tabla 5	37
Tabla 6	37
Tabla 7	37
Tabla 8	41
Tabla 9	42
Tabla 10	52
<b>Tablas Suplementarias</b>	
Tabla S1	88
Tabla S2	92
Tabla S3	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1	11
Fig. 2	14
Fig. 3	15
Fig. 4	16
Fig. 5	18
Fig. 6	19
Fig. 7	20
Fig. 8	21
Fig. 9	22
Fig. 10	30
Fig. 11	31
Fig. 12	35
Fig. 13	38
Fig. 14	39
Fig. 15	45
Fig. 16	46
Fig. 17	47
Fig. 18	49
Fig. 19	50
Fig. 20	52
Fig. 21	54
Fig. 22	55

Fig. 23	Micrografía del virus fd bioconjugado con cisteína	56
Fig. 24	Virus fd wt unidos a AuNPs. Las partículas se unieron en las puntas de los virus	57
Fig. 25	Formación de bioconjugados entre el virus fd-cys y AuNPs	59
Fig. 26	Estructuras de tipo nanocable formadas entre los virus fd-cys y AuNPs	60
Fig. 27	Micrografías de los virus fd-cys después de ser reducidos con NaBH <sub>4</sub>	61
Fig. 28	Espectro de ultravioleta de suspensiones del virus fd wt, fd-cys y cisteína	63
Fig. 29	Espectros SERS promedio de los virus fd wt, fd-cys, fd-AuNP, y fd-cys-AuNP	64
Fig. 30	Gráficas tridimensionales de los tres componentes principales más importantes	67
Fig. 31	Principales diferencias entre los virus analizados	68
Fig. 32	Reacciones entre el virus fd y a) DETA, b) ITA y c) etilendiamina	70
Fig. 33	Micrografías electrónicas de los virus modificados con ácido itacónico	70
Fig. 34	Micrografías de los virus modificados con dietilentriamina y etilendiamina	71
Fig. 35	Diálisis de tres reacciones entre el virus fd y DETA	72
Fig. 36	Potencial zeta de los virus modificados con EDA, DETA, ITA y el virus fd wt	72
Fig. 37	SDS-PAGE de diferentes muestras de virus: fd wt, fd-EDA, fd-DETA, fd-ITA y fd-cys	73
Fig. 38	Muestras de los virus fd wt, fd-ITA, fd-DETA, fd-EDA mezclados con AuNPs de 40nm	74
Fig. 39	Espectros SERS promedio de los virus fd wt, fd-EDA, fd-DETA y fd-ITA	75
Fig. 40	Gráfica tridimensional de los tres primeros PC's obtenidos mediante PCA	75
Fig. 41	Preparaciones de virus para evaluar el crecimiento de células	76
Fig. 42	Fotografías del crecimiento de células HEPG2 con y sin virus fd (fd wt y fd-ITA)	78

### Figuras Suplementarias

Fig. S1	Primer y Segundo PC's de los espectros de los virus fd-cys-Au y el control negativo	91
Fig. S2	Primero y Segundo PC's de los espectros de los virus fd-cys-Au y el fd-Au	95
Fig. S3	Modelo de los eventos iniciales en la infección del bacteriófago fd a <i>E. coli</i>	102
Fig. S4	Genes y productos de los virus filamentosos f1, M13 y fd	103
Fig. S5	Modelo hipotético de los procesos de ensamblado extrusión de un bacteriófago filamentosos	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **AuNP's:** Nanopartículas de oro
- **DETA:** Dietilentriamina
- **EDA:** Etilendiamina
- **EDC:** Hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
- **fd-cys:** Virus fd modificado con cisteína
- **fd-DETA:** Virus fd modificado con dietilentriamina
- **fd-EDA:** Virus fd modificado con etilendiamina
- **fd-ITA:** Virus fd modificado con ácido itacónico
- **IKAV:** Péptido formado por isoleucina, lisina, valina, alanina y valina
- **ITA:** Ácido Itacónico
- **NHS:** N-hidroxisuccinimida
- **NP's:** Nanopartículas
- **PCA:** Principal Component Analysis (análisis de componentes principales)
- **PC's:** Componentes principales
- **PGA:** Polyglycolic acid (ácido poliglicólico o poliglicolato)
- **PLA:** Polylactic acid (ácido poliláctico o poliácido láctico)
- **PLGA:** Poly lactic-co-glycolic acid (ácido poliláctico-glicólico)
- **RGD:** Péptido de adhesión celular formado por arginina, lisina y ácido aspártico
- **SERS:** Surface Enhanced Raman Spectroscopy (Espectroscopia Raman incrementada por superficie)
- **TMV:** Tobacco Mosaic Virus (Virus del mosaico del tabaco)
- **wt:** Wild type (cepa silvestre)

# 1. RESUMEN

Las macromoléculas biológicas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc., constituyen bloques de construcción prometedores apenas explorados. Estos bloques poseen características interesantes, son fáciles de producir, tienen dimensiones constantes y pueden ser modificados mediante ingeniería genética o mediante reacciones químicas de bioconjugación. Los virus, estructuras supramoleculares conformadas por subunidades proteicas han sido utilizados como moldes para la síntesis de nanoestructuras y sus aplicaciones no están limitadas a la Biología. Nuevas partículas virales han sido diseñadas para permitir la síntesis de nanomateriales por dentro y por fuera de las partículas virales, para acarrear fármacos y marcadores fluorescentes en el organismo, como soporte para la síntesis de baterías de litio más eficientes, e incluso, para permitir el crecimiento celular. El virus fd es un virus de tipo filamentosos que infecta bacterias. Ha sido utilizado como modelo de estudio de coloides y cristales líquidos debido a su naturaleza de bastón semiflexible. El virus M13, prácticamente idéntico al fd, ha sido utilizado como soporte para la nucleación de diferentes materiales y como soporte de crecimiento celular cuando se encuentra como cristal líquido y después de ser modificado genéticamente. El objetivo de este trabajo fue utilizar al virus fd como bloque de construcción de diferentes bionanomateriales: virus decorados con nanopartículas de oro para formar nanocables y virus modificados químicamente para formar hidrogeles para el crecimiento de células.

Para modificar al virus se utilizó una reacción de bioconjugación mediada por carbodiimidas que permite la formación de enlaces de tipo amida. Con esta reacción modificamos las propiedades de superficie del virus al adicionar, moléculas de cisteína para introducir grupos tiol en la superficie, un ácido dicarboxílico pequeño para incrementar las cargas negativas y dos diaminas diferentes para incrementar las cargas positivas. El virus con cisteína se utilizó para la producción de nanocables metalizados, ya que las nanopartículas de oro forman enlaces muy fuertes con los átomos de azufre de los grupos tiol. Por otra parte, los virus con carga diferente fueron mezclados para obtener hidrogeles. Los hidrogeles fueron utilizados para permitir el crecimiento celular y, por lo menos en dos casos, parece haber sido exitoso. Todos los virus que fueron modificados fueron analizados, además de otras técnicas, con SERS y PCA, métodos que enriquecen la caracterización de modificaciones tan pequeñas como las que se realizaron aquí. La variedad de bionanomateriales

que se pueden obtener a partir de estructuras filamentosas como el virus fd, es prácticamente ilimitada, las reacciones de bioconjugación son lo suficientemente versátiles para poder diseñar estructuras supramoleculares con propiedades únicas aplicables a cualquier área de la ciencia.

## 2. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza se pueden apreciar estructuras básicas de construcción. Péptidos y proteínas son solo apenas un par de ejemplos de dichas estructuras. Bajo ciertas condiciones es posible modular el ordenamiento de estos bloques de construcción: algunas proteínas forman estructuras supramoleculares más complejas como las cápsides virales mientras que otras se autoensamblan en fibras que son potencialmente dañinas para las células. Esta capacidad de modulación ha sido aprovechada en la construcción de nanomateriales con propiedades tan únicas que tienen aplicación en muchas disciplinas de la ciencia desde la medicina hasta la informática.

Las estructuras virales son un claro ejemplo de bloques de construcción básicos presentes en la naturaleza. Su estructura y composición de aminoácidos está pre-programada en su propio material genético, por lo que siempre se obtienen partículas idénticas. Esta es una de sus propiedades más atractivas: la monodispersión, es decir, la constancia de tamaño y forma que resulta difícil si no imposible de lograr mediante métodos sintéticos comunes. La variedad de formas que despliegan los virus hasta hoy conocidos es otra propiedad interesante de estas estructuras supramoleculares que se encuentran entre los sistemas bióticos y abióticos. Resaltan dos tipos de estructuras: esféricas y filamentosas siendo las primeras las más abundantes y de las primeras estructuras virales utilizadas como unidad de construcción de nanomateriales. Los virus de tipo filamentosos tienen características en común con estructuras tan lejanas entre sí como los flagelos bacterianos y los filamentos de actina pero que han sido ampliamente estudiados desde el punto de vista de los sistemas coloidales.

Los virus de tipo filamentosos constituyen un tipo de bloque de construcción particular. En suspensión pueden adoptar estructuras de líquido cristalino dependiendo de su concentración y otros factores fisicoquímicos. Asimismo, este fluido formado por bastones semiflexibles, tiene propiedades reológicas útiles para el diseño de matrices tridimensionales. Las propiedades

estructurales de los virus dependen de la información genética que poseen. Es posible introducir nuevos grupos funcionales o cambiar las propiedades de superficie modificando la secuencia de DNA del virus para que exprese algún aminoácido diferente. Sin embargo, las modificaciones que se pueden realizar mediante este camino son limitadas pues la adición o eliminación de algún aminoácido puede impedir el plegamiento correcto de las proteínas que forman la cápside viral e incluso puede eliminar la capacidad infectiva del virus.

La alternativa lógica a la ingeniería genética ha sido la química de bioconjugación, o química biológica en la cual se llevan a cabo reacciones químicas entre supramoléculas biológicas y otras moléculas. Esto ha sido particularmente útil para laboratorios de síntesis orgánica en los que tal vez no se tengan las instalaciones necesarias para llevar a cabo metodologías de biología molecular. Las reacciones de bioconjugación permiten modificar las propiedades de superficie de las supramoléculas aprovechando los grupos funcionales de los aminoácidos de superficie. Las partículas virales pueden adquirir nuevos grupos funcionales, diferente carga e incluso diferentes tamaños simplemente “decorándolas” con moléculas que así lo permitan.

Considerando tanto la versatilidad de los virus como su capacidad de auto ensamblarse y organizarse, el objetivo de este trabajo fue obtener suspensiones del virus fd y nanobiomateriales formados por estas partículas virales. Utilizando al virus como bloque de construcción, nos propusimos obtener estructuras de tipo nanocable y matrices tridimensionales que pudieran ser utilizadas como soporte para cultivo celular *in vitro*, básicamente mediante la introducción de moléculas pequeñas en su superficie. Asimismo, el virus fue utilizado como modelo de suspensiones formadas por estructuras de tipo bastón rígido que nos permitieron estudiar las propiedades reológicas y compararlos con sistemas viscoelásticos como aquellos formados por polímeros y micelas elongadas.

Utilizando reacciones de bioconjugación se obtuvieron nuevos nanomateriales utilizando el virus fd como principal materia prima. Estos nuevos materiales fueron ampliamente caracterizados y se espera poder aplicarlos próximamente en el desarrollo de redes tridimensionales para el crecimiento de células *in vivo*. El virus fd fue modificado químicamente para obtener dos propiedades de superficie distintas: presencia de grupos tiol en abundancia y cambio en la carga neta de la partícula viral. Gracias a los grupos tiol fue posible obtener nanotubos de oro con tan

solo adicionar nanopartículas de este metal a una suspensión de virus modificados. Este es un método sencillo para la obtención de nanocables de oro en comparación con los métodos tradicionales de electrodeposición o de despliegue en virus. Los nanocables de oro pueden ser utilizados como parte de la estructura de materiales más complejos como hidrogeles o como verdaderos cables de conducción eléctrica una vez que el virus es eliminado del nanobioconjugado. Aunque estas aplicaciones no fueron exploradas en este trabajo, constituyen una de las perspectivas más importantes, especialmente la introducción de los nanocables en los hidrogeles que se obtuvieron posteriormente. Se espera que estos nanocables de oro incrementen la señal Raman al estar inmersos en cualquier tipo de cultivo de células, especialmente los que se lleven a cabo en los hidrogeles obtenidos.

Los sistemas celulares interactúan siempre en ambientes tridimensionales formados en una buena parte por estructuras filamentosas de proteínas tales como la actina. Los sistemas tridimensionales para el cultivo de células *in vitro* están formados por polímeros sintéticos o naturales que proporcionen un andamio favorable para la proliferación de las células. Resaltan los hidrogeles, estructuras tridimensionales capaces de absorber grandes cantidades de agua que además proporcionan una estructura de anclaje para las células. Los hidrogeles pueden formarse mediante la interconexión entre polímeros mediante enlaces covalentes o iónicos. Aunque son necesarios otros factores, la simple mezcla de polímeros de diferente carga puede dar como resultado un tipo de hidrogel, denominado también hidrogel físico.

Considerando lo anterior, obtuvimos partículas virales con cargas diferentes a las del virus nativo. Utilizando la metodología de modificación química ya establecida logramos unir covalentemente moléculas pequeñas a la superficie del virus que le proporcionaron cargas positivas o negativas según la molécula. La mezcla de suspensiones de virus con diferente carga dio como resultado hidrogeles que permitieron la proliferación de células. Durante la producción de estos nuevos nanobiomateriales desarrollamos algunos métodos para estudiarlos, particularmente la espectroscopia Raman y el análisis de componentes principales. La espectroscopia Raman permitió comprobar las modificaciones químicas realizadas a las partículas virales y el análisis de los espectros fue facilitado por el análisis de componentes principales (PCA).

## 3. ANTECEDENTES

### 3.1. Bioinspiración

#### 3.1.1. Virus y bionanomateriales

La complejidad de las estructuras más pequeñas en la naturaleza ha sido apreciada y utilizada como modelo de organización y construcción a seguir en las últimas décadas, especialmente gracias al avance de la microscopía electrónica. De esta manera se ha descubierto que estructuras con propiedades ópticas interesantes como el exoesqueleto de algunos insectos, las alas de las mariposas o el nácar, o con propiedades de adherencia particulares como las patas del gecko o la superficie de las flores de loto, albergan estructuras que aparentan ser simples pero que poseen un alto grado de organización. Estructuras de este tipo han servido de inspiración o, mejor dicho, de bioinspiración para el desarrollo de nuevos materiales utilizando estructuras simples y pequeñas como bloques de construcción, lo cual es conocido como fabricación de abajo hacia arriba (*bottom-up*). La síntesis de bloques de construcción de origen natural es controlada por las células y sus procesos bioquímicos, ejemplos de dichos bloques son las proteínas, los ácidos nucleicos, lípidos, etc. Destacan las proteínas virales pues una vez sintetizadas adoptan estructuras específicas que les permiten auto ensamblarse en nuevas partículas virales, así como los ácidos nucleicos que pueden formar estructuras complejas dependiendo solamente de la secuencia de nucleótidos.

Las estructuras virales han recibido recientemente bastante atención pues son ideales para el desarrollo de nuevos materiales. Las partículas virales se auto-ensamblan en el interior de células y son relativamente sencillas de reproducir y purificar mediante técnicas que además son generalmente amigables con el medio ambiente. Asimismo, son bastante monodispersas pues las dimensiones de las proteínas que las conforman son siempre iguales gracias a un proceso de síntesis y ensamblado que se encuentra bien controlado por las enzimas de la célula hospedera. Las partículas virales pueden modificarse según las necesidades mediante modificaciones genéticas para expresar nuevas funcionalidades o adicionándolas mediante síntesis química. Los virus que han sido más utilizados para la obtención de bionanomateriales son principalmente de dos tipos: icosaédricos y filamentosos y se han utilizado para obtener nanocajas y nanocables, respectivamente.

En medicina las partículas virales así modificadas han sido aplicadas exitosamente en terapia de genes, liberación de fármacos y vacunas, reconocimiento de biomoléculas, liberación de RNAs de interferencia, etc. En la Fig. 1 se indican los principales virus utilizados a la fecha en el desarrollo de nanobiomateriales. Varios virus que infectan plantas han sido utilizados como bloque de construcción de novedosos nanomateriales, así como algunos bacteriófagos (Fig. 1).

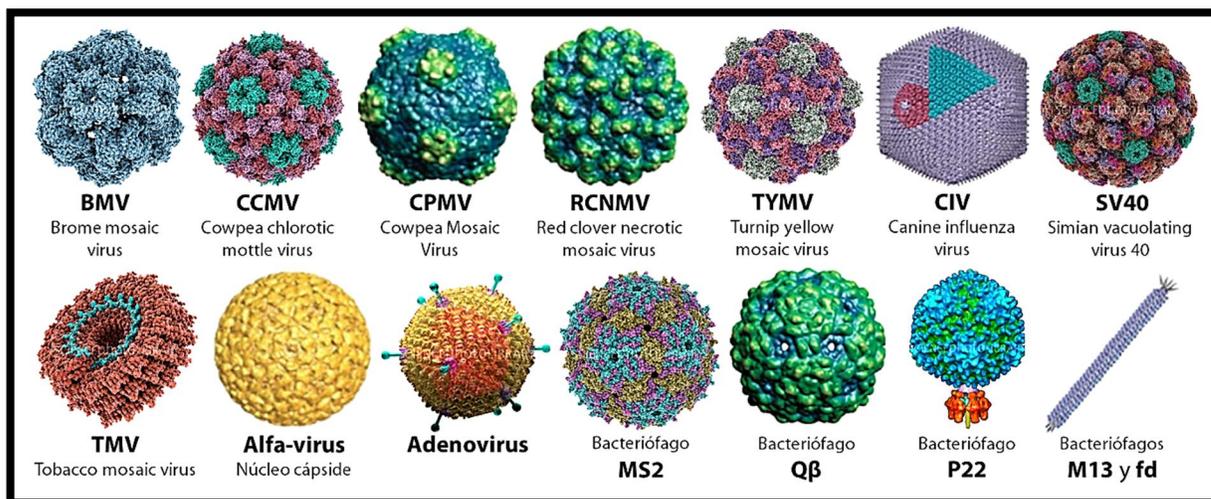


Fig. 1. Representación de la estructura molecular de diferentes virus utilizados para la obtención de bionanomateriales, con sus siglas en inglés. Fotos tomadas de Li y Wang, 2014 y del sitio [www.sciencephoto.com](http://www.sciencephoto.com)

Las partículas virales pueden ser modificadas tanto en la parte interior como en su superficie, ya sea mediante mutaciones dirigidas o mediante reacciones de bioconjugación<sup>1</sup>. Por ejemplo, se ha realizado la síntesis de nanopartículas al interior de los virus, obteniéndose nanopartículas de tamaños y formas bastante homogéneos pues ambas propiedades dependen de la forma y tamaño de la cavidad<sup>2</sup>. De modo similar, es posible encapsular nanopartículas preformadas al interior de la partícula viral como marcadores fluorescentes (quantum dots, QD) y otras moléculas bioactivas. Estos virus “cargados” se pueden utilizar para acarrear y liberar marcadores, fármacos, etc., en el organismo, además de que es posible monitorear su tránsito gracias a los fluoróforos e incluso pueden llevarse a cabo reacciones enzimáticas si una enzima en particular es encapsulada en el virus<sup>2</sup>.

La superficie de las partículas virales puede ser utilizada como templete para la organización de nanopartículas<sup>3,4</sup>. Algunas nanopartículas adheridas a la superficie de los virus pueden funcionar como recolectores de luz para aplicaciones en nanofotónica o en medicina si se adicionan marcadores fluorescentes. Las nanopartículas pueden ser sintetizadas directamente en la superficie

del virus, lo cual ha abierto la posibilidad de desarrollar novedosas baterías de litio utilizando virus filamentosos como soporte<sup>5</sup> o templete para el crecimiento celular, aprovechando particularmente la organización como cristal líquido que los virus filamentosos adquieren en suspensión<sup>6</sup>.

### 3.1.2. Biomateriales: ingeniería de tejidos

La bioinspiración ha llegado hasta el diseño de biomateriales para la regeneración de tejidos. Gran parte del conocimiento sobre el tema se ha derivado del estudio de los componentes de la matriz extracelular que las células utilizan para auto organizarse de forma natural. La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario cuyo propósito es la obtención de tejidos tridimensionales utilizando células en combinación con templados o artefactos que promuevan la adhesión, el crecimiento, la organización y la diferenciación<sup>7</sup> y proliferación<sup>8</sup> de las células. Asimismo, cada vez es mayor la necesidad de contar con matrices tridimensionales para el estudio *in vitro* del crecimiento celular pues estos cultivos tienen una mayor semejanza con lo que ocurre de forma natural en un tejido, lo cual proporciona mucha más información que los tradicionales cultivos bidimensionales.

Existen al menos cuatro vías por las cuales la ingeniería de tejidos logra la regeneración tisular:

- a) Crecimiento sobre membranas que guían el crecimiento celular y la regeneración de un tejido, como es el caso de los implantes para la recuperación de piel;
- b) Trasplante de células para promover la regeneración
- c) Biomateriales combinados con moléculas bioactivas (factores de crecimiento) para inducir la regeneración
- d) Los dos métodos anteriores: biomateriales, células y factores de crecimiento<sup>9</sup>.

Asimismo, los biomateriales deben ser biomiméticos, lo cual se refiere a cualquier material que sirva de templete para la adhesión celular y que imite varias propiedades de la matriz extracelular. Los principales requerimientos para un biomaterial son los siguientes<sup>9</sup>:

- Debe ser biocompatible, bioabsorbible, remodelable y biodegradable en tiempos adecuados
- Debe ser capaz de portar y presentar señales biomoleculares para favorecer las interacciones celulares

- Debe ser altamente poroso para favorecer la infiltración celular, la difusión de nutrientes y gases
- Debe poseer propiedades mecánicas adecuadas y con superficies adecuadas para la adhesión celular
- Debe favorecer la deposición de la matriz extracelular promoviendo las funciones celulares

Varios polímeros naturales y sintéticos han sido utilizados como soporte para el crecimiento celular que cumplen con la mayoría de las propiedades antes mencionadas, las cuales pueden incrementarse si se incorporan algunas estructuras particulares (Tabla 1).

**Tabla 1. Materiales utilizados como bioestructuras que imitan a la matriz extracelular<sup>10</sup>.**

Material utilizado	Función
<b>PEG</b>	Inducción de la morfogénesis
<b>Hidroxiapatita</b>	Inducción de la osteogénesis y la mineralización
<b>Carbón, PLA, PGA, PLGA, policaprolactona, quitosana</b>	Templado tridimensional, promoción de la adhesión
<b>Secuencias de aminoácidos RGD e IKAV</b>	Promoción de la adhesión a las matrices
<b>Péptidos anfifílicos</b>	Templete tridimensional, promoción de la adhesión,
<b>Alginato-sulfato, quitosan sulfatado</b>	Control de la liberación y presentación de factores de crecimiento y citosinas, sulfatación de la estructura de la matriz

Otras limitaciones propias de las matrices tridimensionales artificiales han sido corregidas mediante la incorporación de diferentes nanoestructuras<sup>10</sup>. El mejoramiento de estos biomateriales puede llevarse a cabo fácilmente gracias a la gran variedad de reacciones de bioconjugación que existen y que han permitido incorporar supramoléculas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, polisacáridos, lípidos, así como virus<sup>11</sup>, nanopartículas y nanotubos que mejoran las propiedades de la matriz de crecimiento (Tabla 2).

**Tabla 2. Nanomateriales que mejoran las propiedades de las redes tridimensionales<sup>10</sup>.**

Deficiencias comunes de las matrices artificiales	Nanomaterial incorporado	Efecto del nanomaterial
<b>Propiedades mecánicas débiles</b>	Nanotubos de carbón	Incremento del módulo de Young y de la fuerza tensil
<b>Baja resistencia eléctrica</b>		Incremento de la conductividad
<b>Interacciones débiles célula-matriz</b>	Nanocables de titanato	Adhesión celular a la matriz
<b>Pérdida de señales bioquímicas</b>	Nanoesferas sintéticas y naturales Nanocables de oro	Liberación controlada de biomoléculas
<b>Incapacidad de las células para ensamblar estructuras tridimensionales</b>	Nanopartículas magnéticas	Ingeniería de estructuras tubulares
	Bacteriófagos, nanopartículas de oro y de óxido ferroso	Control sobre la geometría de la biomasa celular

### 3.2. Cristales líquidos

Los cristales líquidos fueron descubiertos por Reinitzer, el cual observó que ciertos compuestos parecidos al colesterol presentaban dos puntos de fusión distintos, es decir, que presentaban diferentes transiciones de fase, a estos estados intermedios los llamó "mesofases"<sup>12</sup>. Lehman bautizó a estas mesofases como líquidos cristalinos y posteriormente Friedel identificó tres distintos tipos de mesofases: nemática, esméctica y colestérica; en cada fase las moléculas presentan un tipo de ordenamiento diferente (Fig. 2). Los cristales líquidos muestran birrefringencia al ser observados a través de polarizadores cruzados, debido a que las moléculas que los conforman muestran un ordenamiento posicional. La fase nemática está formada por moléculas que se orientan verticalmente, aunque no tienen una posición ordenada a diferencia de la fase esméctica A en la que además de orientarse, las moléculas forman capas, y se conoce como esméctica C si además se inclinan. La fase colestérica es la fase nemática de un compuesto quiral<sup>12</sup>, en esta fase se presenta un alineamiento de moléculas por capas, con cambios de ángulos graduales entre capa y capa por lo que aparenta tener una estructura helicoidal (Fig. 2).

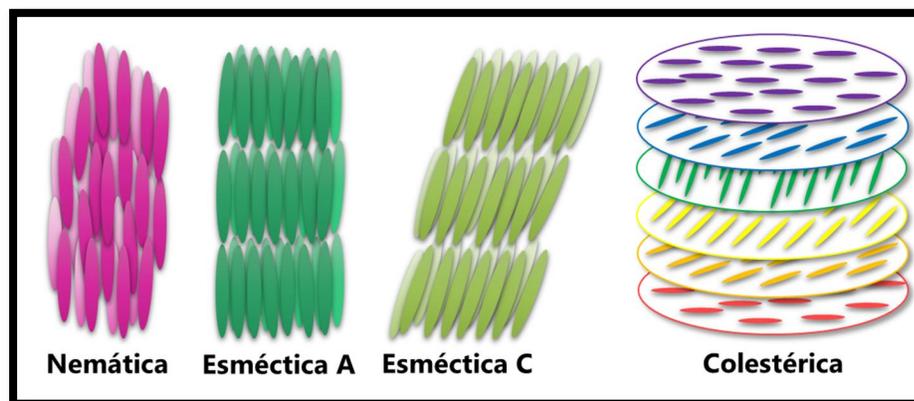


Fig. 2. Principales subfases en cristales líquidos. La orientación y configuración de las partículas del sistema determina el tipo de subfase.

Un caso particular de cristales líquidos son los que están compuestos por partículas coloidales asimétricas, normalmente, estructuras supramoleculares. Estos sistemas han sido utilizados en el estudio de los aspectos de ordenamiento de las mesofases, debido a que sus dimensiones facilitan su manipulación, lo cual no es posible con sistemas de moléculas más pequeñas<sup>13,14</sup>. Asimismo, las estructuras supramoleculares que los componen tienen la forma de varillas rígidas (o) y tienen gran importancia en el área biológica pues muchas estructuras filamentosas (p.ej. membranas, fibras

musculares, actina, microtúbulos, polisacáridos, DNA y virus<sup>15,14</sup>, entre otros.) se comportan como cristales líquidos cuando se encuentran en suspensión.

Uno de los primeros cristales líquidos biológicos descubiertos (después del colesterol) fue el del virus del mosaico del tabaco (TMV), el primer virus en ser aislado, purificado y cristalizado. En 1936 Bawden detectó la existencia de fases de cristal líquido en suspensiones al 2% del virus<sup>16</sup>; él observó la separación de dos fases: una ópticamente isotrópica y otra birrefringente. Estudios posteriores han mostrado que este sistema muestra las siguientes transiciones de fase: isotrópica, nemática y esméctica<sup>13,17</sup> (Fig. 3). Las suspensiones de virus filamentosos han sido un buen modelo experimental pues estas partículas son idénticas en estructura y poseen los mismos parámetros físicos como masa, longitud, diámetro y densidad de carga en solución; estas partículas muestran un alto grado de monodispersión que no se logra en polímeros sintetizados químicamente<sup>14,18</sup>, por lo tanto son un buen modelo para el estudio de sistemas coloidales de bastones semirrígidos.

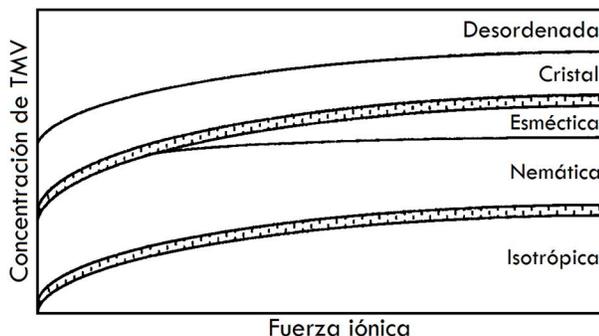


Fig. 3. Diagrama de fases del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) en función de la fuerza iónica del medio. *Modificado de Fraden, 1995*<sup>13</sup>.

El bacteriófago fd ha sido un sistema adecuado de estudio pues permite el análisis experimental del modelo de varillas semiflexibles cargadas. Así como el TMV, el cristal líquido del virus fd presenta las fases isotrópica, nemática y esméctica A y esméctica C<sup>15,13,19</sup>. Además del bacteriófago fd, otros bacteriófagos filamentosos presentan transiciones de fase líquido cristalina<sup>20</sup> (Fig. 4). Aún es necesario obtener un conocimiento más amplio sobre el comportamiento de las estructuras supramoleculares de los cristales líquidos<sup>15,13,19</sup>. Gracias a esta capacidad de auto organización, estos virus son excelentes candidatos para el desarrollo de nuevos nanomateriales pues con solo modificar condiciones fisicoquímicas es posible obtener estructuras diferentes que pueden servir como soporte para el crecimiento de células, cristales, etc.

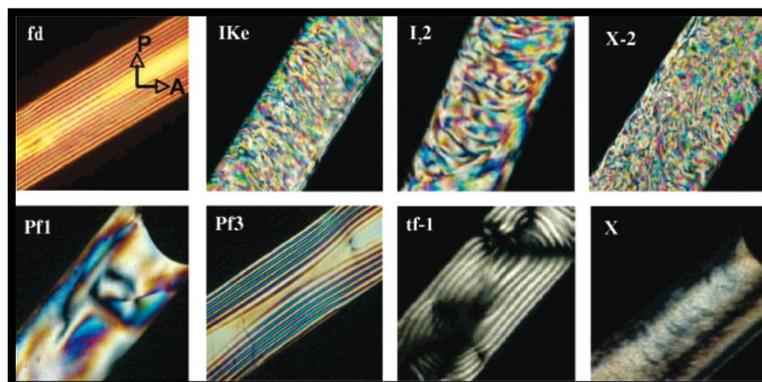


Fig. 4. Suspensiones líquido cristalinas de diferentes bacteriófagos en capilares, vistas mediante microscopía de luz polarizada cruzada mostrando texturas birrefringentes. La concentración de los virus es la siguiente: 20mg/mL (fd, IKe, I<sub>2</sub> y X-2); 15mg/mL (Pf1), 50mg/mL (Pf3), 25mg/mL (tf-1) y 75mg/mL (X). Las muestras se encuentran en regulador de boratos 0.15M a pH de 8.6 y el diámetro de los capilares de 0.7mm. Tomado de *Tomar y col., 2007*<sup>20</sup>.

### 3.3. Bioconjugación

El término bioconjugación se refiere a la unión de dos o más moléculas (mediante un enlace covalente, normalmente) para generar una estructura más compleja que tiene las propiedades combinadas de los componentes individuales<sup>11</sup>. Por ejemplo, la unión de dos biomoléculas puede ponerse de manifiesto si una de ellas es bioconjugada con algún marcador que se haga visible solo cuando dicha unión ocurre. Las reacciones de bioconjugación han tenido gran importancia en biología y medicina, pues su aplicación ha permitido desarrollar sistemas de cuantificación de analitos en poco tiempo, métodos de detección de actividad enzimática e incluso, la localización de componentes celulares específicos. Esta capacidad de poder unir biomoléculas ha generado toda una industria de diagnóstico y tratamiento de diversos padecimientos. Los blancos más importantes en este campo son biomoléculas como proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, que además de poder ser detectadas y cuantificadas mediante reacciones de bioconjugación, han sido estudiadas mediante la aplicación cuidadosa de dichas reacciones<sup>11</sup>.

En los últimos años el campo de acción de la bioconjugación se ha expandido a los nanomateriales<sup>21</sup>. Los nuevos nanomateriales que incluyen biomoléculas en su estructura (bionanomateriales) son el producto de una nueva área de investigación, la bionanotecnología<sup>22</sup>. Los objetivos principales de esta disciplina son el estudio de procesos biológicos utilizando

nanoestructuras acopladas a diferentes biomoléculas y el desarrollo de nuevos nanomateriales haciendo uso de procesos y estructuras biológicas también llamados bionanomateriales, nanobiomateriales o nanobioconjugados<sup>23</sup>. Estos nuevos bionanomateriales poseen un gran valor agregado pues tienen propiedades que son mucho más ricas que aquellas de sus componentes individuales y sus aplicaciones no están limitadas a la biología y la medicina sino también a áreas como la nanoelectrónica y nanofotónica. Para conocer la amplia variedad de bionanomateriales que se pueden obtener se recomienda la excelente revisión de Sapsford et al.<sup>21</sup>.

La cantidad de reacciones químicas que se utilizan para generar nanobioconjugados es bastante amplia, y pueden agruparse en tres categorías: química covalente, interacciones no covalentes y encapsulación<sup>21</sup>. La selección de una metodología de nanobioconjugación depende de las propiedades que tienen los bloques de construcción (biomoléculas y nanoestructuras) como son los grupos funcionales presentes, el tamaño y la composición química<sup>24</sup> así como las propiedades que se busca obtener en el bionanoconjugado.

Muchas de las reacciones de bioconjugación que generan enlaces covalentes ocurren gracias a moléculas llamadas intercaladores (crosslinkers), los cuales pueden ser visualizados como una especie de "cuerda molecular" que ayuda a la unión de dos especies reactivas y pueden o no formar parte del producto final de bioconjugación. Aquellos conocidos como de "longitud cero" (zero-length crosslinkers) son liberados durante la reacción y no forman parte del producto final, estos son los intercaladores más utilizados, especialmente las carbodiimidas. Los intercaladores homo y heterobifuncionales y los trifuncionales si forman parte del producto final. Los homobifuncionales contienen en su estructura dos sitios de reacción idénticos, mientras que en los heterobifuncionales son diferentes. Otros sistemas de bioconjugación involucran la formación de dendrímeros, el uso de marcadores fluorescentes, agentes quelantes y silanos<sup>11</sup>.

Entre las reacciones más sencillas de bioconjugación se encuentran las que son mediadas por carbodiimidas. Utilizadas desde los 60's, son probablemente el tipo de intercaladores más popular, por su eficiencia para formar bioconjugados entre proteínas, péptidos y oligonucleótidos, en cualquier combinación de estos tres. Existen dos tipos de carbodiimidas: solubles e insolubles en agua, siendo las primeras las más comunes pues la mayoría de las biomacromoléculas son solubles en reguladores acuosos. Los subproductos de la reacción son también solubles en agua, lo cual

facilita la purificación. Las carbodiimidas insolubles son utilizadas principalmente en la síntesis de péptidos y en la formación de bioconjugados con moléculas solubles en solventes orgánicos<sup>11</sup>.

La que es probablemente la carbodiimida más utilizada en reacciones de bioconjugación es EDC o EDAC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) útil para la formación de enlaces amida entre moléculas que tienen grupos carboxilo y amino<sup>21</sup> (Fig. 5). En esta reacción, el ácido carboxílico de la molécula que se desea conjugar se adiciona al enlace C=N de la carbodiimida, el cual contiene un carbono altamente electrofílico y da como resultado la formación de un derivado acilo del ácido, la O-Acilsourea. Este agente acilante reacciona rápidamente con la amina primaria de la otra molécula a unir pues el grupo saliente forma la isourea, que contiene un grupo carbonilo muy estable. Al mismo tiempo se forma el enlace amida entre el carboxilo y la amina primaria entrante<sup>25</sup>. Cabe mencionar que esta reacción se debe llevar a cabo en pH ligeramente ácido (5 - 5.5)<sup>11</sup>.

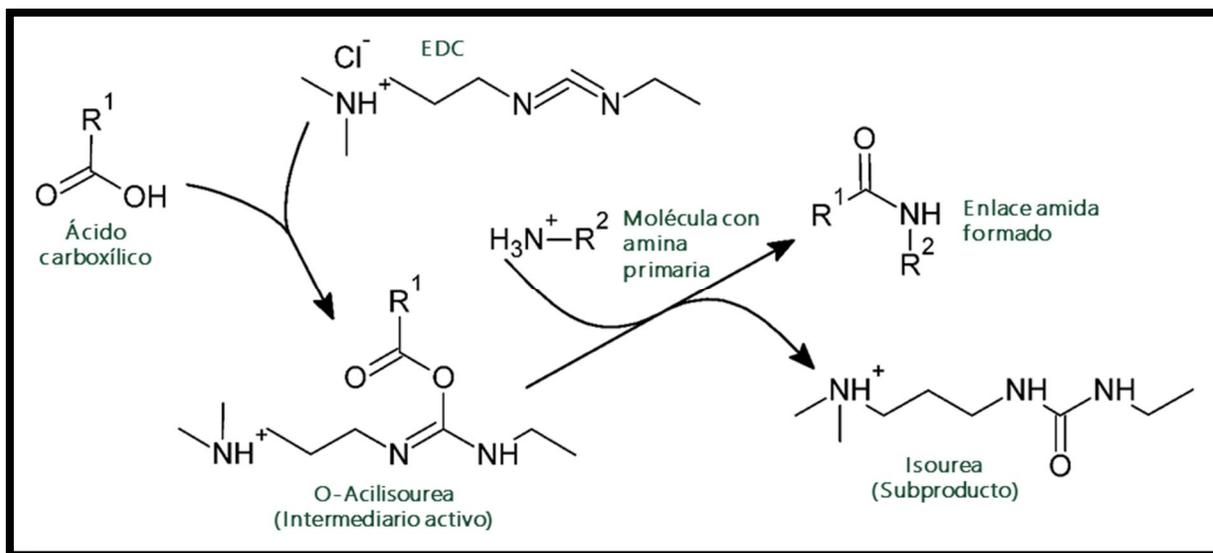


Fig. 5. Mecanismo de reacción de conjugación mediada por EDC, una carbodiimida<sup>21</sup>.

El EDC se puede utilizar en combinación con el reactivo NHS (N-hidroxisuccinimida) que le permite mejorar la reactividad de los grupos carboxilo mediante la formación de un éster. Los ésteres con NHS son solubles en agua y de larga duración, en presencia de aminas nucleofílicas que pueden atacar el carboxilo de dicho éster, el grupo NHS se libera fácilmente dejando atrás un enlace amida bastante estable (Fig. 6). El NHS incrementa la solubilidad y estabilidad del intermediario

activo que reacciona con el grupo amino, lo cual lleva a la formación de una mayor cantidad de enlaces amida.

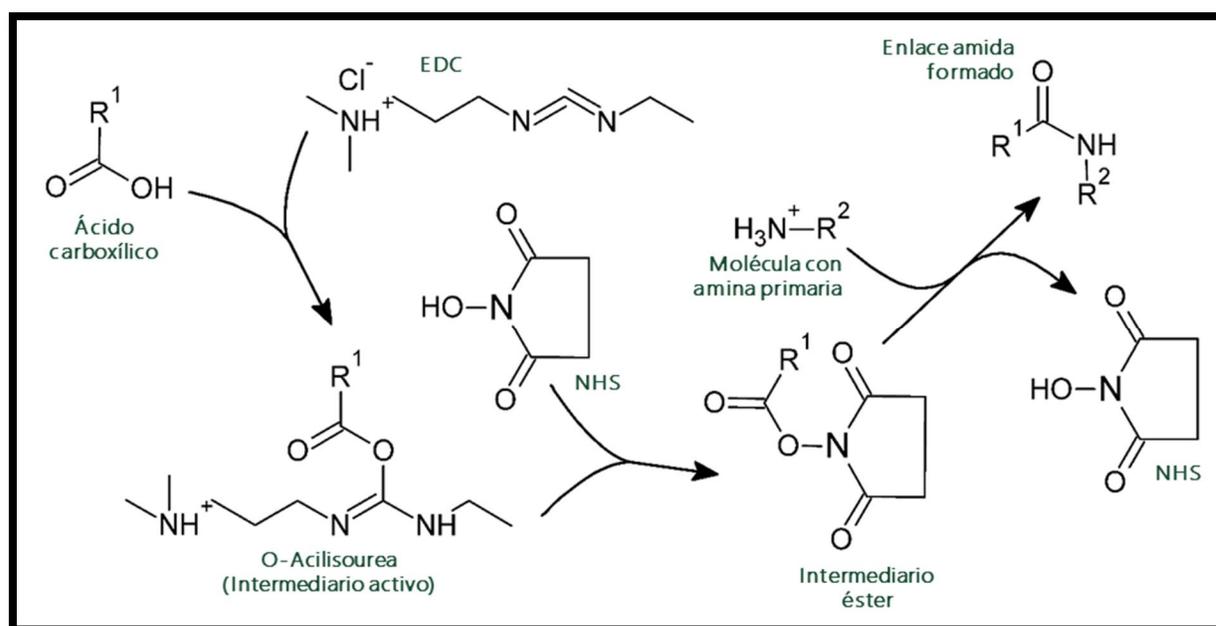


Fig. 6. Mecanismo de reacción de bioconjugación para la formación de un enlace amida mediada por EDC y NHS<sup>21</sup>.

En este trabajo se utilizó la reacción de bioconjugación mediada por EDC/NHS para lograr la unión entre el virus fd y diferentes moléculas. Se utilizaron como blanco los carboxilos presentes en la proteína pVIII del virus fd (Glu2, Asp4, Asp5, Asp12, y Glu20) y los grupos amino primarios (amino terminal y Lys8) todos en la región expuesta al solvente.

### 3.4. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son los virus que infectan procariontes (bacterias y arqueas), fueron descubiertos en 1917 por Felix d'Herelle quien los concibió como algún tipo de "ultravirus" de bacterias, aunque la naturaleza viral de los mismos se confirmó hasta 1940 con la llegada del microscopio electrónico<sup>26</sup>. Al igual que cualquier otro virus, los bacteriófagos se comportan como parásitos intracelulares estrictos, cada virus es capaz de infectar a un grupo particular de bacterias, usualmente miembros de una especie, aunque en ocasiones un mismo bacteriófago puede infectar varias especies relacionadas<sup>26</sup>. En 1967 Bradley propuso un esquema de clasificación donde reconocía 6 tipos básicos de fagos: con cola, filamentosos e icosaédricos con DNA o ARN de cadena

sencilla<sup>27</sup>. Actualmente se conoce la estructura de al menos 5568 virus examinados mediante microscopía electrónica, de los cuales un 90% corresponde a virus con “cola” en 3 familias (*Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*). Sólo 208 fagos (3.7%) son poliédricos, filamentosos o pleomórficos (*Inoviridae* y *Leviviridae*), y se encuentran distribuidos en 17 familias<sup>27</sup>.

### 3.4.1. Virus filamentosos

Los bacteriófagos filamentosos poseen simetría de tipo helicoidal e incluyen tres familias: *Rudiviridae*, *Lipothrixiviridae* e *Inoviridae*; los hospederos de los dos primeros pertenecen al dominio *Archaea*, y los últimos infectan al dominio *Bacteria*. La familia *Inoviridae* comprende dos géneros: *Inovirus* y *Plectovirus*. Aunque estos géneros poseen hospederos muy diferentes, son similares en cuanto a su replicación y morfogénesis, además poseen DNA circular de cadena sencilla. Dentro del ciclo de replicación de los *Inovirus*, los bacteriófagos establecen una infección persistente, la cual resulta en una producción continua de partículas fágicas (también conocidos como viriones, virus o partículas virales). Cabe destacar que el DNA del bacteriófago no se integra en el DNA del hospedero, como ocurre en otras especies de fagos filamentosos<sup>28</sup>. Se incluyen detalles acerca de proceso de infección, replicación y ensamblaje de las partículas virales filamentosas en el Apéndice III.

#### Bacteriófagos Ff (*Inovirus*)

Los virus filamentosos del género *Inovirus* poseen alrededor de 9 genes e infectan bacterias Gram negativas principalmente<sup>26</sup>. Su estructura simple los ha favorecido como modelo para estudiar su estructura macromolecular<sup>15</sup>, interacciones y su aplicación como herramienta en biotecnología<sup>29,30,31</sup>. La mayor parte de la información referente a los bacteriófagos filamentosos proviene de los que infectan a *Escherichia coli*, que incluyen al f1, M13, fd, I<sub>ke</sub> e I<sub>2-2</sub><sup>32, 26</sup>. Los bacteriófagos f1, M13 y fd (Fig. 7) son prácticamente idénticos en secuencia, y genéricamente se les conoce como fagos filamentosos (Ff)<sup>32,33</sup>.

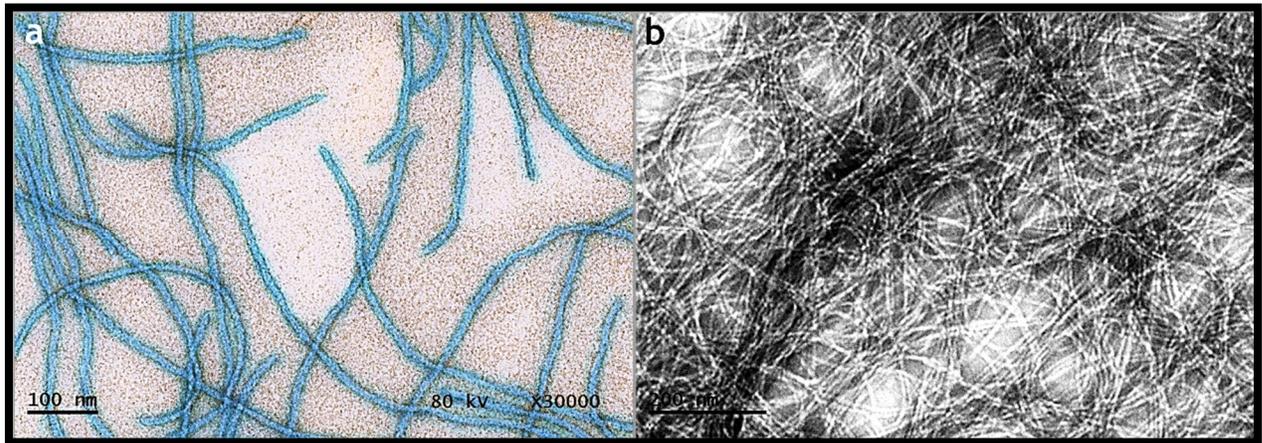


Fig. 7. Micrografías del bacteriófago filamentoso fd contrastadas con acetato de uranilo al 2%. a) Muestra diluida de los virus, imagen coloreada artificialmente, cada filamento corresponde a un virus. b) Muestra concentrada del virus lo cual le da un aspecto de red.

Los virus Ff (fagos filamentosos) poseen un DNA circular de cadena sencilla que se encuentra dentro de un tubo flexible compuesto principalmente por la proteína pVIII<sup>26</sup> y cuatro proteínas más en los extremos. Los bacteriófagos tienen un diámetro de alrededor de 6 nm y 800-1000 nm de largo<sup>34</sup> (Fig. 8), aunque algunas especies miden hasta 2000 nm, el tamaño es establecido según la longitud del DNA, una cadena normalmente de 6-7 kb<sup>26, 32</sup>. Uno de los extremos de la partícula viral posee de 3 a 5 copias de las proteínas pVII y pIX. Ambas proteínas son hidrofóbicas y las dos están implicadas en el inicio del ensamblaje de la partícula viral, si alguna se encuentra ausente el ensamblaje no se lleva a cabo<sup>26</sup>. El otro extremo de la partícula viral contiene alrededor de 5 copias de las proteínas pIII y pVI, las cuales están relacionadas con el inicio de los procesos de infección y de salida de la partícula viral desde la célula<sup>32,35</sup>. La proteína pIII consta de 406 aminoácidos que forman 3 distintos dominios (D1, D2 y D3) unidos por dos regiones ricas en glicinas<sup>36</sup>. La proteína pVI posee una región de 6 cadenas  $\beta$ -plegadas, semejantes a las que se presentan en las membranas eucarióticas relacionadas con la transducción de señales<sup>36</sup>.

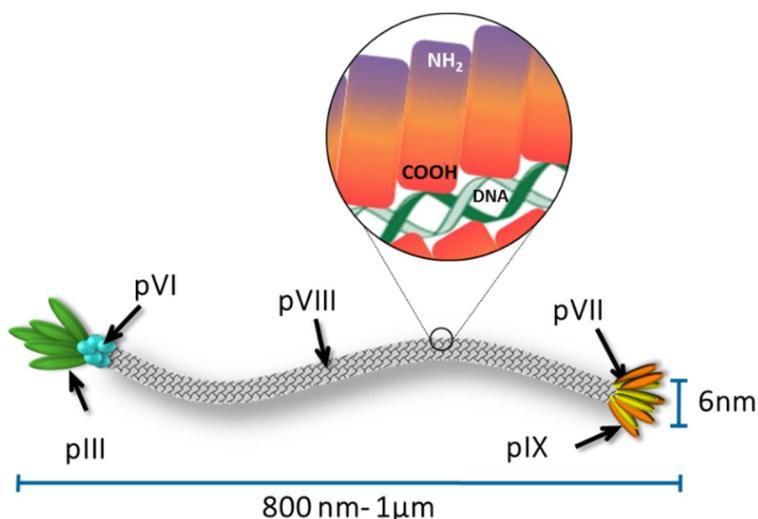


Fig. 8. Representación de un bacteriófago filamentoso con la ubicación de las proteínas que constituyen la envoltura. El acercamiento sobre la superficie del virus muestra el acomodo de las proteínas pVIII.

Como se mencionó antes, la partícula viral está compuesta principalmente por la proteína pVIII con aproximadamente 2700 copias de esta  $\alpha$ -proteína de 50 aminoácidos (Fig. 9). Las proteínas pVIII se encuentran orientadas en un ángulo de  $20^\circ$  con respecto al eje de la partícula viral, estas subunidades se ensamblan sobreponiéndose unas a otras, de manera semejante a las escamas de un pescado (Fig. 8), mediante interacciones entre las secciones hidrofóbicas que se encuentran en la mitad de cada subunidad<sup>32,33,37,38</sup>. La proteína pVIII es una  $\alpha$ -hélice continua, a excepción de los 5 aminoácidos N-terminales. Por otro lado, las cargas positivas de los aminoácidos C-terminales interactúan con los fosfatos de la cadena de DNA<sup>33,39</sup>. De las cinco proteínas que conforman la estructura del fago sólo se conoce la estructura tridimensional de la proteína pVIII, 2 dominios de la pIII y algunos datos estructurales de la proteína pIX. En los 2 dominios ya cristalizados de la proteína pIII<sup>40</sup> se encuentran 6 cisteínas formando 3 puentes disulfuro: 2 en el dominio 1 y uno más en el dominio 2 (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de grupos tiol en el bacteriófago fd. Un extremo de la partícula viral posee aproximadamente 35 residuos de cisteína (cys) provenientes de pIII y pVI, mientras que el otro lado posee entre 6 y 10 residuos cys.

Proteína	No. de cisteínas por proteína <sup>32</sup>	No. aproximado de copias de la proteína por fago <sup>26</sup>	No. Total de grupos tiol
pIII	6	5	30
pVI	1	5	5
pVII	1	3-5	3-5
pVIII	0	2700	0
pIX	1	3-5	3-5

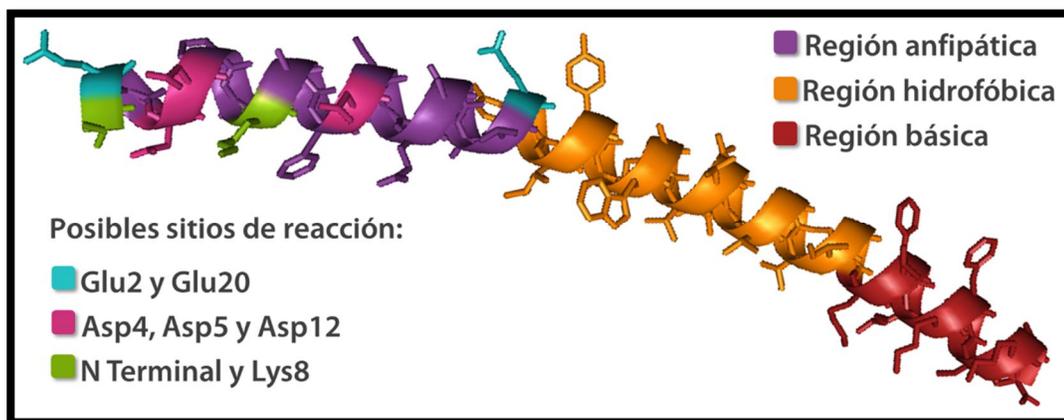


Fig. 9. Estructura de la proteína principal de envoltura pVIII (PDB 1IFD). pVIII es una alfa hélice compuesta por 50 aminoácidos con tres regiones principales: anfipática, hidrofóbica y básica (residuos involucrados en la neutralización de la carga del DNA). Los posibles sitios de reacción se muestran en la región anfipática y se refieren a residuos de aminoácidos que poseen algún grupo funcional capaz de reaccionar bajo ciertas condiciones como se verá más adelante.

La partícula viral tiene una masa de aproximadamente 16.3 mega Daltones (MDa), con un 87% de proteínas. En la Tabla 4 se muestran algunas propiedades físicas del bacteriófago filamentoso fd<sup>13</sup>.

Tabla 4. Propiedades físicas del bacteriófago fd (Fraden, 1995<sup>13</sup>).

Propiedad	Magnitud
<b>Diámetro (D)</b>	6.6nm
<b>Longitud (L)</b>	880nm
<b>Longitud de persistencia (P)</b>	2.2 $\mu$ m
<b>Peso molecular (M)</b>	$1.64 \times 10^7$ g/M
<b>Densidad óptica (O. D.)</b>	3.84 <sup>(1mg/mL, 1cm, 269nm)</sup>
<b>Birrefringencia específica (<math>\Delta n/c</math>)</b>	$6 \times 10^{-5}$ cc/mg
<b>Carga (E)</b>	2e/Å (pH > 7)

### 3.5. Nanopartículas

Las nanopartículas son partículas de entre 1 y 100 nm de tamaño en alguna de sus tres dimensiones. Debido a su pequeño tamaño poseen una gran superficie por unidad de volumen, una gran cantidad de átomos en la superficie y la habilidad de mostrar efectos cuánticos. Tienen, además, una gran diversidad química en la forma de metales, óxidos metálicos, semiconductores, polímeros, materiales de carbón, orgánicos o biológicos. Asimismo, pueden tener una gran diversidad morfológica incluyendo esferas, cilindros, discos, placas, esferas y tubos huecos, entre otras. que pueden ser obtenidas a través de rutas sintéticas en fase gaseosa, sólida y líquida<sup>41</sup>.

El uso de partículas en ensayos biológicos se remonta varias décadas atrás, siendo las microesferas de látex y nanopartículas de oro (AuNP's) las primeras en ser utilizadas, aunque con los nuevos métodos de síntesis es posible obtener nanopartículas de tamaños y formas muy diferentes. Las aplicaciones de las AuNP's son diversas, algunos ejemplos incluyen: pruebas de aglutinación y de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), PCR (Polymerase Chain Reaction), sistemas magnéticos de bioseparación, biosensores, permiten incrementar la señal de la dispersión Raman, en ensayos de dispersión de luz y acoplados a marcadores fluorescentes para la detección de moléculas<sup>11</sup>.

De la gran variedad de tipos de nanopartículas conocidas las más utilizadas en biología son las que están hechas de polímeros y metales nobles pues en ambos casos es posible modificar sus propiedades de superficie. De las nanopartículas metálicas, las de oro han sido utilizadas ampliamente como biomarcadores, principalmente en técnicas de microscopía. Las suspensiones de oro coloidal son las más populares en el área biológica. Están formadas por pequeños cúmulos de este metal de transición y aparecen como esferas sólidas y electrodensas en el microscopio electrónico de transmisión. Los métodos actuales de síntesis pueden proporcionar nanopartículas con dimensiones desde 1nm de diámetro hasta 150nm.

El uso de AuNP's tiene muchas ventajas frente a otros sistemas de marcaje comunes; por ejemplo, no presentan las desventajas de las moléculas radiactivas como es el riesgo de contaminación y son mucho más estables que los marcadores fluorescentes o aquellos que requieren reacciones enzimáticas. Además, las AuNP's pueden ser conjugadas con una gran variedad de macromoléculas incluyendo proteínas, toxinas, anticuerpos, enzimas, el sistema avidina-estreptavidina, lipo y glicoproteínas, hormonas, polímeros, entre otros<sup>11</sup>. Una gran ventaja adicional de las AuNP's es que no son tóxicas por lo que su uso en humanos ha sido aprobado por la FDA<sup>42</sup> (*Food and Drug Administration*) de los EUA.

El marcaje de macromoléculas con nanopartículas de oro comprende una serie de pasos aún no bien descritos, sin embargo, se sabe que depende de varios tipos de interacciones: la atracción electrónica entre las nanopartículas negativamente cargadas (debido a algún recubrimiento en particular) y las cargas positivas de la proteína, fenómenos de adsorción entre las regiones hidrofóbicas de la proteína y la nanopartícula y la presencia de grupos sulfhidrilo en la proteína<sup>42</sup>.

Los grupos tiol son considerados los grupos que muestran la mayor afinidad hacia superficies metálicas, particularmente hacia las de oro. Las moléculas con grupos tiol pueden interactuar con las AuNP's y formar enlaces de coordinación o "dativos", que son diferentes a los enlaces covalentes convencionales pues están formados por dos electrones que provienen de un sólo átomo. En un grupo tiol los electrones desapareados del átomo de azufre pueden formar un enlace coordinado con la nanopartícula metálica. Los disulfuros pueden a su vez formar estos enlaces coordinados si previamente son reducidos. El proceso exacto de unión y su naturaleza microscópica aún son tema de discusión e investigación<sup>43</sup>.

### 3.6. Raman y SERS

En 1928, en Calcuta, Raman y Krishnan descubrieron la dispersión inelástica de los fotones predicha en 1923 por Smekal, utilizando filtros de agua, luz del sol, un telescopio y placas fotográficas. Este tipo de dispersión que sería bautizada como dispersión Raman es el fundamento de una técnica espectroscópica que se encuentra en pleno auge. La espectroscopia Raman es una técnica que permite obtener espectros vibracionales de moléculas. Puede considerarse una técnica complementaria a la espectroscopia de infrarrojo y, en algunos casos alternativa a esta última<sup>44</sup>.

Un espectro Raman se obtiene a partir de la colisión inelástica entre luz monocromática incidente y las moléculas de una muestra. Cuando un haz de luz monocromática incide en la muestra, los fotones provocan que la energía de la molécula se eleve a un estado por arriba del nivel basal. Inmediatamente la mayoría de las moléculas regresan a dicho estado basal mediante la emisión de un fotón de la misma longitud de onda que aquella del fotón incidente. Este proceso de dispersión elástica en el que el fotón de entrada y el de salida poseen la misma longitud de onda se conoce como dispersión de Rayleigh. Sin embargo, una pequeña cantidad de fotones sale con menor a mayor longitud de onda que la del fotón incidente, es decir, ocurre una dispersión inelástica. Cuando los fotones tienen una longitud de onda menor que la de los fotones incidentes, el fenómeno es conocido como dispersión Raman de Stokes. Por otro lado, si los fotones poseen una mayor energía la dispersión es llamada de anti-Stokes. En comparación con la dispersión de Rayleigh, la dispersión Raman es un efecto muy débil, menor en unos 3 a 5 órdenes de magnitud. Incluso la dispersión Rayleigh por sí misma, solo constituye alrededor de  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  de la intensidad de la radiación incidente<sup>44</sup>.

El espectro Raman presenta la intensidad de versus la longitud de onda. Los picos en el espectro Raman corresponden a los modos vibratorios de la molécula, de manera similar al espectro de absorción de infrarrojo. El corrimiento Raman de un pico equivale a la energía vibracional del correspondiente modo. Aunque la espectroscopia Raman fue descubierta, la debilidad de las señales que proporciona en general evitó que se utilizara con mayor frecuencia. El desarrollo del fotomultiplicador incrementó la señal que se podía captar, sin embargo, aún no superaba a otras técnicas como el IR. Se razonó entonces que, tal vez aumentando la superficie de contacto del soporte de la muestra, se obtendrían mayores señales Raman.

En 1974, utilizando un electrodo de plata cuya superficie se había hecho rugosa electroquímicamente, Fleischman observó que la dispersión Raman de la piridina adsorbida en dicho electrodo se incrementaba en un factor de  $10^6$  comparado con la dispersión de una solución de piridina con la misma concentración. Esta técnica se denominó SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy), que depende de la rugosidad de la superficie y del metal de que esté hecha, así como de la adsorción efectiva del analito. En un inicio se pensó que el incremento de la señal Raman mejoraría aumentando el área de contacto del soporte para incrementar el número de moléculas de analito adsorbidas por lo que el uso de superficies metálicas rugosas se incrementó. El incremento se observó en otros materiales como oro, aluminio, e incrementos moderados al utilizar litio y sodio, todos en forma de partículas pequeñas. Finalmente se comprendió que el efecto es debido a los plasmones de superficie, la técnica es totalmente dependiente de los mismos, especialmente de los que presentan los metales plata y oro en su forma nanoestructurada. Los plasmones son modos resonantes que involucran la interacción entre cargas libres y luz. La ionosfera y la superficie de los metales son ejemplos de plasmas: medios que poseen cargas libremente móviles. Los plasmas en bulto pueden sostener oscilaciones longitudinales de plasma (plasmones), oscilaciones cuyas frecuencias de resonancia provienen de la fuerza restauradora de los cores estáticos ejerce en las cargas móviles cuando son desplazadas del equilibrio<sup>45</sup>. La excitación colectiva de los electrones es conocida como plasmón de superficie. Los plasmones de superficie pueden ser propagantes como ocurre en una rejilla metálica o localizados como en la superficie de una partícula<sup>46</sup>.

El incremento de la señal Raman puede ser debida a dos efectos diferentes: electromagnético y/o químico. El incremento electromagnético ocurre cuando la longitud de onda

de la luz incidente es cercana a la longitud de onda del plasma del metal, en este caso los electrones de conducción son excitados en un estado electrónico excitado (resonancia del plasmon de superficie). Las moléculas adheridas a la superficie experimentan un campo electromagnético excepcionalmente grande. Los modos vibracionales normales a la superficie son fuertemente incrementados. El segundo modo de incremento se debe a la formación de complejos de transferencia de carga entre la superficie y la molécula del analito. Las moléculas con pares de electrones solitarios o con nubes tipo pi muestran mayor SERS. La intensidad del incremento de la resonancia del plasmon de superficie depende de varios factores incluyendo la longitud de onda de la luz incidente y la morfología de la superficie metálica. La longitud de onda debe igualar la longitud de onda del plasmon de resonancia del metal<sup>47</sup>.

Una gran ventaja del SERS es que permite analizar analitos en muy bajas concentraciones pues los límites de detección son mucho más bajos que aquellos de la técnica convencional. Sin embargo, puede ocurrir interferencia de contaminantes que se adhieren a la superficie nanoestructurados. Esta sensibilidad dificulta a su vez la reproducibilidad al realizar mediciones cuantitativas. A pesar de dichas desventajas, la técnica de SERS ha cobrado gran relevancia en varias disciplinas que van desde antropología y estudios forenses, hasta catálisis y ciencias biológicas<sup>44</sup>.

### 3.7. Análisis multivariado: PCA

El análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) es una de las técnicas más extendidas de análisis estadístico multivariado utilizado en varias disciplinas, pero de gran relevancia en quimiometría. Esta técnica de análisis es considerada por muchos como la principal técnica que ha contribuido al cambio en la manera en que los químicos analizaban sus datos, cuyo uso comenzó en los años 70's<sup>48</sup>. El análisis multivariado tiene como objetivo reducir un conjunto de muchas variables a un número más pequeño de nuevas variables derivadas que resumen la información original. Un segundo objetivo consiste en detectar patrones en los datos, especialmente entre objetos, que no podrían ser localizados analizando cada variable por separado<sup>49</sup>.

El PCA es un método matemático que sirve para reorganizar la información de un conjunto de datos obtenidos a partir de muestras. Se puede utilizar cuando el conjunto de datos contiene

información solo de algunas variables, sin embargo, resulta más útil para datos con un mayor número de variables como son los datos espectroscópicos. El PCA define nuevas variables llamadas "Componentes Principales" (PC's), los cuales muestran la mayor variabilidad entre los datos lo cual permite describir la información con un número considerablemente menor de variables que las que originalmente se tenían<sup>50</sup>.

Se puede calcular un número ilimitado de componentes principales, aunque, comúnmente, la mayor parte de la variabilidad se explica en los primeros cinco. El primer PC corresponde a la dirección en la cual se explica la mayor variabilidad entre los datos, el segundo PC debe ser ortogonal al primero y describe la mayor cantidad de la variabilidad restante. Una vez que se saben las direcciones de los PC's es simple geometría la que nos permite expresar los valores de las muestras individuales en términos de los PC's como sumas lineales de los datos originales multiplicados por un coeficiente que describe el PC. Estos nuevos valores se conocen como "marcadores" (scores) y cada muestra tendrá un marcador para cada PC (del mismo modo en que tenía un valor para cada una de las variables de longitud de onda en los datos originales)<sup>51</sup>.

Para ejemplificar el proceso del PCA utilizaremos algunas de las mediciones realizadas utilizando espectroscopia Raman. Consideraremos 61 espectros con mediciones realizadas cada 1 nm en el intervalo de 700 a 2500  $\text{cm}^{-1}$  lo cual da un total de 1862 variables iniciales (Fig. 10a). Las variables pueden reducirse y conservar aún la mayor parte de la información, como se observa en la Fig. 10b en la que se han graficado solo 180 variables. Podemos reducir aún más la información, por ejemplo, a 19 variables (Fig. 10c) e incluso a 3 (Fig. 10d).

Con tres variables las muestras pueden ser graficadas en tres dimensiones (Fig.11a). Para poder aplicar el PCA los valores deben estar centrados alrededor de cero, para esto se calcula el valor medio de cada variable y se resta este valor a cada medición. Los valores ahora se encuentran centrados sin cambiar la distribución de los mismos (Fig. 11b). En la Fig. 11b la línea azul se encuentra en la dirección en la que existe la máxima variación entre los datos y corresponde a la dirección del primer componente principal (PC1). El valor de las nuevas variables para cada medición se obtiene proyectando el punto hacia el eje, lo cual significa que se debe encontrar el punto más cercano que representa a esa variable en el espacio tridimensional. Este punto se encuentra simplemente trazando una línea perpendicular desde el punto hasta el eje, estos valores son los marcadores para

el PC1. El eje correspondiente a la dirección del PC2 se muestra como una línea verde en la Fig. 12c. Esta línea debe encontrarse en ángulo recto con respecto al eje del PC1 y orientada en la dirección en la que se encuentre la máxima variación restante. La dirección del tercer PC se muestra con una línea roja (Fig. 11c), la cual se encuentra también perpendicular a los PC1 y PC2 y considera lo que queda de la máxima variación entre los datos. Los PC's tienen un punto de origen en común el cual corresponde al origen de los datos previamente centrados. Con los marcadores se puede trazar una nueva gráfica de dos o tres dimensiones en la que se observarán los puntos correspondientes a cada espectro colectado con las nuevas coordenadas obtenidas mediante PCA. Las gráficas tridimensionales pueden ser rotadas para observar la distribución de la nube de datos, con lo que se puede determinar si existe algún patrón dentro de los mismos (Fig. 11d).

A la vez que se obtienen los marcadores para cada PC, también se obtienen los coeficientes utilizados para obtenerlos y son conocidos como "pesos" (weights)<sup>51</sup>. Cuando se tienen más de tres variables (como en el caso inicial en el que contamos con 1862 variables) no es posible visualizar los datos como en la Fig. 11a en la que se trazaron los ejes para obtener los PC's. En un caso así, se graficarán los pesos obtenidos con respecto a las variables de entrada como se muestra en la Fig. 11e en la que se muestra las gráficas de pesos derivados del PCA de los datos para los tres primeros PC's. En dicha gráfica los picos más altos contienen la mayor variabilidad entre los datos, basta con analizar el tipo de modo vibracional que se encuentra ahí para determinar qué tipo de grupo funcional es el afectado<sup>51</sup>.

El PCA se ha utilizado exitosamente en el análisis de espectros de Raman, SERS e infrarrojo de muestras clínicas que incluyen suero y sangre humana, así como biopsias y cortes de tejidos con algún padecimiento como cáncer<sup>52,53,54</sup> y aterosclerosis<sup>55</sup>. La aplicación del PCA permitió en todos los casos discriminar individuos sanos de pacientes con alguna patología, lo cual demuestra el potencial del análisis multivariado para el análisis espectroscópico.

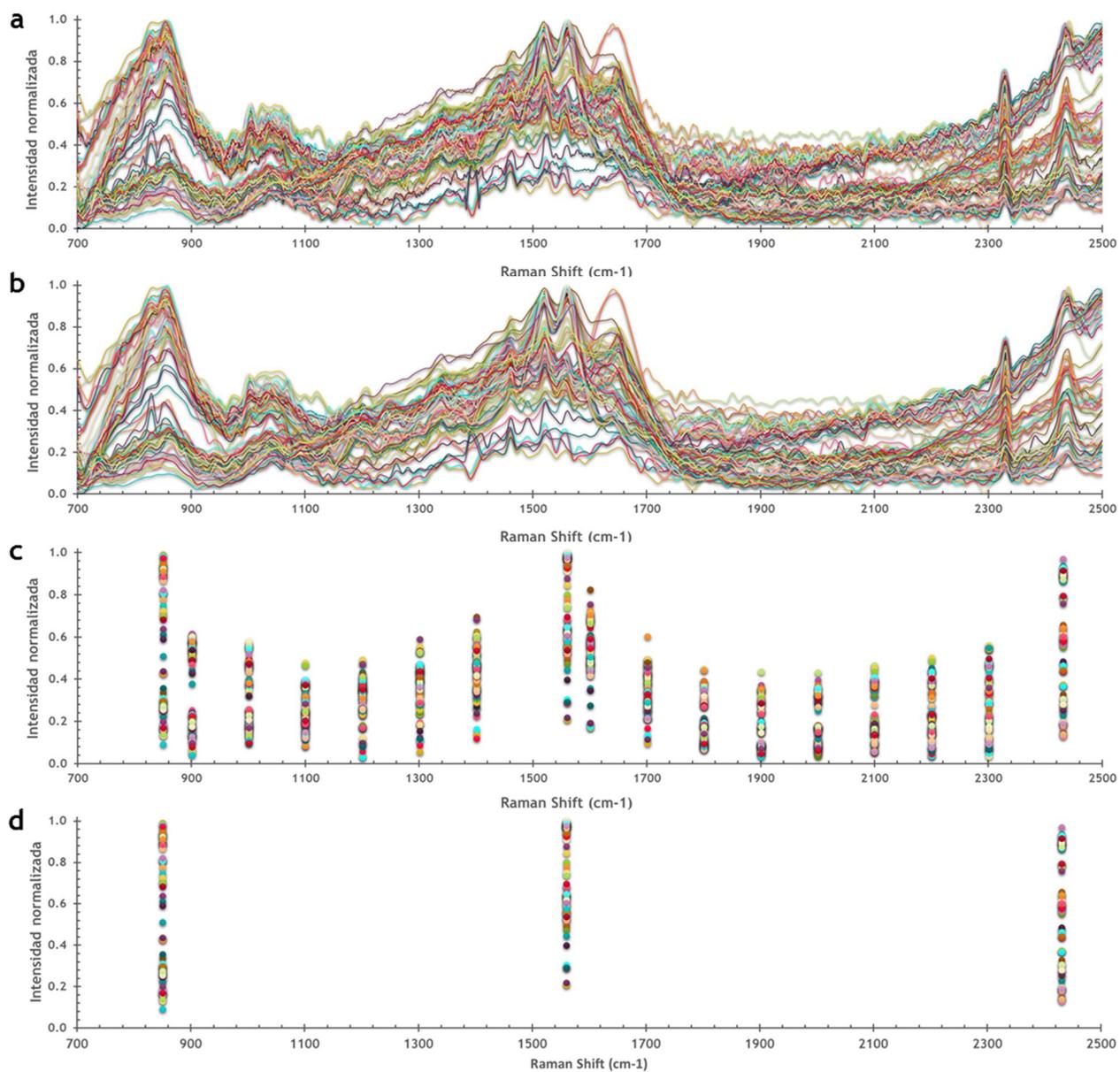


Fig. 10. Espectros Raman (61 en total) considerando diferente número de variables (longitudes de onda), a) 1862 variables, intervalo de 1 cm<sup>-1</sup>, b) 180, intervalo de 100 cm<sup>-1</sup>, c) 19 y d) 3.

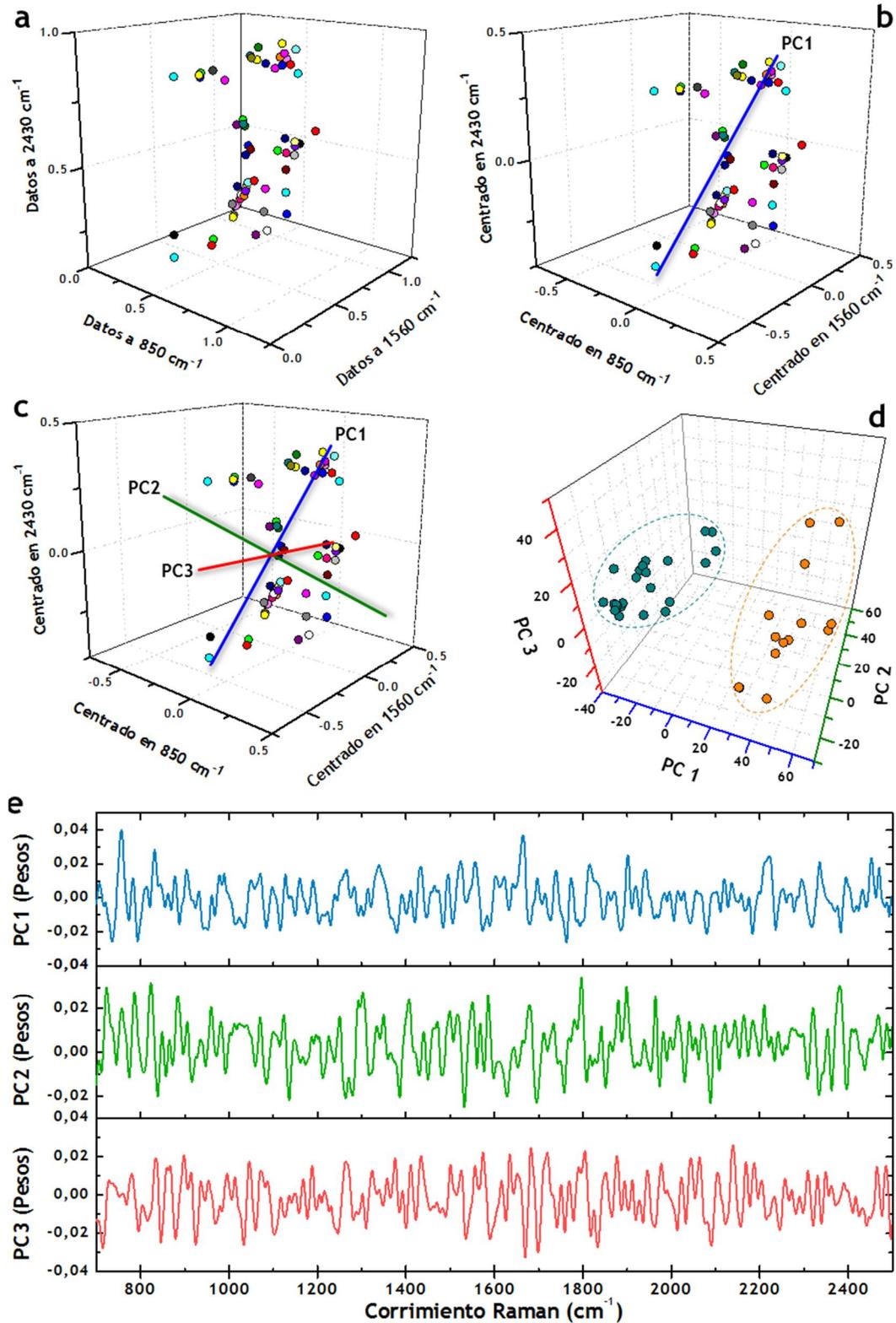


Fig. 11. Representación del PCA de los 61 espectros Raman. a) Representación de los 61 espectros Raman considerando solo 3 variables (850, 1560 y 2430  $\text{cm}^{-1}$ ). b) Datos centrados en cero, la línea azul es el eje que indica la mayor variación entre los puntos (PC1). c) Las líneas verde y roja indican el PC2 y el PC3, respectivamente. d) Las muestras se graficaron considerando los scores obtenidos en los 3 PC's. e) Gráfica de pesos vs el corrimiento Raman para los primeros 3 componentes principales.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Obtención del virus fd

#### 4.1.1. Producción

El proceso desarrollado para la producción del bacteriófago fd se basó en una combinación del método propuesto por Sambrook<sup>56</sup>, para el bacteriófago M13 y el modificado por Purdy<sup>57</sup> en el 2004 para producir el bacteriófago fd.

**Cepas.** Se utilizó la cepa *Escherichia coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 λ<sup>-</sup> lac<sup>-</sup> [F' proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*]), y la cepa del bacteriófago fd de ATCC (1566-B2).

**Medio LB (Luria-Bertani).** El medio LB se preparó según las indicaciones del fabricante, con la siguiente composición: Triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaCl (7.5 g/L), agar bacteriológico (15 g/L, solo para preparar medio sólido).

**Preparación de la semilla del virus fd.** Se obtuvieron colonias aisladas de *E. coli* utilizando placas de agar LB y después de incubar a 37 °C durante 24 h. Con una de las colonias obtenidas se inoculó un tubo con 3 mL de caldo LB, se incubó durante 5 h en agitación. Se prepararon diluciones seriadas del bacteriófago fd.

En un tubo con 3 mL de medio LB fundido (~45 °C) se mezclaron 300 μL de la suspensión bacteriana y 100 μL de cada suspensión de virus respectivamente, cada mezcla se vació en una placa con medio LB. Las placas se incubaron un máximo de 48 h hasta observar placas turbias (zonas de menor crecimiento bacteriano). Esta técnica también permite evaluar la infectividad del bacteriófago. Posteriormente, se recuperaron 2 o 3 placas turbias y se adicionaron a un matraz que contenía 50 mL de caldo LB. El matraz se incubó durante 12 h a 37 °C en agitación. Posteriormente la biomasa bacteriana se eliminó centrifugando a baja velocidad (3,500 rpm). El sobrenadante se separó y almacenó en tubos estériles de 15 mL a 4°C; este sobrenadante se utilizó como semilla para el escalamiento de la producción.

**Escalamiento.** Se prepararon aproximadamente 14 L de caldo de cultivo LB, separados en varios matraces Erlenmeyer de 2 L, los cuales fueron inoculados cada uno con 700 μL de una suspensión

de *E. coli* previamente preparada como se indicó en el punto anterior. Los matraces se incubaron a 37 °C en agitación durante 5 h, en este momento se adicionaron 500µL de la semilla de fago y se continuó durante 12 h más con la incubación a 37 °C.

#### 4.1.2. Purificación

Las células bacterianas fueron removidas mediante centrifugación a 3,500 rpm, el sobrenadante se colectó nuevamente en matraces de 4 L a los cuales se les adicionaron 20 g/L de PEG8000 y 20 g/L de NaCl, la mezcla se mantuvo a 4 °C durante 12 h sin agitación. Posteriormente esta mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 40 min para obtener un precipitado blanco compuesto por virus y polímero. El precipitado se resuspendió y se centrifugó a 13000 rpm, obteniéndose esta vez un precipitado compuesto por restos celulares, el proceso se repitió hasta no observar dichos residuos. La suspensión final se ultracentrifugó a 50,000 rpm durante 3 h, obteniéndose un precipitado de aspecto gelatinoso. Este precipitado se resuspendió y se dializó en regulador TRIS-HCl pH 8.15, NaN<sub>3</sub> 0.05% durante 12 h.

#### Purificación mediante gradientes de centrifugación

**Gradientes de CsCl.** Se prepararon gradientes de cloruro de cesio para eliminar restos celulares y de PEG. En un tubo para ultracentrífuga se adicionaron 0.5 g de CsCl por cada mL de suspensión del bacteriófago. El tubo se colocó en un rotor de columpio y se centrifugó a 40,000 rpm por 25 h cuando se utilizó el rotor SW40Ti y 18 h con el rotor TLS-55, en ambos casos la temperatura se mantuvo a 15 °C. Se obtuvo una banda opalescente formada por el bacteriófago fd, la cual se separó utilizando una micropipeta. El virus así separado se dializó con regulador de Tris-HCl pH 8.15 con concentraciones decrecientes de NaCl (1 M, 0.5 M, 0.25 M, sin NaCl), para eliminar los restos de CsCl y de evitar la agregación de las partículas virales debida a esta sal.

**Gradiente en soluciones de iodioxanol (Optiprep®).** En un tubo para ultracentrífuga se colocaron 2 mL de una solución de iodioxanol al 60%, sobre esta primera capa se adicionaron cuidadosamente 2 mL de una solución al 50%. Se colocaron 8 mL de una suspensión de virus. Después de 7h de ultracentrifugación a 38,000 rpm se separó la fracción por encima de la capa de iodioxanol al 50%. Esta fracción se observó con una coloración blanquecina, más turbia que el resto de las capas en el tubo. El volumen colectado se colocó en un tubo que contenía las siguientes capas

de iodioxanol: 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25 15%. Después de ultracentrifugar a 38,000 rpm se separó la capa blanquecina por encima de la capa al 15%. La capa colectada se dializó en regulador de Tris pH 8.15 durante 72 h, con recambios de regulador cada 12 h. La muestra se ultracentrifugó una vez más, se resuspendió y se separó en alícuotas para ser almacenado a 4 °C.

**Concentración del virus.** A partir de la suspensión purificada de virus se prepararon diluciones cuya absorbancia fue obtenida mediante el espectrofotómetro UV-Visible Ultrospec II de LKB Biochrom a 269 nm. Se sabe que una suspensión de virus con una concentración de 1 mg/mL tiene una absorbancia de 3.84 a 269 nm (Fraden, 1995; Berkowitz y Day, 1976). Este factor fue utilizado para calcular la concentración del virus producido.

## 4.2. Producción de AuNPs

Se sintetizaron nanopartículas de oro utilizando el método de Turkevich<sup>58</sup> y una modificación del mismo método en la que además se utiliza el reductor NaBH<sub>4</sub><sup>11</sup>. La Tabla 8 resume las concentraciones de las soluciones necesarias para obtener tres diferentes tamaños de nanopartículas.

Tabla 8. Soluciones utilizadas en la síntesis de AuNP's

Diámetro esperado (nm)	HAuCl <sub>4</sub> (mM)	NaBH <sub>4</sub> (mM)	Citrato de sodio (mM)
5	0.5	50	0.5
20	0.5	-	1
40	0.5	-	0.5

**Síntesis de AuNP's de 5nm de diámetro.** En un matraz Erlenmeyer de 50 mL con un agitador magnético se colocaron 10 mL de la solución de HAuCl<sub>4</sub>, se adicionaron 10 mL de citrato de sodio 0.5 mM, después de 5 min de agitación se adicionaron rápidamente 1.2 mL de NaBH<sub>4</sub>. La solución pasó de un color amarillo paja a un tono morado oscuro. La agitación se mantuvo durante 20 min sin que hubiera cambio alguno en la coloración.

**Síntesis de AuNP's de 20 y 40 nm de diámetro.** En un matraz Erlenmeyer de 50 mL se colocaron 10mL de la solución de HAuCl<sub>4</sub>, la solución se calentó hasta ebullición, se adicionaron entonces 10 mL de la solución de citrato de sodio correspondiente (0.5 mM o 1 mM). La mezcla de reacción pasó de incolora a un tono violeta y después de 20 min de calentamiento a rojo para las AuNP's de 20 nm y a rosa mexicano para las AuNP's de 40 nm de diámetro.

**Cálculo de la concentración de nanopartículas en solución.** Para calcular la concentración de las AuNP's se utilizó el método de Xiong Liu et al.<sup>59</sup> Este método considera que las nanopartículas obtenidas son esféricas y los reactivos utilizados en la reacción se consumen en su totalidad. Como se muestra a continuación, se calcula en primer lugar el número promedio de átomos de oro por NP y entonces la concentración de la suspensión:

1. No. promedio de átomos de oro por nanopartícula:

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6M}$$

$$\therefore N = 30.89602D^3$$

2. Concentración molar de nanopartículas en solución:

$$C = \frac{N_{Total}}{NVN_A}$$

En donde:

**N** = No. promedio de átomos de Au por nanoesfera

**M** = Peso molecular del oro (197g/mol)

**D** = Promedio del diámetro de las nanopartículas obtenido por TEM

**$\rho$**  = Densidad del oro fcc (19.3 g/cm<sup>3</sup>)

**N<sub>total</sub>** = Cantidad inicial de sal de oro añadida a la reacción (mol)

**V** = Volumen de la solución de reacción (L)

**N<sub>A</sub>** = No. de Avogadro (6.023x10<sup>23</sup>mol<sup>-1</sup>)

### 4.3. Reacciones de bioconjugación con el virus fd

#### 4.3.1. Adición de grupos tiol a la superficie del virus

Para generar grupos tiol en la superficie del virus, especialmente en la parte expuesta al disolvente de la proteína VIII, se utilizaron dos metodologías: incorporación de moléculas de 2-iminotiolano (reactivo de Traut), y una reacción de bioconjugación que utiliza interconectores de longitud cero y es mediada por carbodiimidas.

**Reactivo de Traut.** El reactivo de Traut es un imidoester cíclico conocido también como 2-iminotiolano. Reacciona con aminas primarias durante una reacción que abre el anillo y genera un grupo sulfhidrilo. La reacción ocurre en el intervalo de pH de 7-10. Algunos inconvenientes de la reacción es que fácilmente pueden formarse puentes disulfuro entre las proteínas modificadas, además de que el reactivo puede reciclarse por lo que la molécula modificada debe utilizarse de inmediato. A una suspensión de virus fd (1 mg/mL) en regulador de boratos de pH 8, se le adicionaron diferentes volúmenes del reactivo de Traut (5, 10, 25 y 100). La reacción se mantuvo en agitación a 30°C durante una hora. La mezcla de reacción se dializó en regulador de Tris pH 8.15 durante 30 min.

Debido a que los grupos tiol son capaces de formar puentes disulfuro, se adicionó el reductor  $\text{NaBH}_4$ , la mezcla se mantuvo a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 min, se dializó nuevamente y en seguida se adicionaron AuNP's; esta nueva mezcla se mantuvo a  $40^\circ\text{C}$  con agitación durante 12 h. Los conjugados fd-Traut-Au, se observaron mediante TEM.

**Adición de cisteínas vía intercaladores de longitud cero.** Se preparó una solución de cisteína 300 mM, así como una suspensión del virus fd con concentración de 15 mg/mL, en ambos casos se utilizó regulador de fosfatos a pH de 7.2. Se mezclaron 9 mL de la solución de cisteína con 1 mL de la suspensión de virus (concentración final: 1.5 mg/mL). Se adicionaron 4 mmol de hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y 2 mmol de N-hidroxisuccinimida (NHS) 11, la mezcla se agitó vigorosamente y se mantuvo en agitación durante 6h a temperatura ambiente bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . El pH de la mezcla se mantuvo entre 5 y 5.5. Los virus modificados (fd-cys) fueron dializados en regulador de Tris-HCl a pH de 8.15. La suspensión dializada se utilizó para una segunda ronda de bioconjugación. La cisteína fue solubilizada primero en un pequeño volumen de regulador de fosfatos y fue adicionada entonces a la suspensión. Se repitió el procedimiento de bioconjugación y purificación ya descrito. Los virus modificados fueron guardados a  $4^\circ\text{C}$  en viales de vidrio con  $\text{N}_2$ . En la Fig. 12 se muestra el posible mecanismo de reacción de las moléculas de cisteína con el virus fd.

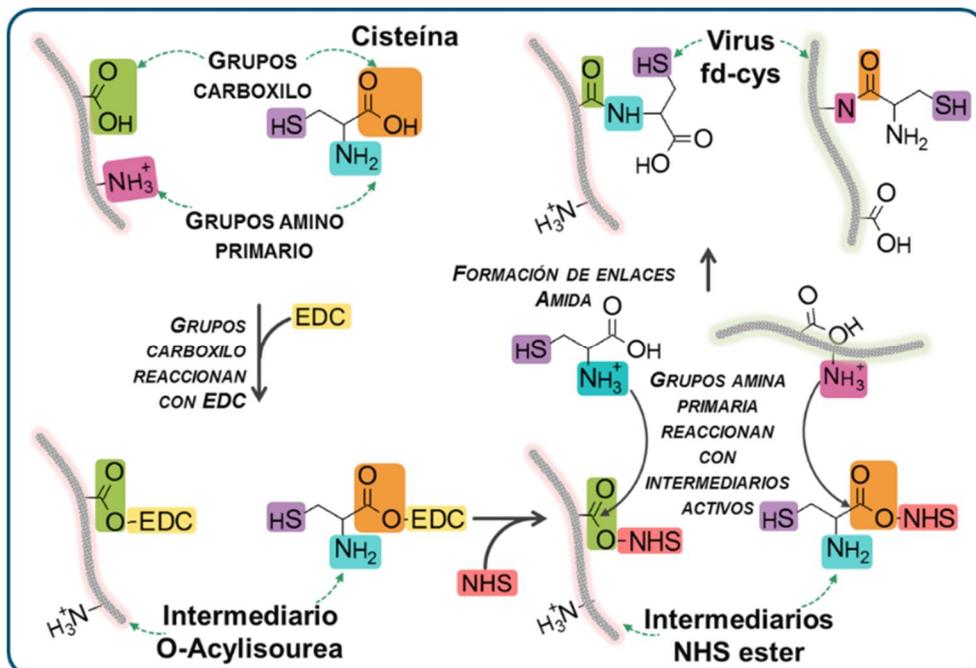


Fig. 12 Mecanismo de la reacción de bioconjugación entre el virus fd y cisteína mediada por EDC y NHS.

### 4.3.2. Adición de diaminas y ácidos dicarboxílicos

Utilizando la reacción mediada por carbodiimidas ya descrita, se llevó a cabo la unión entre ácidos dicarboxílicos y diaminas. Se eligió el ácido itacónico (ITA) y las diaminas etilendiamina (EDA) y dietilentriamina (DETA). Se prepararon soluciones de los compuestos mencionados en regulador de fosfatos pH 5.5 (ITA 300 mM, EDA 200 mM, DETA 200 mM). Cabe mencionar que debido a que el ácido itacónico tiene una baja solubilidad en agua, el regulador se calentó ligeramente y se procedió a adicionar el compuesto, este método favoreció la solubilización del ácido. El pH de las soluciones se ajustó utilizando NaOH o HCl concentrados, según el caso. Se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito para la adición de cisteínas, aunque en este caso, el volumen final de reacción fue de 50 mL. Los virus modificados fueron dializados y almacenados a 4 °C.

### 4.4. Obtención de bioconjugados virus-AuNP's

Para estos experimentos se utilizaron el bacteriófago fd-wt (virus nativo) y el fd-cys (virus modificado con cisteínas). La formación de los bioconjugados virus-Au, ocurre entre la superficie de las nanopartículas y los grupos tiol libres y expuestos en la superficie del virus. Aunque es posible la unión de AuNP's con tioles formando puentes disulfuro, se observó que la previa reducción de dichos disulfuros, favorece significativamente la cantidad de nanopartículas unidas.

**Evaluación de agentes reductores y de la temperatura de reacción.** Se prepararon dos series de 3 microtubos que contenían 500  $\mu$ L de una suspensión del bacteriófago fd (2 mg/mL), a cada uno se le adicionó un reductor diferente: 21  $\mu$ L de una solución de Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) 0.5 M, 200  $\mu$ L de una solución al 5% de 2-Mercaptoetanol y, por último, 4 mg de NaBH<sub>4</sub> respectivamente. Ambas series de microtubos se incubaron durante 30min con agitación, a 40 y 25 °C respectivamente. Posteriormente la mezcla de reacción se dializó con regulador de Tris 20 mM, NaN<sub>3</sub> 0.05% durante 1h, con recambios del regulador cada 10 min para eliminar el reductor. La suspensión se transfirió nuevamente a microtubos estériles y se utilizó de inmediato para la reacción de conjugación con las AuNP's.

Para preparar los primeros bioconjugados (Tabla 5) se utilizaron AuNP's de 5 nm en combinación con virus reducido tanto a 25 °C como a 40 °C, estas nuevas mezclas de reacción se incubaron a 25 y 40 °C respectivamente en agitación durante 12 h.

Tabla 5. Mezclas de reacción de bioconjugación entre AuNP's y fagos sometidos a diferente tipo de reducción de tioles y a diferente temperatura de reacción.

Componente	Mezcla No.					
	1	2	3	4	5	6
fd sin reducir (µL)	400	400				
fd reducido con TCEP (µL)			400			
fd reducido con NaBH <sub>4</sub> (µL)				400		
fd reducido con 2-MEtOH (µL)					400	
AuNP's 5nm (µL)		400	400	400	400	400
Tris-HCl 20mM (µL)	400					400

*\*2-MEtOH = 2-Mercaptoetanol*

**Efecto de la concentración del bacteriófago en las reacciones de reducción de tioles.** Se llevó a cabo la reducción de puentes disulfuro de dos suspensiones de virus fd (10µg/mL y 1µg/mL) utilizando NaBH<sub>4</sub> y una temperatura de reacción de 40°C. Se adicionaron AuNP's de 5, 20 y 40nm (Tabla 6).

Tabla 6. Mezclas de reacción de bioconjugación entre AuNP's y fagos reducidos con NaBH<sub>4</sub>. el fago reducido corresponde a dos suspensiones con diferente concentración del mismo, 10µg/mL y 1 µg/mL.

	Mezcla No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
fd sin reducir (µL)	400	400	400	400				
fd reducido (µL)					400	400	400	400
AuNP's 5nm (µL)		400				400		
AuNP's 20nm (µL)			400				400	
AuNP's 40nm (µL)				400				400
Tris-HCl 20mM (µL)	400				400			

**Efecto del reductor sobre las AuNP's durante la reacción de bioconjugación.** Se llevó a cabo un experimento en el que se añadieron las AuNP's al mismo tiempo que el reductor, la reacción se llevó a cabo a 40 °C (Tabla 7).

Tabla 7. Mezclas de reacción utilizadas para evaluar el efecto del reductor (NaBH<sub>4</sub>) sobre las AuNP's y el virus durante una reacción de bioconjugación.

	Mezcla No.						
	1	2	3	4	5	6	7
fd sin reducir (µL)	500	500					
NaBH <sub>4</sub> 1.2M (µL)		10 o 100*					
AuNP's 5nm (µL)		500			500		
AuNP's 20nm (µL)			500			500	
AuNP's 40nm (µL)				500			500
Tris-HCl 20mM (µL)	500				500	500	500

*\*:10 µL NaBH para suspensión de fd 1 µg/mL, 100 µL NaBH para suspensión de fd 10 µg/mL*

## 4.5. Reología

Se prepararon mezclas bacteriófago-NaCl con diferentes concentraciones para reología y microreología. Las concentraciones utilizadas se establecieron considerando el diagrama de fases del bacteriófago obtenido por Purdy<sup>57</sup> (Fig. 9). Se eligieron puntos que se encontraran dentro de la fase isotrópica o al menos en la fase de coexistencia isotrópica-nemática. Se evitó el uso de concentraciones muy bajas del bacteriófago fd pues el método utilizado para microreología requiere concentraciones lo suficientemente altas para evitar la precipitación de las microesferas de poliestireno. Más detalles sobre la preparación y caracterización de estas muestras se incluyen en el trabajo de Sarmiento et. al<sup>60</sup>.

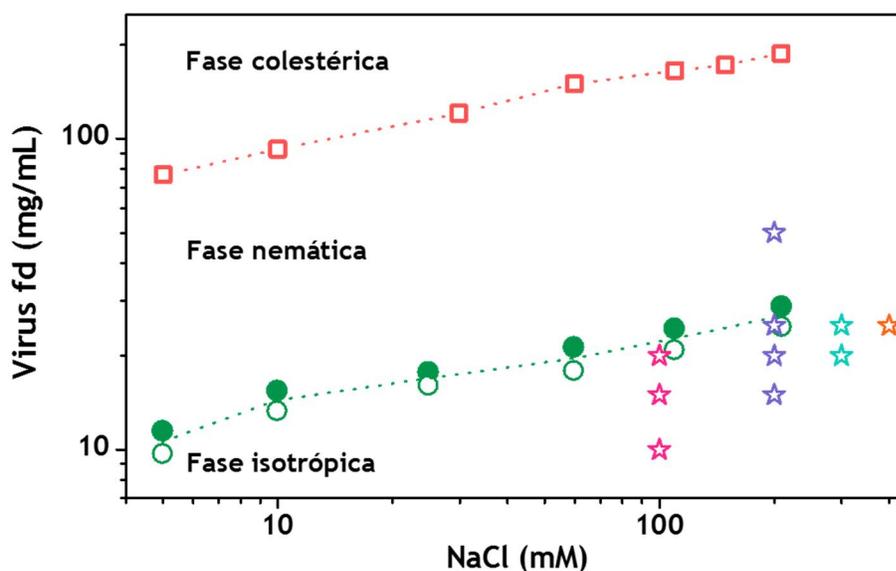


Fig. 13. Diagrama de fases del virus fd en función de la fuerza iónica del medio y la concentración del virus<sup>57</sup>. Los círculos llenos indican la transición de la fase isotrópica a la fase nemática mientras que la fase de coexistencia se indica con círculos vacíos. Los cuadros indican la transición de la fase nemática a la colestérica. Las estrellas indican las mediciones realizadas en este trabajo.

**Reología mecánica.** Se utilizó el reómetro marca Bohlin Gemini HR nano de Malvern Instruments, con geometría cono-plato 4/40 (ángulo del cono: 4°, diámetro del cono: 40 mm, Fig. 14) controlado todo por computadora, se utilizaron 1200  $\mu\text{L}$  de cada mezcla bacteriófago-NaCl, de acuerdo a la Fig. 13. En el reómetro las muestras se mantuvieron en un ambiente húmedo para evitar que se evaporaran. La curva de flujo (viscosidad) fue de una razón de corte de 0.1 a 100  $\text{s}^{-1}$  a una temperatura de 25  $^{\circ}\text{C}$ . Para determinar el espectro viscoelástico dinámico la muestra se sometió a una deformación sinusoidal de frecuencias de entre 0.1 a 100 rad/s con una deformación de  $\sim 30\%$ , la separación entre el cono y el plato fue de 150  $\mu\text{m}$ .

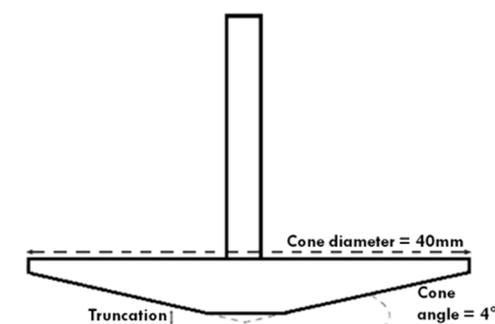


Fig. 14. Diagrama de la geometría utilizada en el reómetro mecánico.

**Microrreología.** Se utilizó un aparato de DWS diseñado en el grupo de Fluidos Complejos del Instituto de Física de la UNAM, el cual utiliza un láser Coherent Innova 300 con una potencia de 200 mW, la luz dispersada por la muestra se recolectó con fibras ópticas y la correlación de la intensidad se hizo en el modo cruzado de la señal obtenida por los fotomultiplicadores. La obtención de los espectros viscoelásticos se llevó a cabo a partir de la función de correlación obtenida y de la evaluación del desplazamiento cuadrático medio de las partículas, todo esto fue adquirido mediante un software diseñado en el grupo, se obtuvieron espectros con frecuencias de entre  $10$  y  $10^6$  rad/s.

Las diferentes mezclas virus-NaCl fueron colocadas en pesafiltros para evitar evaporación del agua, se calentaron hasta  $40$  °C para reducir la viscosidad, inmediatamente se adicionaron microesferas de  $2$   $\mu\text{m}$  en suspensión acuosa (10%) hasta alcanzar una fracción de volumen de aproximadamente 0.03%, la mezcla se mantuvo en agitación por 15 min para asegurar una dispersión homogénea de las partículas.

#### 4.6. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se utilizó el microscopio electrónico TEM JEM-1200EX11 de JEOL. En el caso del virus fd wt, los virus modificados y los nanobiocompositos virus-AuNPs, se depositaron muestras diluidas sobre rejillas de cobre recubiertas con carbón y se contrastaron con una solución al 2% de acetato de uranilo. Del mismo modo las AuNP's sintetizadas se depositaron en rejillas recubiertas con carbón durante 12 h, tiempo después del cual se observaron directamente en el microscopio sin necesidad de contrastar. Para evaluar las dimensiones tanto de las partículas virales como de las AuNP's se utilizó el programa DigitalMicrograph™ 3.7 (Gatan Software Team).

#### 4.7. Geles poliacrilamida

Se utilizó el método de Laemli<sup>61</sup> para preparar geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Se utilizaron geles de resolución al 15% de poliacrilamida. Las muestras de los diferentes virus se desnaturalizaron en presencia de un buffer de carga que contiene DTT (ditiotreitól) y azul de bromofenol. Aproximadamente 50  $\mu\text{L}$  de muestra se colocaron en cada pozo del gel. La proteína VIII se observó como una gran mancha al final del gel debido a su tamaño pequeño.

#### 4.8. Microscopia de fuerza atómica (AFM)

Se colocaron  $\sim 4 \mu\text{L}$  del bacteriófago diluido sobre mica recién clivada, la muestra se secó al aire y fue escaneada con el microscopio de fuerza atómica JSTM-4200 de JEOL utilizando un escáner de  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  con y sin vacío ( $10^{-4} \text{ Pa}$ ). Se obtuvieron imágenes de topografía y fase mediante el modo de contacto (AC Mode).

#### 4.9. Cristales líquidos del virus: Microscopía de luz polarizada

Diferentes muestras de virus, modificado y sin modificar, se colocaron en capilares de vidrio utilizando una micropipeta. Los tubos se sellaron con calor por los extremos y se mantuvieron en incubación cuando fue necesario. Se observó la formación de cristales líquidos utilizando un microscopio de luz polarizada Zeiss con platina giratoria. Asimismo, se observaron las mezclas de virus modificados con medio de cultivo que se utilizaron para crecer células hepáticas (HEPG2).

#### 4.10. Potencial zeta

Para obtener los valores de potencial zeta de los virus wt y modificados a diferentes valores de pH, se utilizó el Zetasizer de Malvern. Antes de realizar las mediciones, las muestras de los diferentes virus fueron dializadas contra reguladores de baja conductividad eléctrica. Los reguladores utilizados fueron: MES 20 mM (ácido 2-morfolino etano sulfónico, pH 5.5), MOPS 20 mM (ácido 3-morfolino propano sulfónico, pH 7) y CAPS 20 mM (ácido 3-ciclohexil amino propano sulfónico, pH 10). Se utilizaron las celdas capilares desechables DTS1060, las cuales se llenaron utilizando una micropipeta, evitando la formación de burbujas. Se realizaron por lo menos 3 mediciones utilizando el modelo de Smoluchowski, a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Se asignaron 120 s como tiempo de

equilibrio antes de cada medición. Asimismo, se llevó a cabo un mínimo de 30 corridas con un máximo de 120 para cada medición.

#### 4.11. Preparación de hidrogeles de virus modificados

Los virus modificados con diaminas y ácidos dicarboxílicos fueron precipitados y resuspendidos en medio DMEM con suero fetal al 10%. Al igual que en todos los protocolos antes descritos, cada material utilizado fue esterilizado, los virus siempre fueron manipulados frente al mechero. Antes de poner los virus en contacto con las células, fueron sembrados en placas de agar LB para determinar si se encontraban estériles. Posteriormente, los virus se mezclaron en diferentes proporciones para evaluar la formación de hidrogeles físicos. En la Tabla 9 se muestran las proporciones utilizadas.

Tabla 9. Proporciones para mezclar virus para la formación de hidrogeles

<b>Virus</b>	<b>Proporción de cada virus (%)</b>			
<b>fd</b>	50	50	-	-
<b>fd-ITA</b>	-	-	50	50
<b>fd-EDA</b>	50	-	50	-
<b>fd-DETA</b>	-	50	-	50

#### 4.12. Crecimiento de células HEPG2 en mezclas de virus modificados

Empleando las proporciones descritas en la Tabla 9 se generaron mezclas de virus modificados en medio DMEM con 10% suero fetal bovino y se colocaron 100  $\mu$ L de cada muestra en una microplaca de 96 pozos por duplicado (16 pozos en total). La microplaca con los virus se colocó en una incubadora celular durante 30 min, para permitir que la temperatura del medio alcanzara los 37 °C. Se preparó una suspensión concentrada de células HEPG2 adherentes (ATCC® HB-8065TM) a partir de una placa de cultivo en la que habían alcanzado la confluencia previamente, con una concentración final aproximada de  $1.5 \times 10^4$  células. 10  $\mu$ L de la suspensión celular fueron mezcladas suavemente con cada muestra de virus, y posteriormente se mantuvieron en incubación a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. El crecimiento de las células fue monitoreado periódicamente observando la placa en un microscopio invertido, al término de las primeras 72 horas se adicionaron aproximadamente 50  $\mu$ L de medio fresco suplementado y se continuó la incubación por 24 horas adicionales. Se volvió a adicionar medio fresco solo a los pozos en los que se observó que el pH del medio ya había cambiado debido al metabolismo de las células, lo cual ocurrió solo en los pozos sin virus y en los pozos con los virus fd wt, fd-ITA y fd-EDA + fd-EDA.

## 4.13. Espectroscopia Raman incrementada por superficie (SERS)

### 4.13.1. Preparación de muestras para SERS

En un microtubo se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra y se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de una suspensión recién preparada de nanopartículas de oro de 40 nm de diámetro. La suspensión se agitó vigorosamente utilizando un vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 h.

### 4.13.2. MicroRaman

Los espectros fueron obtenidos utilizando el DXR Raman Microscope (Thermo Scientific, USA), con un láser de estado sólido de 532 nm. Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión muestra-AuNP's en un soporte de  $\text{CaF}_2$ , dicho soporte se colocó sobre un portaobjetos en el porta muestras del microscopio. Se colectaron por lo menos 15 espectros por cada muestra, cada uno con tiempos de exposición de 10 s.

## 4.14. Análisis de Componentes Principales (PCA)

Cada espectro de Raman convencional o de SERS genera dos tipos de archivo, un archivo con extensión **.spa** que es reconocido por la mayoría de programas de visualización de espectros y un archivo con extensión **.csv**, un documento que presenta los datos en forma de tablas. En el archivo **.csv** los datos del espectro aparecen en dos columnas: la primera contiene todos los valores del corrimiento Raman (de 50 a 3600  $\text{cm}^{-1}$ ) y en la segunda columna, la intensidad Raman.

Con los archivos **.csv** se construyeron matrices de espectros: una tabla cuya primera columna contiene el corrimiento Raman y las columnas restantes contienen las intensidades para cada espectro. Las matrices se construyen con todos los espectros que se desea comparar. Estas matrices son analizadas mediante un algoritmo desarrollado en el programa MatLab® (Apéndice II) que lleva a cabo el análisis de componentes principales. Los picos de los espectros Raman fueron asignados utilizando bases de datos para espectroscopia Raman<sup>62</sup>.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El bacteriófago fd se reproduce infectando a las cepas macho de *Escherichia coli*, es decir, aquellas portadoras del pili F. En este trabajo se utilizó un método de producción y separación modificado a partir del utilizado por Purdy et al.<sup>57</sup>. El método original implica la infección de un cultivo de la bacteria *E. coli* XL1-Blue aproximadamente a la mitad de la fase exponencial con una semilla del virus fd. La semilla se preparó previamente a partir de placas turbias obtenidas en placas de medio LB con *E. coli* creciendo en forma de césped (Fig. 15b). Las placas fueron recortadas y adicionadas a matraces con el mismo medio de cultivo.

El método de Purdy incluye la adición por separado de PEG en polvo y de NaCl directamente al medio para precipitar a los virus, una vez disueltos ambos compuestos el medio se centrifuga para separar al virus precipitado. Una modificación importante a dicho método fue la preparación de la solución de PEG-NaCl, en nuestro caso se solubilizaron ambos compuestos en agua desionizada y se esterilizaron. Este procedimiento facilita la solubilización de los dos compuestos en el sobrenadante separado de los cultivos bacteria-virus, además de que asegura su esterilidad. Además, la mezcla se mantuvo por lo menos 24 h a 4 °C, se observó que al hacer esto incrementaba la cantidad de virus precipitado.

En la Fig. 16a y b se observan las micrografías obtenidas del virus producido y purificado. Un problema importante derivado de este método de precipitación de virus es que una cantidad indeterminada de polímero permanece asociada al virus, incluso después de varios días de diálisis. En un intento por mejorar la pureza de las suspensiones se preparó un gradiente de CsCl. Aunque se obtuvo una banda de virus bastante clara en el gradiente, esta sal provocó la agregación del virus (Fig. 16c) y la pérdida de infectividad (Fig. 15c). Utilizando regulador de Tris con concentraciones decrecientes de NaCl, se observó la desagregación parcial de los virus (Fig. 16d), sin embargo, no fue posible recuperar la infectividad del mismo (Fig. 15d).

En la Fig. 15c se observa una placa de agar con crecimiento de *E. coli* en césped, no se observaron placas turbias después de haber adicionado el virus purificado con CsCl y tampoco después de que estos virus se desagregaron con Tris-NaCl. Se sabe que el CsCl deteriora la capacidad infectiva de

los virus en general<sup>63</sup>, por lo que se probó un método diferente para purificar los virus utilizando gradientes de iodixanol (Optiprep®). Las soluciones de iodixanol aseguran la preservación de la infectividad viral, debido a que se trata de soluciones no iónicas que no alteran las proteínas del virus, especialmente aquellas relacionadas con el proceso de infección. En la Fig. 16e y f se observan los virus purificados utilizando iodixanol, los virus se observan desagregados. Al realizar la prueba de infectividad se obtuvieron placas turbias (imagen no mostrada).

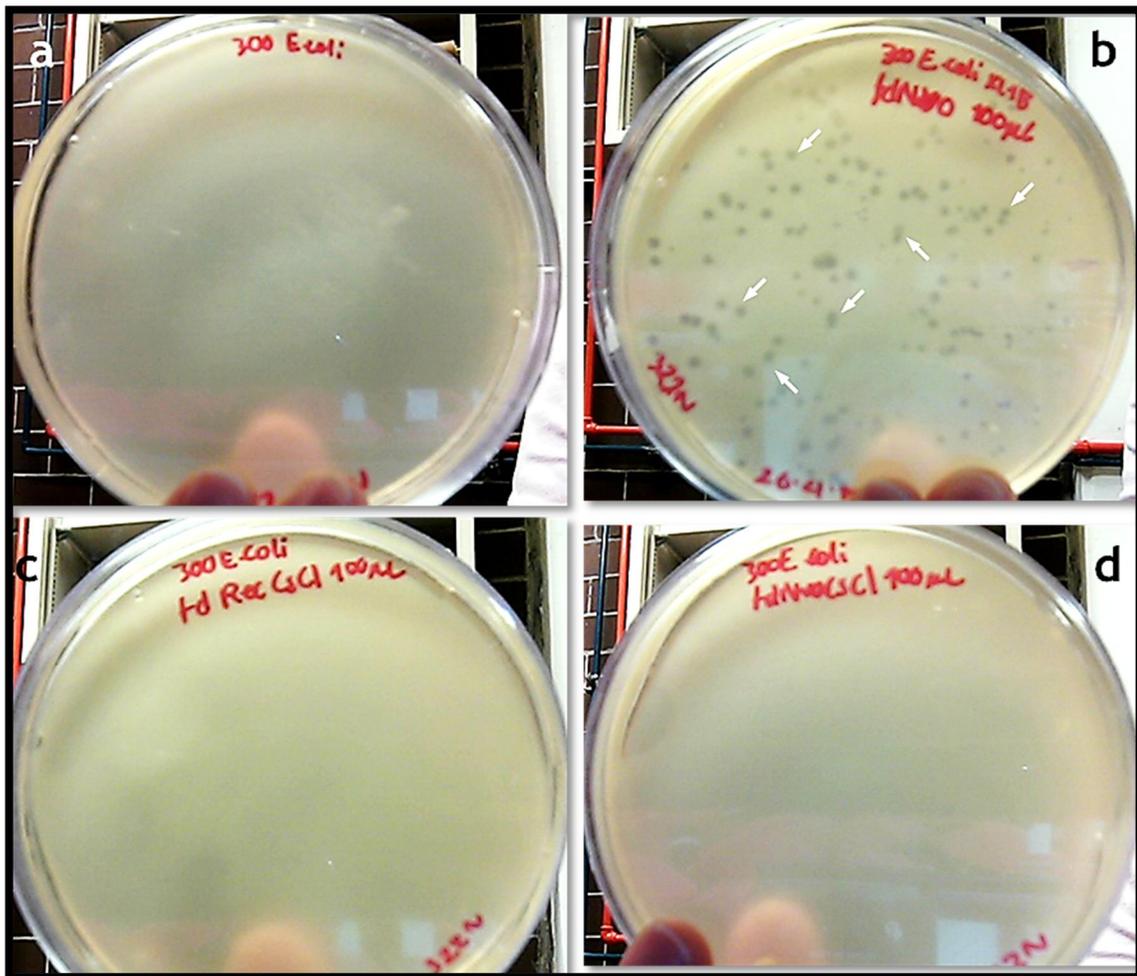


Fig. 15. Infectividad del virus fd producido. *Escherichia coli* a) creciendo en césped en medio LB, b) mezclada con el virus fd purificado solo centrifugando, c) mezclada con el virus purificado con CsCl y d) con el virus purificado con CsCl y desagregado con NaCl. Las manchas oscuras en (b) son en realidad placas turbias: zonas en las que el virus infectó a la bacteria disminuyendo su tasa de crecimiento, algunas se señalan con flechas. Dichas zonas aparecen como áreas más claras que el resto de la superficie de la paca en donde la bacteria crece a su ritmo normal.

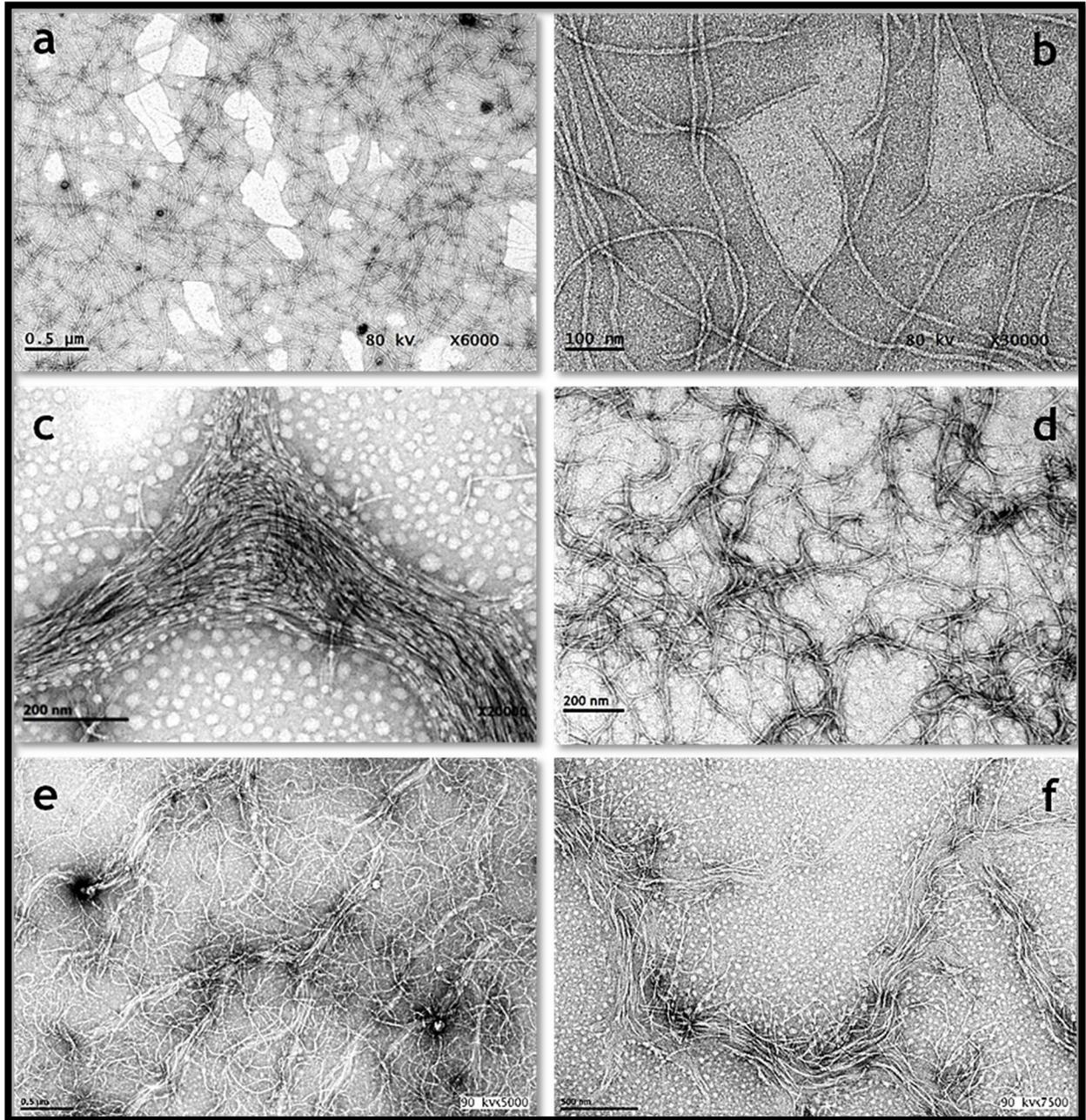


Fig. 16. Micrografías electrónicas del virus fd purificado con PEG: a y b) solo centrifugando; c y d) separado mediante un gradiente en CsCl; y e y f) separado mediante un gradiente en iodixanol (Optiprep).

Las suspensiones de virus filamentosos han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista de los sistemas coloidales y como líquido cristalino<sup>15</sup>, así como estudios reológicos a bajas frecuencias<sup>64</sup>. En nuestro caso caracterizamos suspensiones del virus mediante reología mecánica y

microreología, cambiando la concentración del virus y la fuerza iónica del medio. Una propiedad fundamental en un fluido es su viscosidad la cual depende, en fluidos no newtonianos, de la razón de corte a la que éste se someta. En la Fig. 17 se muestran las curvas de flujo para suspensiones de virus con diferente fuerza iónica. La viscosidad de las muestras es muy alta al inicio de la medida y va disminuyendo con el aumento de la razón de corte. En algunos casos (C25-S225/S300/S400 y C20-S100) ocurrió un cambio abrupto en la viscosidad que se observa como un pico. Los virus en suspensión se encuentran desordenados al inicio, conforme aumenta la razón de corte adquieren cierto grado de orientación pues son arrastrados con el flujo de la suspensión. Sin embargo, en cierto punto, los virus comienzan a dar "volteretas" (*tumbling*) que desordenan momentáneamente el sistema incrementando la viscosidad<sup>65</sup>. Los virus recuperan de inmediato el orden conforme aumenta la razón de corte, por lo que fluyen de manera más ordenada (*waging*)<sup>66</sup> y la viscosidad disminuye. Graf et al.<sup>64</sup> observaron que la viscosidad de suspensiones de virus incrementa con la concentración del virus debido a la interacción de Coulomb entre las partículas virales.

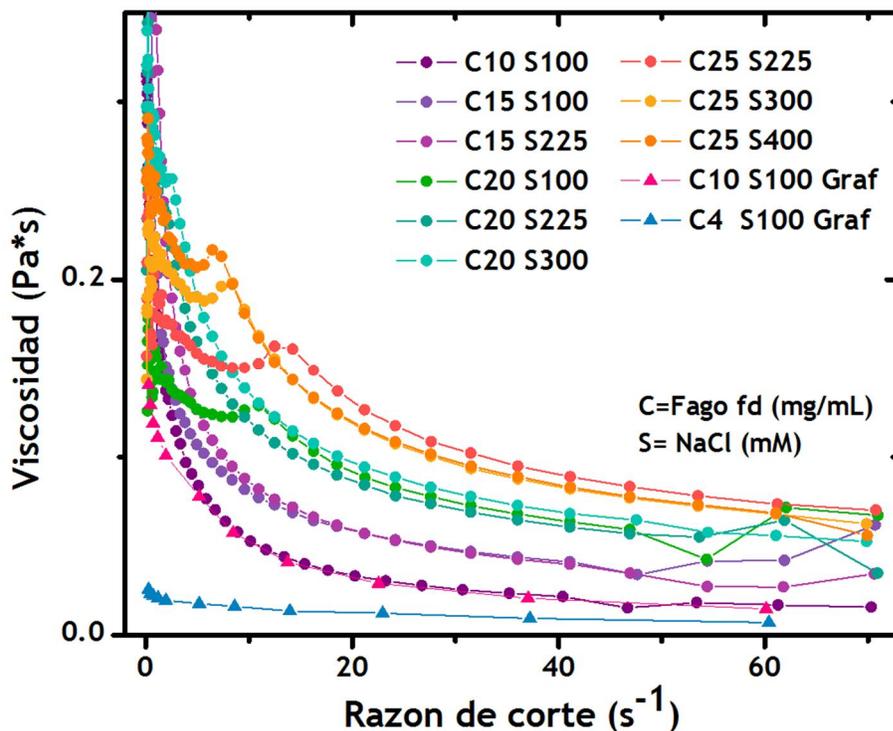


Fig. 17. Viscosidad vs razón de corte de suspensiones con diferente concentración de virus y de NaCl<sup>64</sup> obtenidas a 25°C en un reómetro mecánico utilizando la geometría cono-plato. Los círculos indican los experimentos realizados en este trabajo mientras que los triángulos indican los resultados de Graf et al.<sup>64</sup>

A bajas razones de corte y antes de los picos en los que la viscosidad aumenta, la suspensión con la mayor fuerza iónica es la que presenta la mayor viscosidad. Puesto que una mayor viscosidad está relacionada con un mayor grado de desorden del sistema, es posible que la presencia de más cargas positivas enmascare la carga negativa de los virus. Los virus son entonces más flexibles por lo que no se orientan con el resto de los virus hacia la misma dirección. El efecto de la fuerza iónica sobre la viscosidad parece ser mínimo cuando se alcanzan mayores razones de corte.

Cabe mencionar que para las suspensiones de virus con 25 y 20 mg/mL la transición de tumbling ocurre en el siguiente orden: 400 mM→300 mM→225 mM y 300 mM→225 mM→100 mM, respectivamente. Esto parece indicar que, con una mayor fuerza iónica en el medio, los virus se desordenan con mayor facilidad, lo que incrementa la viscosidad del fluido.

El comportamiento viscoelástico (módulos elástico y viscoso) de suspensiones de virus también se estudió mediante reología mecánica y microreología por DWS. El módulo de corte complejo, describe la respuesta en general que presenta un fluido cuando sufre una deformación. El módulo complejo posee una componente real y una compleja. La parte compleja, conocida como módulo viscoso, es una medida de la energía que se disipa en un material que ha sufrido una deformación, mientras que la parte real del módulo complejo o el módulo elástico se refiere a la energía que se almacena en el sistema sometido a una deformación.

Mediante un reómetro mecánico se puede obtener el comportamiento viscoelástico del fluido solo a bajas frecuencias mientras que con microreología pueden determinarse frecuencias de intermedias a altas, utilizando, volúmenes pequeños de muestra. En este caso la muestra es embebida con partículas de látex a una concentración tal (porcentaje de llenado) que no interactúan. El movimiento Browniano de dichas partículas es monitoreado mediante la dispersión dinámica múltiple de luz (proveniente de un láser). A partir del desplazamiento cuadrático medio de las partículas se pueden determinar los módulos elástico y viscoso del fluido pues el movimiento de las partículas depende de las estructuras supramoleculares que conforman el fluido. Cuando se utilizó DWS se evaluó el efecto de las variaciones en la concentración del virus y la fuerza iónica del medio sobre el desplazamiento cuadrático medio de microesferas embebidas en las suspensiones a tiempos cortos (frecuencias altas).

En la Fig. 18a se observan los módulos elásticos y viscosos a bajas frecuencias ( $0.1 \leq \omega \leq 30$  rad/s) para muestras con concentraciones fijas de virus (20 y 25 mg/mL) y diferente concentración de NaCl y para una concentración fija de NaCl (225 mM) y diferentes concentraciones de virus. Se puede observar que por encima de los 20 rad/s el módulo elástico es mayor que el viscoso ( $G''(\omega) \geq G'(\omega)$ ) en todas las suspensiones. Antes y después de los cruces de los módulos (Fig. 8a y b), la suspensión de virus tiene un comportamiento principalmente viscoso.

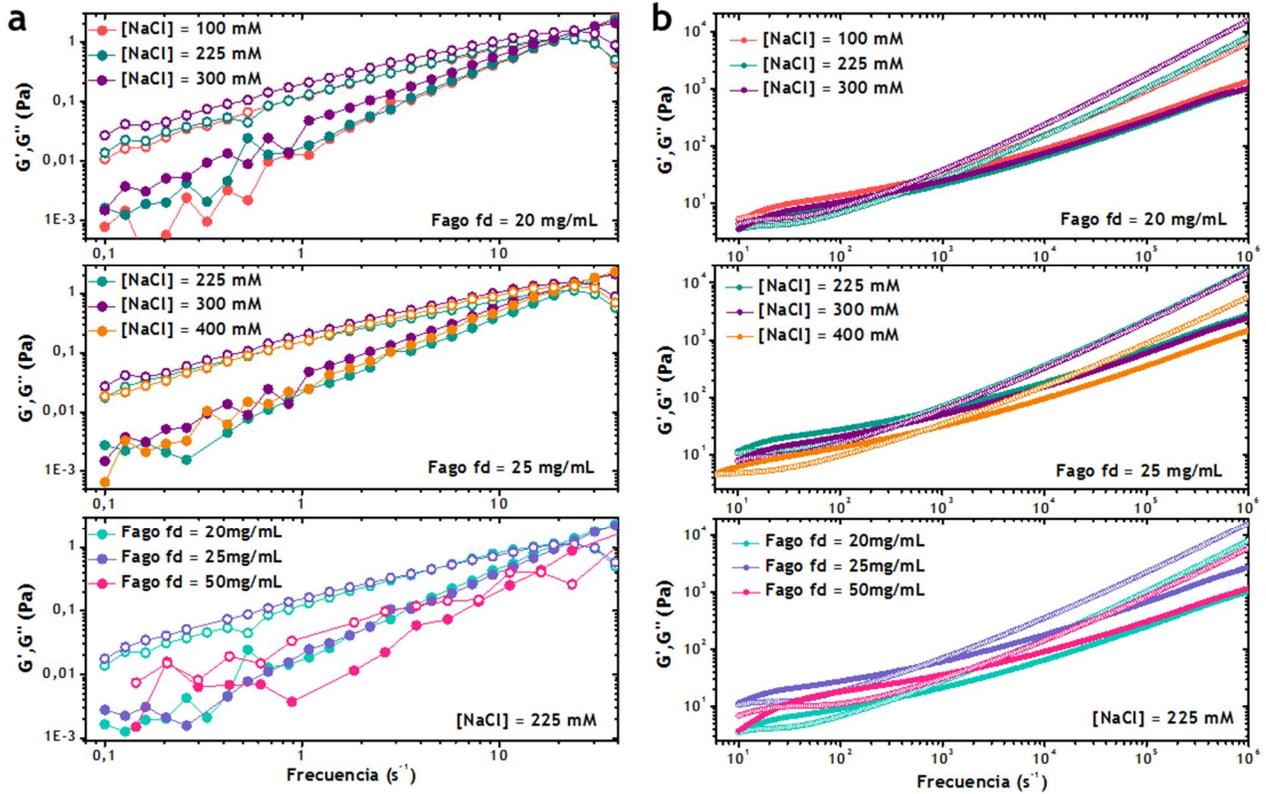


Fig. 18. Módulos elástico y viscoso ( $G'(\omega)$  y  $G''(\omega)$ ) en función de la velocidad angular para diferentes concentraciones de virus y de NaCl. Los símbolos llenos corresponden al módulo elástico y los abiertos al módulo viscoso. a) Reología mecánica para frecuencias de  $0.1 \leq \omega \leq 30$  rad/s. b) Microreología mediante DWS para frecuencias de  $2 \leq \omega \leq 10^6$  rad/s.

En la Fig.18b se presentan  $G'(\omega)$  and  $G''(\omega)$  en función de la frecuencia angular ( $2 \leq \omega \leq 10^6$ ) para las mismas suspensiones de virus. La fuerza iónica parece no tener efecto importante en la suspensión de virus de 20 mg/mL, a diferencia de la muestra con 25 mg/mL en la cual el módulo elástico es mayor con la concentración más baja de NaCl utilizada (225 mM). Por otro lado, en el caso de las muestras con diferente concentración de virus y fuerza iónica de 225 mM de NaCl, la suspensión con mayor concentración de virus tiene los valores más altos para el módulo elástico<sup>60</sup>.

Vale la pena mencionar que, con ambas técnicas, reología mecánica y microreología, se observa el primer cruce de los módulos  $G'(\omega)$  y  $G''(\omega)$ , lo cual es muy importante pues en ambos casos es evidente que ha ocurrido un cambio en el comportamiento general del fluido<sup>60</sup>. Las suspensiones de virus pueden ser consideradas viscoelásticas, con un intervalo de frecuencias pequeño en el que es elástica, pero con un comportamiento principalmente viscoso. Comparados con otros sistemas coloidales de estructuras filamentosas, los virus tienen la ventaja de ser monodispersos, algo difícil de encontrar entre los polímeros de cualquier tipo, además los virus son suficientemente rígidos como para no romperse (a menos que sufran esfuerzos de corte excesivos) contrario a lo que ocurre con las micelas tubulares que sufren rupturas de manera continua. El comportamiento reológico de las suspensiones de virus es parecido al de los polímeros semirrígidos y las micelas tubulares rígidas. Esta comparación se incluye en el trabajo de Sarmiento et. al<sup>60</sup> en el que se incluyen los resultados obtenidos para el virus fd.

Muchas suspensiones coloidales compuestas por filamentos o bastones presentan la propiedad de cristal líquido. Este es el caso del virus fd que a concentraciones mayores a 50 mg/mL muestra la textura típica de la fase colestérica (Fig. 19). En esta fase los virus se acomodan en capas, solo que en cada capa el ángulo de inclinación de los virus cambia ligeramente por lo que forman una especie de estructura en espiral.

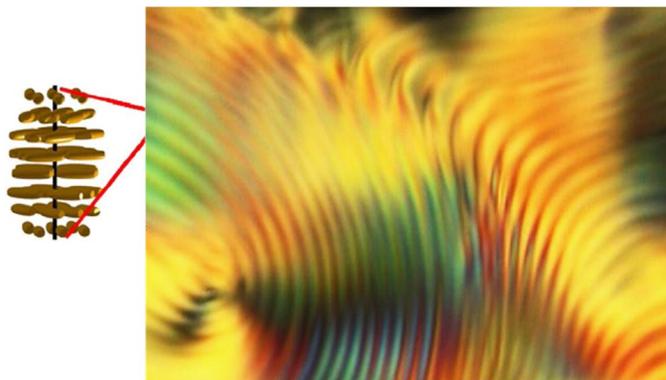


Fig. 19. Estructura del cristal líquido en la fase nemática de una suspensión del virus fd (63 mg/mL) obtenida mediante microscopía y polarizadores cruzados. El esquema a la izquierda representa los virus ordenados por capa y cambiando el ángulo de inclinación en cada capa a manera de espiral. Un giro completo corresponde a una franja en la microestructura del cristal líquido.

Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, el hecho de que los virus de tipo filamentosos sean capaces de ordenarse como cristales líquidos los vuelve muy atractivos para el desarrollo de materiales ordenados, o finalmente, para que otros materiales o moléculas se ordenen

en su superficie. Es interesante el uso del virus M13 en su fase de líquido cristalino para el crecimiento de fibroblastos<sup>67</sup> y preosteoblastos<sup>68</sup>, en ambos casos las células crecieron alineadas, siguiendo la orientación de los virus en el seno del medio de cultivo. El cristal líquido del virus fd (Fig. 19) también fue utilizado para probar el crecimiento de células HEPG2, como se explicará más adelante.

### 5.1. Síntesis de nanopartículas de oro

Se produjeron nanopartículas de oro utilizando el método de Turkevich modificado<sup>58</sup>, en el que se utiliza citrato como reductor y un método modificado que incluye además del citrato, el reductor fuerte borohidruro de sodio<sup>11</sup> ( $\text{NaBH}_4$ ). Utilizando estos métodos obtuvimos nanopartículas de aproximadamente 5, 20 y 40 nm de diámetro. En la Fig. 20 se observan las micrografías de los tres tipos de AuNPs que se obtuvieron. Utilizando el método de Turkevich modificado obtuvimos AuNP's de 40 nm cuando se utilizaron concentraciones equimolares de  $\text{HAuCl}_4$  y de citrato de sodio, y de 20nm cuando se utilizó el doble de concentración del citrato. Por otro lado, utilizando el método con  $\text{NaBH}$  como reductor obtuvimos AuNP's de aprox. 5-8 nm de diámetro. Esta diferencia de tamaños radica en las concentraciones y naturaleza del agente reductor, mientras mayor sea la concentración de éste o mayor su reactividad, las nanopartículas serán mucho más pequeñas.

Un problema importante acerca de la producción de nanopartículas es el cálculo de la concentración. Aunque existen muchos métodos para calcular la concentración de las nanopartículas elegimos el propuesto por Liu et al.<sup>59</sup>, pues calcula la concentración considerando que se trata de partículas discretas y homogéneas por lo que la concentración entonces depende de su tamaño (diámetro), de la densidad y de su masa. Este método relaciona el diámetro de las nanopartículas observado mediante TEM y la concentración de la sal de oro utilizada en la reacción, considera, además, que las nanopartículas son esféricas y que durante la reacción se consume el 100% de los reactivos. De esta manera se obtuvieron las dimensiones de las nanopartículas analizando las imágenes de TEM obtenidas con el programa de cómputo mencionado en la sección de métodos.

La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos en la síntesis de nanopartículas de oro. Obtuvimos nanopartículas de 4.77, 22.5 y 40.63 nm de diámetro en promedio, utilizando estos y los datos de las reacciones llevadas a cabo, calculamos la concentración de las nanopartículas con las

ecuaciones del apartado 4.10 desarrolladas por Liu et al.<sup>59</sup>. A pesar de que este método hace varias consideraciones como el consumo total de reactivos o la formación de nanopartículas perfectamente esféricas, nos da un valor aproximado para las síntesis realizadas. Podemos apreciar que la concentración de nanopartículas aumenta conforme disminuye su tamaño, a pesar de que se utilizaron las mismas concentraciones de  $\text{HAuCl}_4$  y se manejaron casi los mismos volúmenes de reacción. Como es de esperarse, el número de nanopartículas pequeñas por unidad de volumen de solución siempre será mayor que el de nanopartículas más grandes.

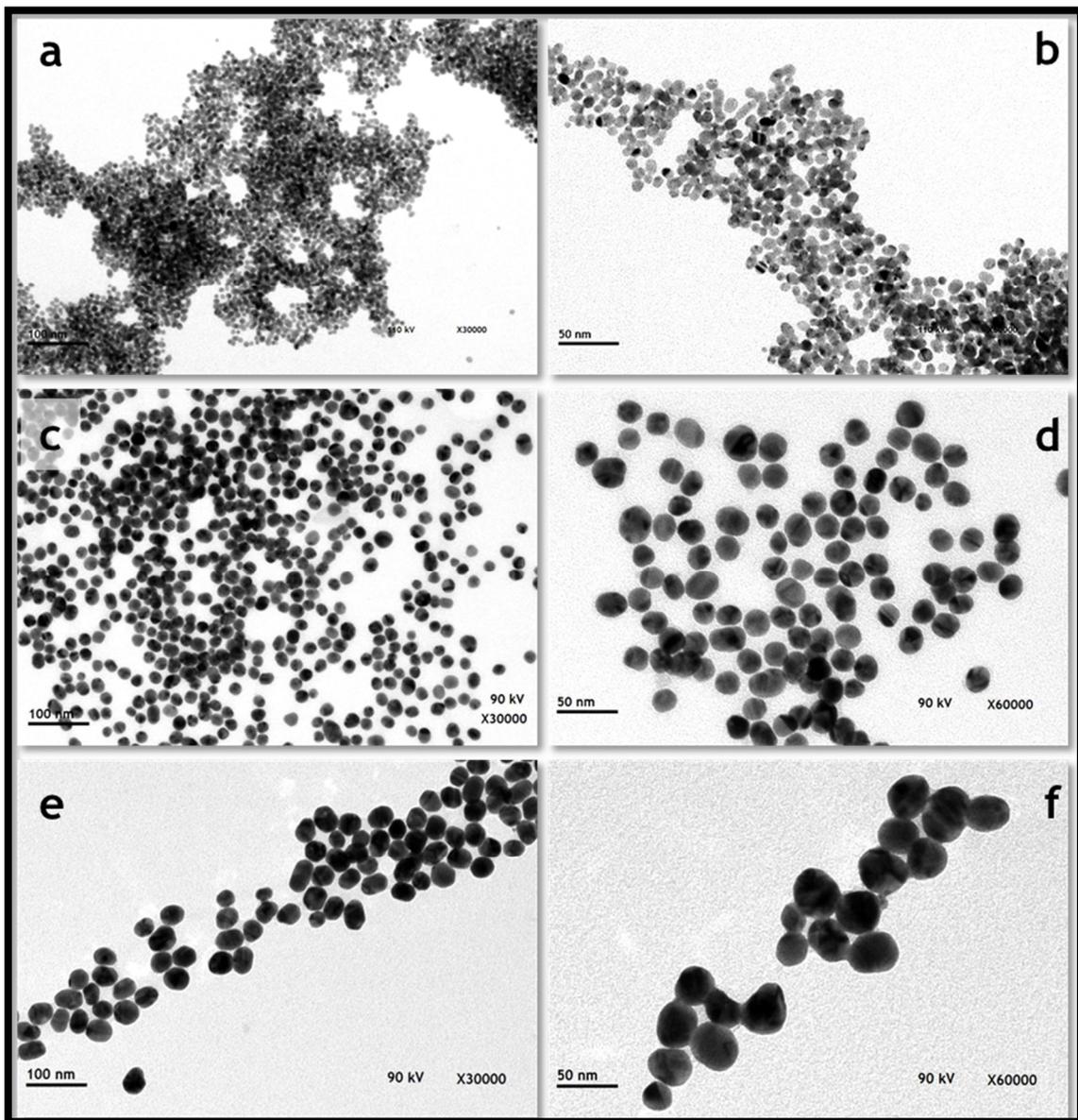


Fig. 20. Micrografía electrónica de las diferentes nanopartículas de oro (estructuras semiesféricas electrodensas) sintetizadas. a, b) 8 nm; c, d) 15 nm y e, f) 40 nm. No se utilizó ningún contraste.

Tabla 10. Cálculo de la concentración de AuNP's

Parámetros	Tamaños esperados de las AuNPs		
	5nm	20nm	40nm
<b>D [Diámetro promedio (nm)]</b>	4.77	22.5	40.63
<b>N [No. promedio de átomos de Au por nanoesfera]</b>	$3.35 \times 10^3$	$3.58 \times 10^5$	$1.98 \times 10^6$
<b>N<sub>total</sub> [HAuCl<sub>4</sub> (mol)]</b>	$2.52 \times 10^{-5}$	$2.52 \times 10^{-5}$	$2.52 \times 10^{-5}$
<b>V [Vol. de reacción (L)]</b>	0.0212	0.02	0.02
<b>C (concentración molar de nanopartículas en solución)</b>	$3.55 \times 10^{-7}$	$3.58 \times 10^{-9}$	$6.08 \times 10^{-10}$

## 5.2. Reacciones de reducción de los virus

El bacteriófago fue utilizado como materia prima para la producción de bionanomateriales conjugados con nanopartículas de oro. Después de modificaciones químicas controladas, fue posible obtener dos tipos de estructuras: virus con nanopartículas unidas a uno de los extremos de la partícula viral y estructuras tipo nanocable, esto es, haces de virus unidos lateralmente y recubiertos con nanopartículas de oro. Se sabe que las nanopartículas de oro forman enlaces muy fuertes con los grupos tiol pues se establece un enlace de tipo dativo entre el oro y el átomo de azufre. La unión entre nanopartículas de oro a una biomolécula depende de la presencia de grupos funcionales que puedan interactuar con las cargas de la nanopartículas o que puedan formar enlaces. Particularmente, la presencia de tioles libres favorece considerablemente la unión, tomando en cuenta esto aprovechamos el hecho de que en la estructura del bacteriófago fd existen tioles libres en las proteínas de los extremos (pIII, pVI, pVII y pIX, Tabla 3).

Se sabe que la nanopartícula de oro es capaz de formar enlaces con átomos de azufre aunque estos formen parte de puentes disulfuro<sup>11</sup>. Sin embargo, en nuestros experimentos observamos que, si los puentes disulfuro del virus no son reducidos antes de adicionar las AuNP's, la cantidad de nanopartículas que se une es mucho menor que cuando se generan tioles libres mediante un agente reductor. Para eliminar la presencia de puentes disulfuro que pudieran afectar la interacción entre el átomo de azufre y la superficie de la nanopartícula de oro se analizaron tres diferentes reductores de puentes<sup>69</sup>: β-mercaptoetanol (βMEtOH), TCEP y NaBH<sub>4</sub> tanto a 20 como a 40 °C. En las Fig. 21a y 21b se observan conjugados fd-Au después de que el virus fue reducido con βMEtOH. Las

nanopartículas se agregaron y se localizaron en las puntas de los agregados de virus o sobre ellos. Aunque con TCEP no se formaron agregados de nanopartículas y estas se unieron claramente a la punta de los virus (Fig. 21c y d), el número de nanopartículas unidas no fue muy grande, probablemente no todos los disulfuros fueron abiertos, lo cual impidió el acceso de las nanopartículas. Por último, el  $\text{NaBH}_4$  demostró ser más efectivo para abrir puentes disulfuro, se observó agregación de virus y NP en un grado mucho menor que con TECP y con  $\beta\text{MEtOH}$ , además de que se sabe que este reductor tiene la ventaja de no afectar a la mayoría de los grupos funcionales presentes en las proteínas y que son capaces de reducir disulfuros sin necesidad de agregar desnaturizantes a la proteína en cuestión<sup>69</sup>. El número de nanopartículas sobre los virus fue mucho mayor que con los otros reductores (Fig. 21e), se observó que las nanopartículas se localizaron solo sobre la superficie de los agregados virales (Fig. 21e) o en las puntas libres de los virus (Fig. 21f). En todos los casos las reacciones tuvieron mayor éxito al llevarse a cabo a 40 °C que a 20 °C (insertos en Fig. 21a, 21c y 21e).

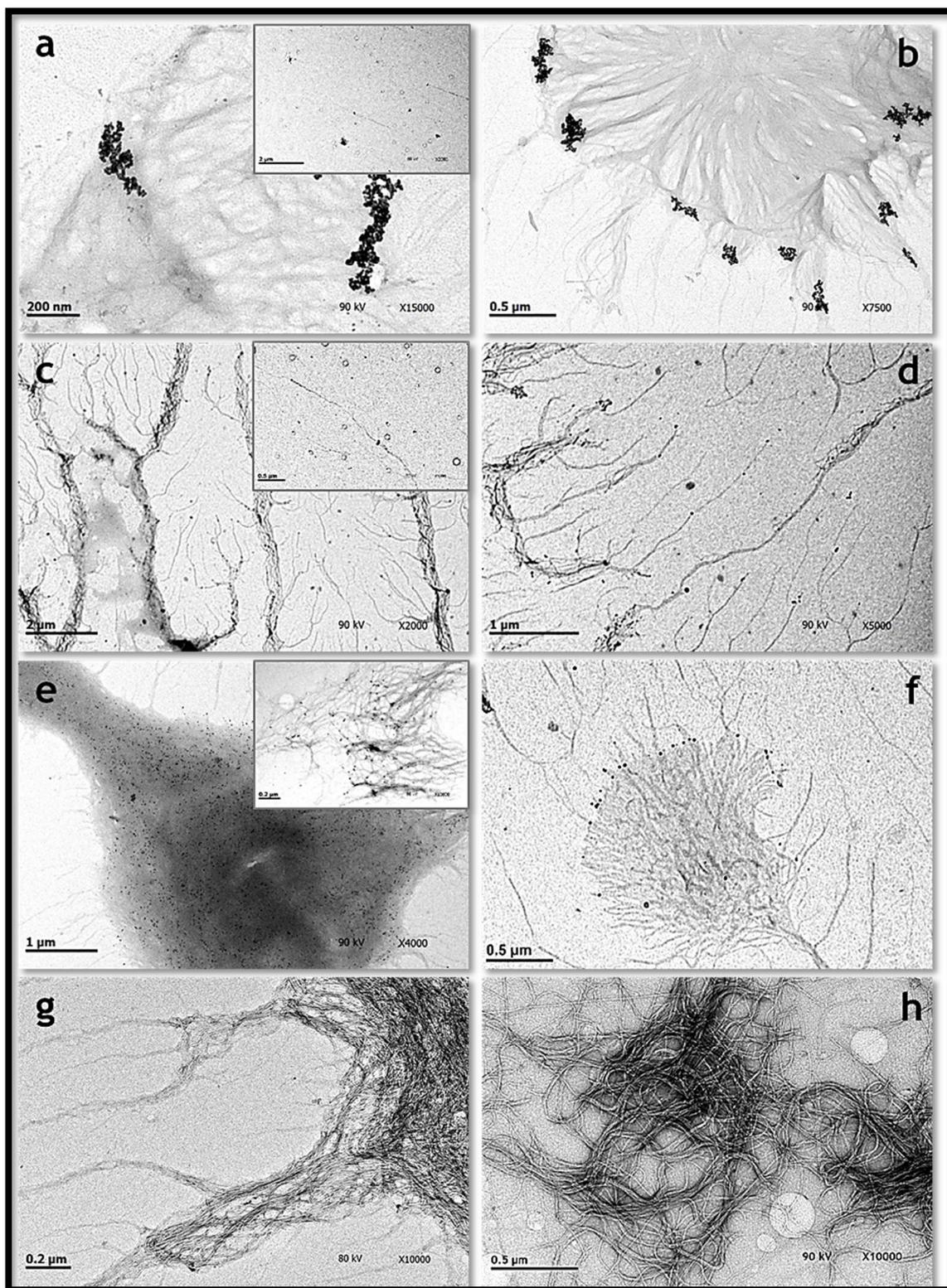


Fig. 21. Virus fd wt conjugados con AuNPs, contrastados con acetato de uranilo al 2%. Los virus fueron previamente reducidos utilizando a, b)  $\beta$ -mercaptoetanol; c, d) TCEP; e, f)  $\text{NaBH}_4$ . En (g) se muestra el virus fd sin reducir y con AuNP's, no se observan NP's unidas a los virus. h) Virus fd después de ser reducido con  $\text{NaBH}_4$ . Las reacciones se llevaron a cabo a 25°C (insertos) y 40°C (imágenes en grande). Las AuNPs se adicionaron inmediatamente después de la reducción y la remoción del reductor.

### 5.3. Reacciones de bioconjugación fd-cys

#### 5.3.1. fd-Traut

El reactivo de Traut permite la introducción de grupos tiol (que es parte de la estructura del mismo reactivo) en la superficie de proteínas<sup>11</sup>, lo que genera un sitio reactivo muy particular pues permite unir nanopartículas de oro fácilmente dada la gran afinidad de este metal nanoestructurado por los átomos de azufre. Se adicionaron nanopartículas a los virus bioconjugados con moléculas de iminotiolano y además reducidos con  $\text{NaBH}_4$ , sin embargo, no se observó una gran presencia de nanopartículas sobre la superficie de los virus (Fig. 22).

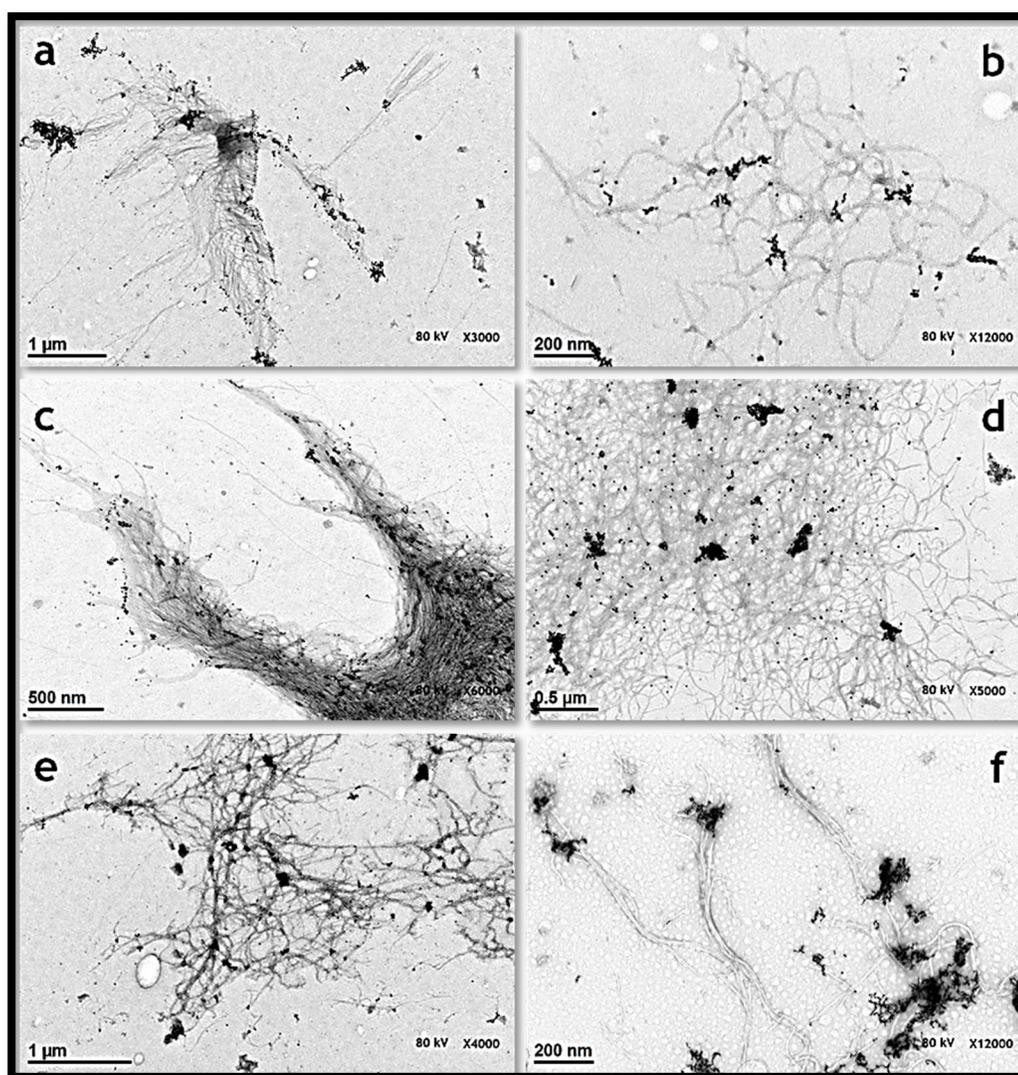


Fig. 22. a-f) virus fd bioconjugados con iminotiolano y AuNPs de 8nm. En algunos casos las nanopartículas se unieron en las puntas de los agregados de virus, se observa además, la ausencia de partículas fuera de los agregados virales, lo que indica la alta afinidad de las mismas por el grupo tiol del iminotiolano.

Se observó que las nanopartículas se unen en las puntas de los virus que, además, sufrieron agregación. Este fenómeno puede haber ocurrido debido a la interacción entre grupos tiol vecinos que forman puentes disulfuro entre virus y virus. Además de la agregación de las partículas virales, las nanopartículas de oro se unieron a la superficie de los virus más bien formando agregados (Fig. 22). Aunque aún no queda clara la causa de esta agregación, es muy probable que una remoción deficiente del reductor provocara dicho fenómeno. Por otro lado, es posible que la baja cantidad de nanopartículas se debiera a que no hubo suficientes moléculas de iminotiolano unidas en la superficie del virus, y no resultó rentable incrementar la concentración del reactivo de Traut para solventar esta deficiencia por lo que se decidió utilizar otra molécula portadora de grupos tiol, el aminoácido cisteína.

### 5.3.2. Reacción con intercaladores de longitud cero

Para lograr la unión entre moléculas de cisteína y el virus fd se utilizó una reacción de bioconjugación mediada por carbodiimidas, en la cual una amina primaria forma un enlace covalente entre un carboxilo, es decir, un enlace tipo amida<sup>11</sup>. Se escogió el aminoácido cisteína pues cubre los requerimientos de ser una molécula pequeña que posee un grupo tiol, así como una amina primaria y un carboxilo que pueden reaccionar con los carboxilos o aminas en la superficie del virus (Fig. 23).

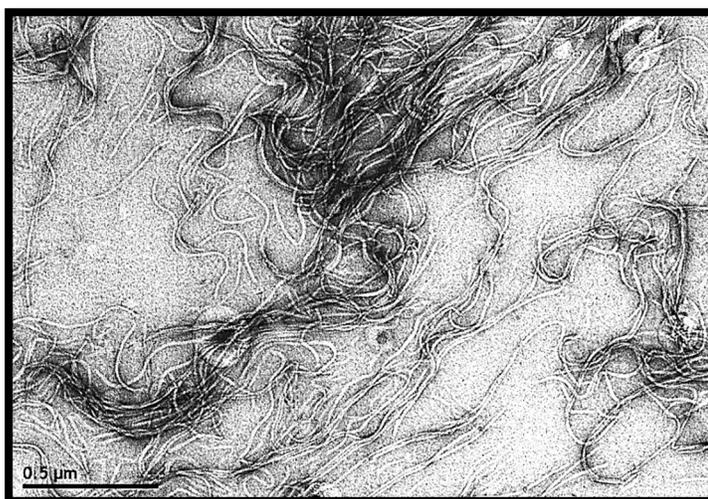


Fig. 23. Micrografía electrónica del virus fd bioconjugado con cisteína. Los filamentos se observan iguales a los del virus sin modificar, no se aprecia algún cambio debido a la adición de la cisteína, aunque esta fue utilizada en una concentración alta.

#### 5.4. Formación de bionanocompositos fd-AuNP's

Los primeros bionanocompositos obtenidos fueron aquellos formados por nanopartículas de oro unidas a la punta de las partículas virales con nanopartículas. En estos experimentos realizados como control, se utilizaron nanopartículas de 5 y 20nm de diámetro, en la Fig. 24 se observan partículas virales con una nanopartícula en la punta.

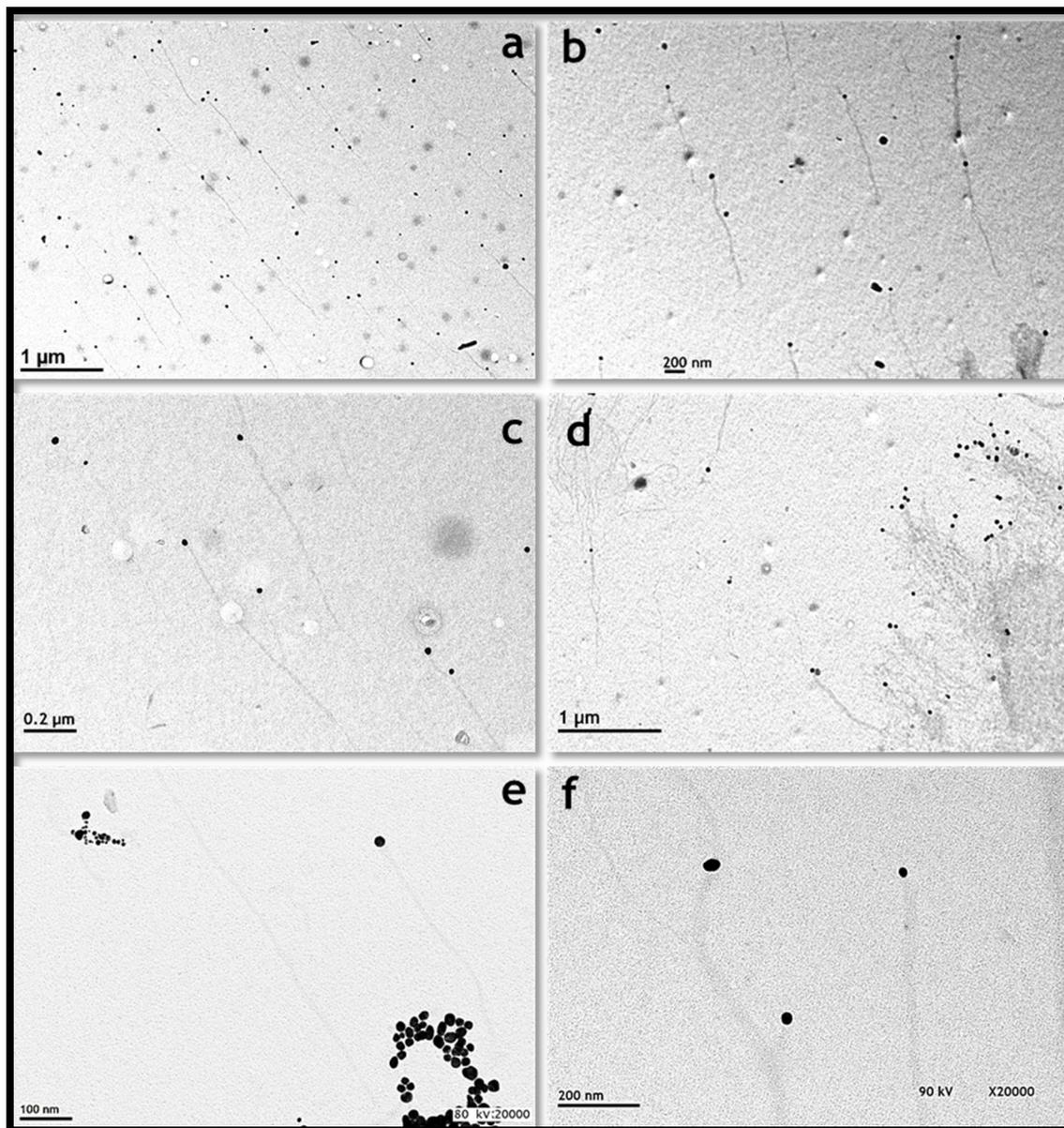


Fig. 24. Virus fd wt unidos a AuNPs. Las partículas se unieron en las puntas de los virus.

El hecho de que solo una de las puntas de los virus esté unida a una partícula tiene que ver con que en uno de los extremos del virus se concentra la mayor parte de cisteínas nativas, alrededor de 35 comparadas con aproximadamente 6 del otro lado (Tabla 3). Es muy probable que la

nanopartícula esté unida en la parte del virus en la que se encuentra la proteína pIII, el extremo con el mayor número de grupos tiol. Cabe mencionar que incluso en presencia de virus agregados, las NP's se unieron a las puntas libres de los mismos (Fig. 24d).

La obtención de nanocables se llevó a cabo utilizando bacteriófagos modificados químicamente y el mismo proceso utilizado para unir NP's. La superficie de los virus fue modificada utilizando una reacción de bioconjugación mediada por carbodiimidas. En esta reacción, un carboxilo reacciona con una amina primaria para formar un enlace de tipo amida. Se utilizó esta reacción para conjugar moléculas de cisteína, aminoácido con un grupo tiol libre, con los grupos amino del virus fd. La reacción ocurre en la región expuesta al disolvente de la proteína pVIII<sup>70</sup>, siendo esta la más abundante en la estructura del virus con aproximadamente 2700 copias. Los aminoácidos que son sensibles a reaccionar con el grupo amino de la cisteína son el ácido glutámico en posición, 5, 7 y 8 y el aspártico en la posición 3 y 9; los que pueden reaccionar con el carboxilo de la cisteína incluyen al amino terminal, y las lisinas en posición 12 y 17<sup>70</sup>. Para disminuir la posibilidad de que ocurrieran reacciones cruzadas entre las partículas virales, la concentración de las mismas se mantuvo muy baja, mientras que la de cisteína se adicionó en exceso, como se observa en la Fig. 23.

Una vez que los virus modificados fueron purificados mediante diálisis se sometieron a la reacción de conjugación con AuNPs llevada a cabo antes con los virus wt. Durante dicha reacción se observó la formación de agregados que precipitaban en el fondo del tubo conforme pasaba el tiempo de reacción, dichos agregados fueron más abundantes a mayores concentraciones de virus (Fig. 25). Se observó en las micrografías electrónicas (Fig. 26a y b) que, aunque las nanopartículas se unen a la superficie del virus, existían zonas muy amplias en las cuales no se unió ninguna partícula. Los virus modificados con cisteína fueron utilizados de nuevo para reaccionar nuevamente con moléculas de cisteína. Esta segunda ronda de bioconjugación y el uso de suspensiones muy concentradas de nanopartículas favorecieron la formación de estructuras tipo nanocable de oro mucho más definidas (Fig. 26c-f). No es claro por qué no es suficiente una ronda de bioconjugación utilizando a la cisteína en exceso, aunque es posible que las moléculas de dicho aminoácido reaccionen entre sí mismas generando péptidos pequeños dispersos en el medio de reacción que no se unen fácilmente a la superficie del virus por impedimento estérico.

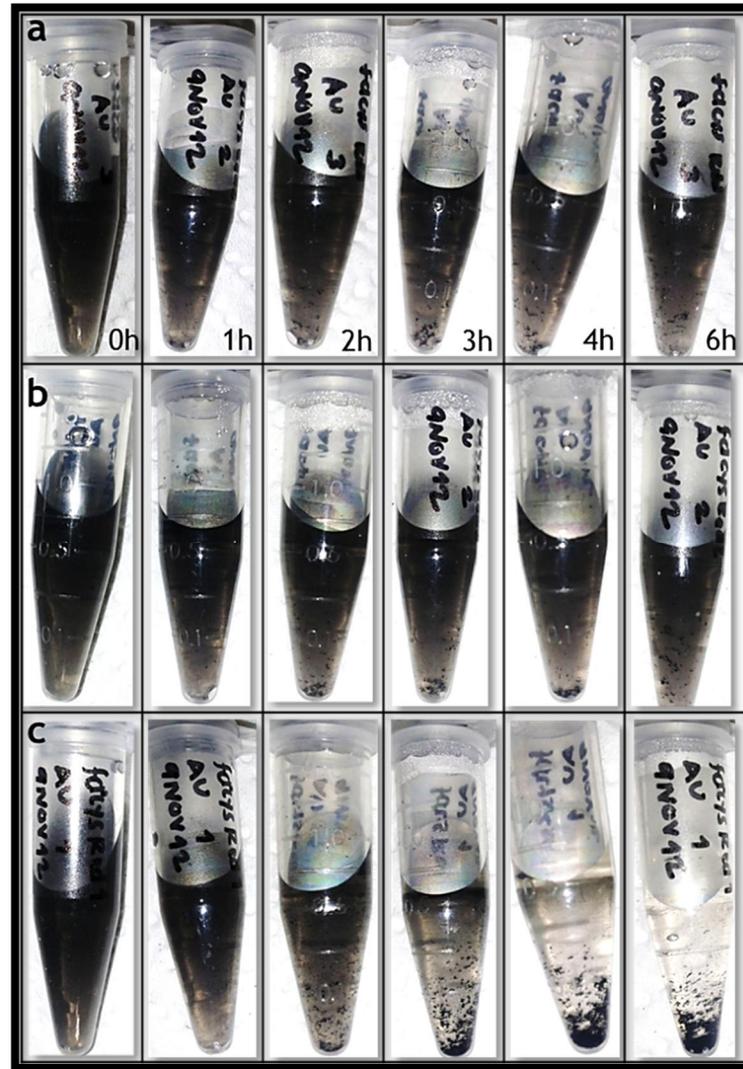


Fig. 25. Formación de bioconjugados entre el virus fd-cys y AuNPs. La reacción se siguió durante 6 h. Se utilizó la misma concentración de nanopartículas en los tres casos, se varió la concentración de virus fd-cys: a) 5 ng, b) 50 ng y c) 500 ng. El precipitado corresponde a la unión de los virus con las AuNP's.

Después de agitar vigorosamente los tubos con agregados precipitados se tomó una muestra para ser analizada mediante TEM. Se pudieron observar haces de bacteriófagos recubiertos con AuNPs, cuyo número aumentó cuando se realizó la reacción utilizando virus modificados dos veces con cisteína, es decir, a mayor cantidad de cisteínas unidas en la superficie de los virus, mayor cantidad de NP's adheridas. Asimismo, se observaron también grandes agregados de nanopartículas (Fig. 26), no está claro qué es lo que propicia la adhesión de más partículas, aunque de hecho se intentó eliminar el exceso mediante sonicación. Tiempos de sonicado de hasta 1 minuto no pudieron eliminar las nanopartículas adheridas, pero aparentemente tampoco afectaron la estructura de los nanocables (Fig. S6, Apéndice IV).

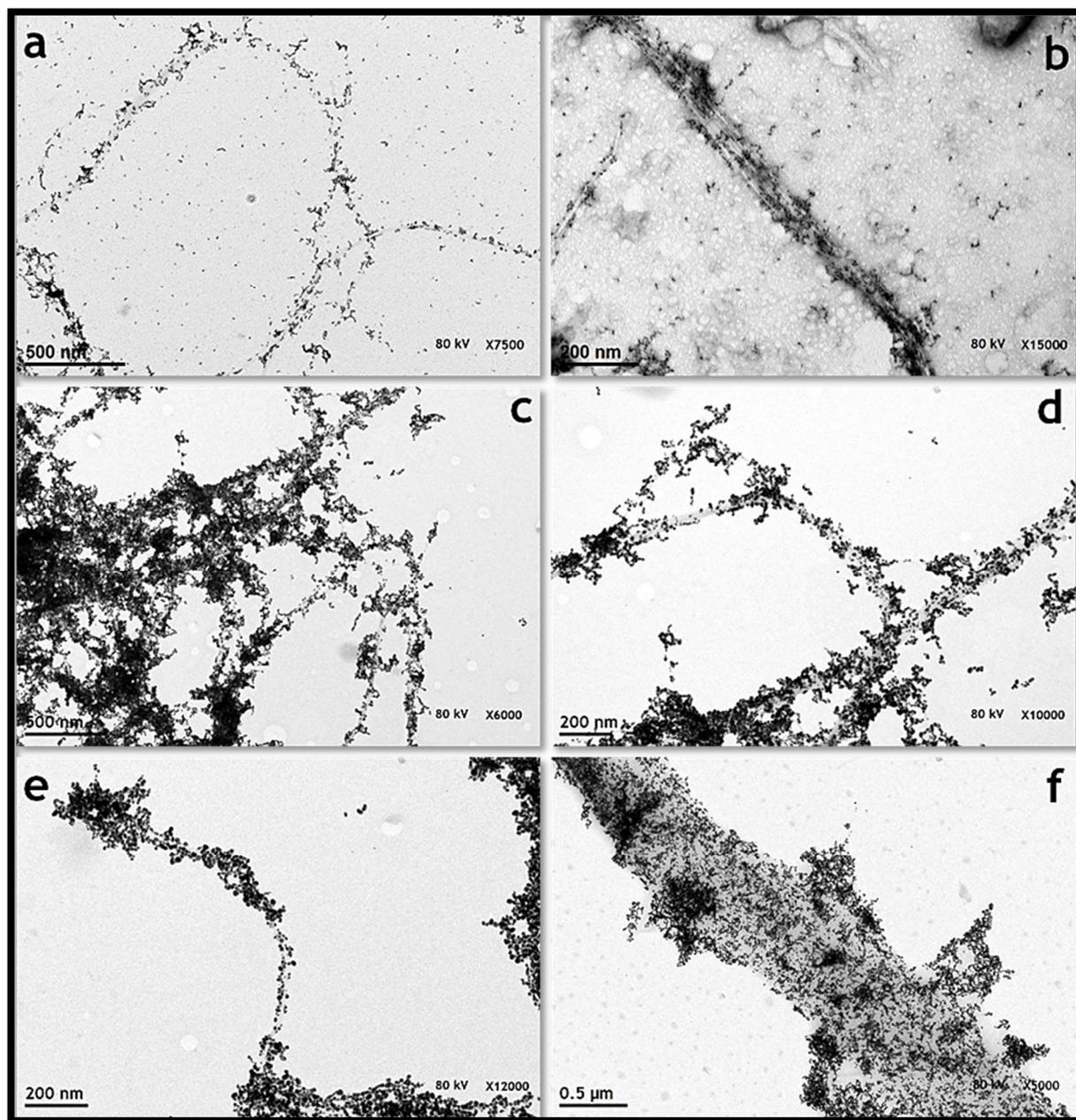


Fig. 26. Estructuras de tipo nanocable formadas entre los virus fd-cys y AuNPs. Se utilizaron virus con una (a, b) o dos rondas (c-f) de reacción entre el virus fd y cisteína. La cantidad de AuNPs es mayor cuando se adicionaron más moléculas de cisteína (c-f).

No se pudieron obtener partículas virales aisladas recubiertas de oro, a diferencia de cuando la partícula se unía a la punta del virus, en todos los casos se observaron haces de virus unidos lateralmente (Fig. 26). Los virus modificados con cisteína fueron analizados mediante TEM justo después de llevarse a cabo la reducción de los puentes disulfuro y se observaron estructuras “trenzadas”, con dos o tres virus enredados entre sí (Fig. 27). Es probable que una vez reducidos los puentes disulfuro, los grupos tiol libre establezcan interacciones rápidamente con tioles de

partículas virales vecinas. Esto y una posible reacción entre virus durante la reacción de bioconjugación puede explicar la presencia de haces de virus en todos los casos observados.

Con las observaciones realizadas durante cada paso del proceso de reducción y diálisis podemos concluir que es muy probable que la formación de dichas estructuras ocurra durante la reacción entre puentes disulfuro y  $\text{NaBH}_4$ . Aunque los virus se encuentran en baja concentración, la reacción se realiza con agitación, lo cual pudo haber favorecido la interacción entre grupos tiol de virus diferentes, formándose inmediatamente puentes disulfuro "inter-virales".

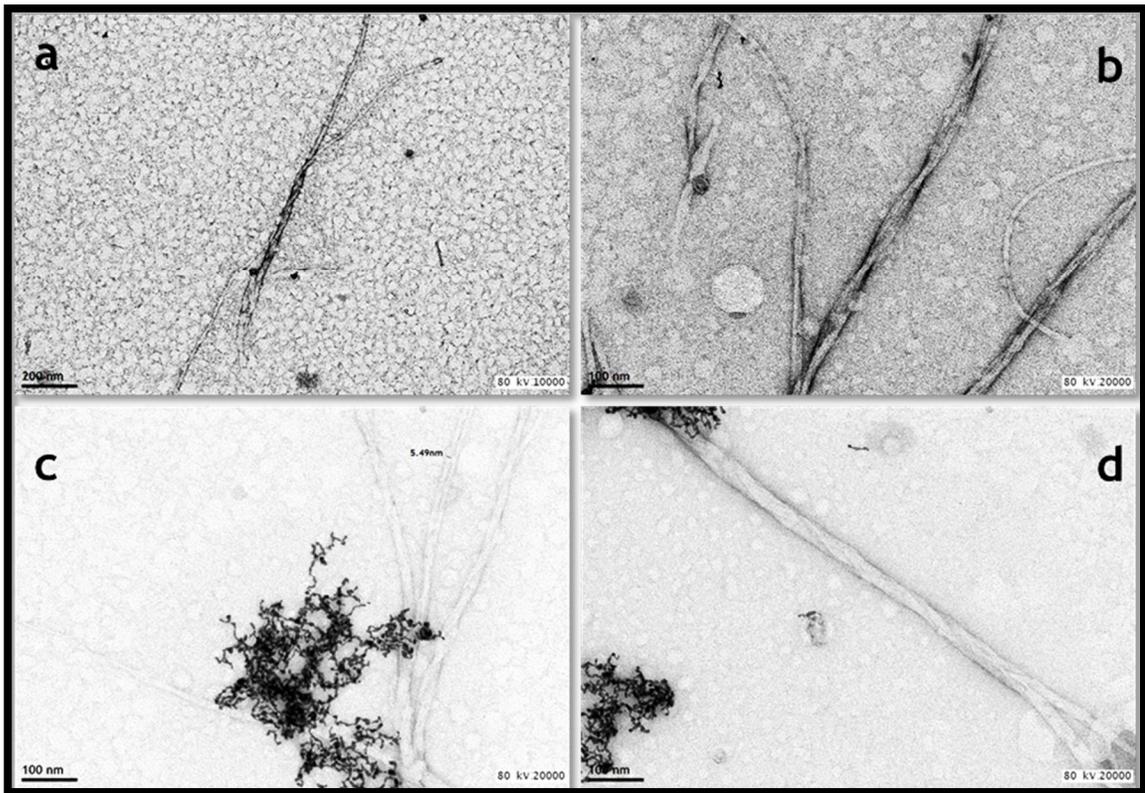


Fig. 27. Micrografías de los virus fd-cys después de ser reducidos con  $\text{NaBH}_4$ . Se observa la formación de estructuras de tipo trenza que involucran 2 o más virus entrelazados entre sí.

Cabe mencionar que los resultados mencionados hasta este punto coinciden con lo obtenido por otros grupos, incluso cuando se utilizan virus filamentosos diferentes al fd para realizar reacciones de metalización<sup>4,71,72,73</sup>. La agregación lateral de los virus es un problema común en materia condensada suave para el que aún no hay una explicación satisfactoria. Al analizar sistemas coloidales de tipo bastón semiflexible como virus y proteínas filamentosos, las cargas laterales y la fuerza iónica del medio son bastante relevantes para el ordenamiento del sistema. El problema de agregación de fagos no es nuevo, se sabe que en sistemas compuestos por filamentos de actina

también ocurre una agregación lateral como ocurre con los bacteriófagos filamentosos, ambos casos se han estudiado aplicando teorías de polielectrolitos normalmente utilizadas en el estudio de la condensación del ADN<sup>74</sup>. Normalmente, estos polianiones lineales se repelen unos a otros en solución<sup>75</sup>. De estos estudios la opinión prevalente es que el fenómeno de agregación se produce debido a una reducción axial de la densidad de las cargas del polianión. La desagregación de los filamentos ocurre con concentraciones altas de sales, las cuales incrementan la densidad de carga axial.

#### 5.4.1. Producción y caracterización

Los virus modificados con cisteína y los bionanocompositos formados por partículas virales y AuNP's fueron caracterizados mediante diferentes técnicas. En primer lugar, se colectaron espectros ultravioletas de los virus modificados con cisteína, el virus fd wt y de una solución de cisteína. Los espectros de ultravioleta del virus nativo, fd-cys y de cisteína, difieren entre ellos (Fig. 28). El espectro del virus fd y del virus fd-cys tienen un corrimiento hacia el rojo comparado con el de la cisteína en solución. El espectro del virus fd-cys tiene un pico adicional al del fd. Es probable que la presencia de cisteínas en la superficie del virus induzca un ligero desplegamiento de los aminoácidos que se encuentran en su vecindad, lo cual es particularmente importante si las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos son expuestas. Este desplegamiento local debe ser lo suficientemente sutil como para no alterar la estructura del virus, pero suficientemente grande como para ser detectado en el espectro de ultravioleta.

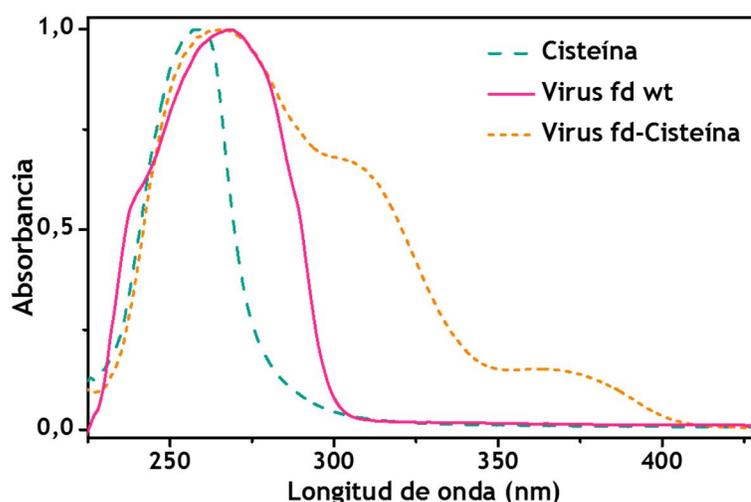


Fig. 28. Espectro ultravioleta normalizado de suspensiones del virus fd wt (1 mg/mL) y fd-cys (1 mg/mL), así como de una solución de cisteína (100 mM).

Otro método utilizado para caracterizar los virus modificados, así como los nanobiocompositos (virus + AuNP's) fue la espectroscopia Raman y su variante más sensible, SERS. Esta técnica tiene grandes ventajas frente a técnicas como el infrarrojo. Por ejemplo, las muestras que se analizan mediante Raman pueden ser acuosas sin que la presencia de agua interfiera con la señal como en el caso del infrarrojo. Las muestras no requieren mayor preparación que la adición de nanopartículas de algún metal que incrementen la señal Raman, en este trabajo hemos utilizado de oro, de alrededor de 30 nm de diámetro, NP's más pequeñas no producen incremento significativo de la señal. Los resultados obtenidos indican que, como era de esperarse, los espectros Raman convencionales de los virus modificados no son tan útiles como los obtenidos mediante SERS, debido a que varios picos distintivos son realizados solo con este último método.

La Fig. 29 muestra los espectros SERS promedio obtenidos utilizando AuNPs de 30 nm a las suspensiones acuosas de los virus modificados, así como los biocompositos virus-oro. Como se mencionó antes, en el caso de los nanocables de oro, el incremento que pudiera deberse a las nanopartículas adheridas (5-8nm de diámetro) es despreciable pues para un incremento efectivo las nanopartículas deben ser de diámetros mayores a los 20nm. Asimismo, en la Fig. 29 se puede observar la presencia de los picos característicos de los virus fd wt, ya reportados previamente por Overman et al<sup>74</sup>. Los espectros de los virus sin modificar y modificados son diferentes, en particular en dos regiones: entre los 700 y los 1200  $\text{cm}^{-1}$  y entre los 1400 y los 1650  $\text{cm}^{-1}$ . Sin embargo, los picos relacionados con azufre y tioles no son suficientemente intensos y probablemente se encuentren opacados por los otros muchos picos de baja intensidad. Además, los espectros del virus fd y del virus fd-cys, son prácticamente idénticos, lo cual hace difícil encontrar alguna diferencia significativa.

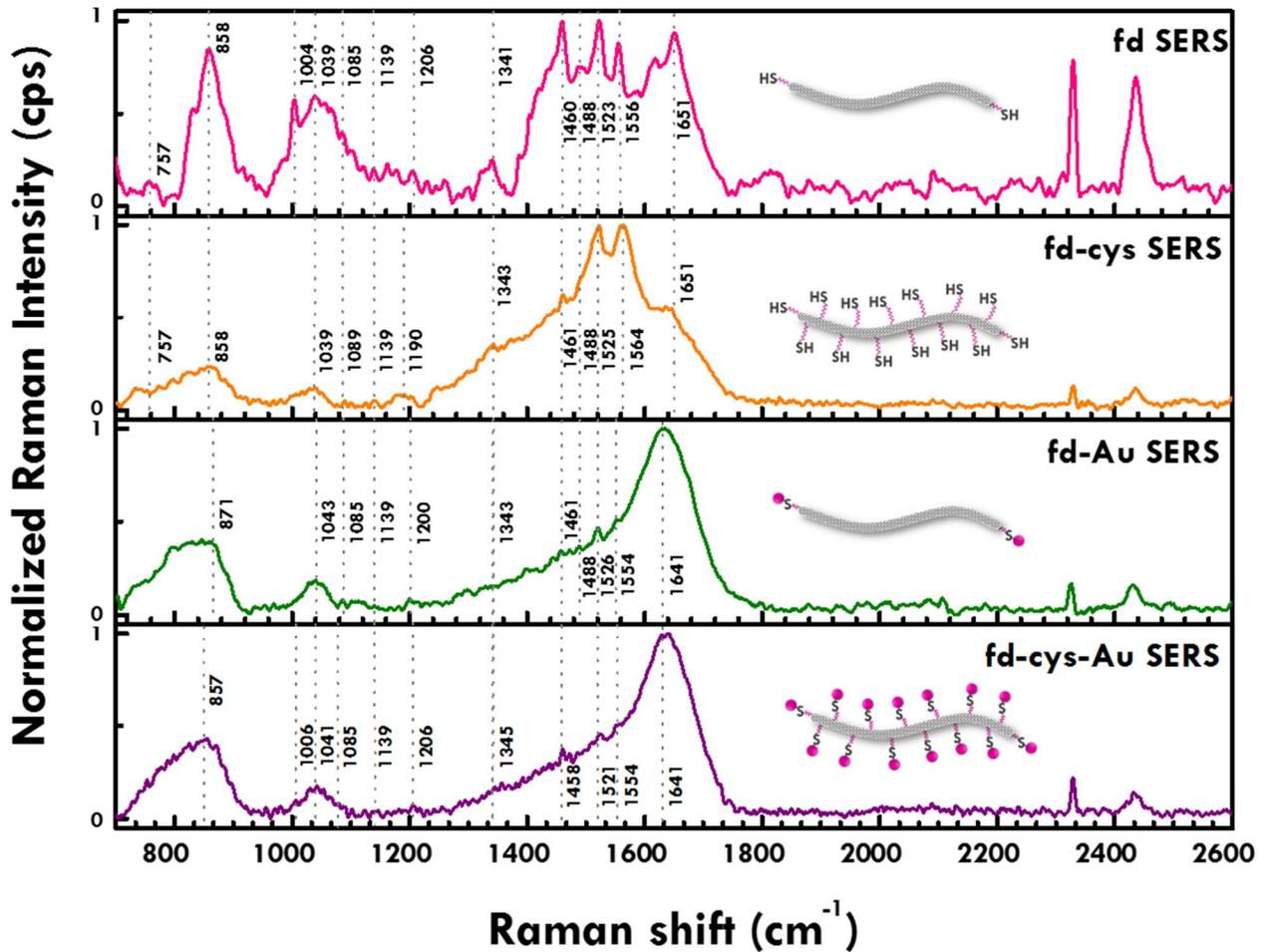


Fig. 29. Espectros SERS promedio de los virus fd wt, fd-cys, fd-AuNP, y fd-cys-AuNP (estructuras tipo nanocable). Se señalan los principales picos correspondientes al virus fd. Para obtener los espectros SERS a cada muestra se le adicionaron AuNP's de 30nm de diámetro, las AuNP's unidas a los virus no tienen efecto en la señal Raman.

Para obtener información más relevante a partir de los espectros Raman, especialmente de aquellos que parecen ser idénticos, utilizamos el análisis de componentes principales, un método de análisis multivariable que permite encontrar patrones en conjuntos complejos de datos, es bastante utilizado en quimiometría para el análisis de espectros de diferente tipo. En nuestro caso el PCA ha resultado de suma importancia pues nos permite analizar espectros que en apariencia lucen bastante similares pero que al ser analizados con este método demuestran poseer diferencias sutiles que dependen de las modificaciones químicas que se hayan realizado en los virus. Con este método pudimos incluso estudiar los espectros de los nanobiocompositos de virus y oro, ya fuera que las AuNP's se encontraran en la punta del virus o formando los nanocables.

En la Fig. 30 se observan las gráficas tridimensionales de los primeros tres componentes principales (PC1, PC2 y PC3) obtenidos a partir del conjunto de espectros Raman convencionales y SERS de diferentes conjuntos de virus analizados. En todos los casos, cada punto corresponde a un espectro colectado de una muestra en particular. Si consideramos solo los espectros tomados mediante Raman convencional (puntos en óvalos con línea punteada) en la Fig. 30a observamos dos grupos separados: uno corresponde a los virus fd wt y el otro a los virus modificados fd-cys. Esto demuestra que dichos espectros son diferentes y lo mismo ocurre con los espectros SERS que también forman dos grupos separados en la misma gráfica. Con este resultado podemos concluir que los virus han sido modificados de alguna manera, aunque no es claro hasta este punto del análisis, si esto se debe a la adición de cisteínas.

El PCA se aplicó también a los nanocables de oro. Aunque mediante microscopía electrónica resulta evidente que los virus modificados con cisteína se recubren con las AuNP's, se utilizó el PCA para analizar los espectros de estos nanobioconjugados y de una muestra en la que no hubiera ocurrido la formación de nanocables de oro. A esta muestra se le denominó "Control negativo" y consistió en adicionar AuNP's de 5 nm a una muestra de virus fd-cys que no habían sido previamente reducidos (Fig. S7, Apéndice IV). De esta manera no se generarían grupos tiol libres capaces de unirse con las AuNP's. En la Fig. 30b se observa la gráfica de los tres primeros componentes de los espectros de los nanocables de oro y el control negativo. En este caso se observa que los espectros obtenidos mediante Raman convencional no se separan (puntos en óvalos con línea punteada), solamente los espectros que fueron obtenidos mediante SERS se separan. Esto indica que la sensibilidad de la técnica con SERS es mucho mayor por lo que en un futuro será preferible utilizarlo como método base para analizar nanobioconjugados y nanobioconjugados. En la Fig. 30c se observan los 3 primeros PC's para los espectros de los nanocables de oro (fd-cys-AuNPs) y de los virus con AuNPs en la punta (fd wt-AuNPs). Como en el caso anterior, solo las muestras analizadas con SERS se separan en grupos bien definidos, mientras que la técnica de Raman convencional no es suficientemente sensible para diferenciar los espectros analizados de ambas muestras.

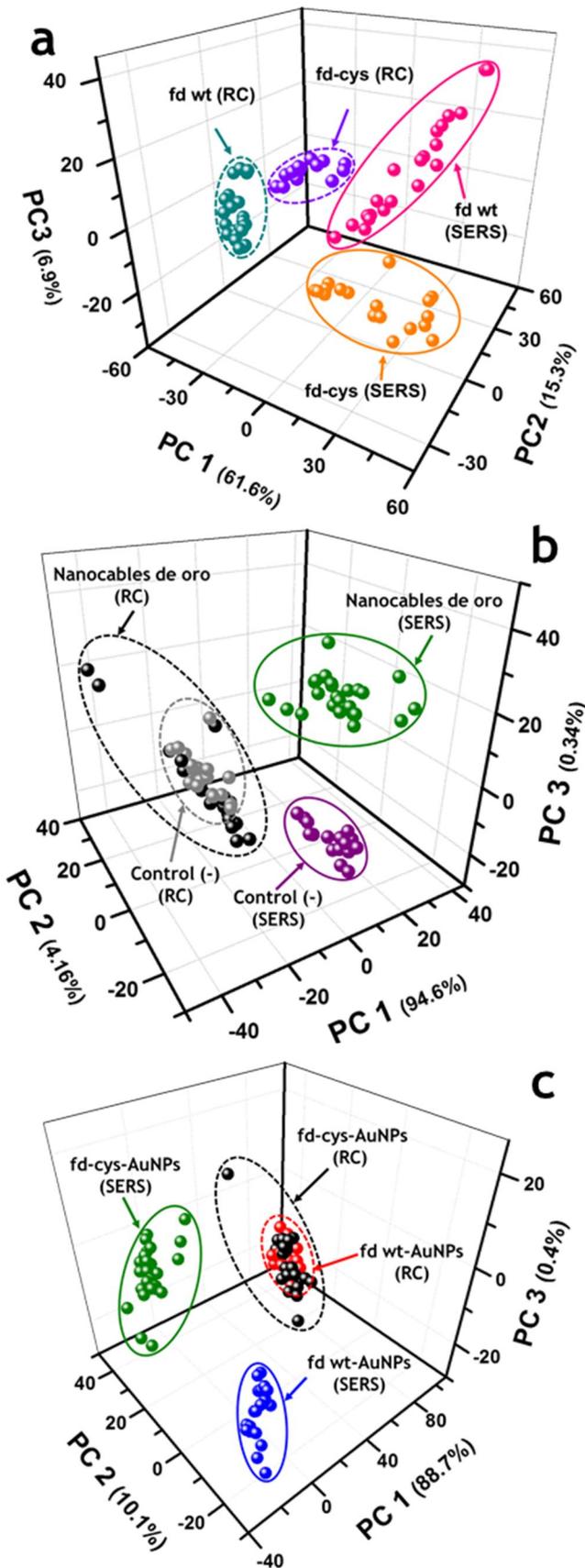


Fig. 30. Gráficas tridimensionales de los tres componentes principales más importantes obtenidos mediante PCA. Se indica en paréntesis el porcentaje de la varianza total con que cada PC contribuye. Se analizaron espectros Raman convencionales (RC, rodeados por una línea punteada), y de SERS (rodeados con línea continua) para diferentes conjuntos de virus.

a) comparación entre los virus fd y fd-cys. Al analizar los espectros RC se aprecian todos los grupos bien separados.

(b) Comparación entre las estructuras tipo nanocable y el control negativo (virus fd-cys que no fue reducido y por lo tanto no se unió a las AuNP's). Solamente los espectros SERS dan grupos separados, no hay diferencias entre los espectros RC por lo que aparecen juntos (puntos negros y grises).

(c) Comparación entre nanocables de oro y virus con AuNP en la punta. Al igual que en el caso anterior, sólo los espectros SERS dieron dos grupos separados, los RC aparecen juntos.

La varianza total explicada por los CP es: (a) 83.8%, (b) 99.1%, (c) 99.2%. Para obtener los espectros SERSE se adicionaron AuNP's de 30 nm de diámetro

Las gráficas de componentes principales permiten concluir si un grupo de muestras analizadas son diferentes entre ellas mismas. Para saber en dónde residen dichas diferencias es necesario graficar los pesos obtenidos con cada componente principal contra el corrimiento Raman. En esta nueva gráfica o espectro, los picos más altos indican las principales diferencias entre las muestras que fueron analizadas.

En la Fig. 31a se grafican los pesos del primer componente principal contra el corrimiento Raman. Las diferencias (picos mayores) se encuentran concentradas especialmente en la región entre 2400 y 2600  $\text{cm}^{-1}$ , cuyos picos están relacionados con el estiramiento de los enlaces S-H<sup>76</sup>. Las principales diferencias en 2462, 2578, 2536, 2549, 2569, y 2588  $\text{cm}^{-1}$  están relacionadas con las cisteínas introducidas. Estas diferencias corresponden principalmente a las vibraciones de los enlaces amida y azufre, cuyos modos vibracionales se señalan en la Tabla S1 (Apéndice I). Asimismo, el pico a 1624  $\text{cm}^{-1}$  puede ser atribuido al estiramiento de los grupos carboxilo, lo cual ocurre después de la adición de los grupos amino de la cisteína que reaccionan con los grupos carboxilo de la proteína pVIII. Por otro lado, los picos en 1226 y 1467  $\text{cm}^{-1}$  pueden ser atribuidos a las aminas y amidas resultantes de la unión entre el grupo carboxilo de la cisteína y los grupos amino de la pVIII. Si se consideran las diferencias encontradas mediante PCA y se trasladan a los espectros originales, observamos por ejemplo que algunos picos correspondientes al estiramiento del enlace S-H se encuentran sólo después de que se llevó a cabo la reacción de bioconjugación entre el virus y la cisteína (Fig. 31b). En la Fig. 31b se observan dichas diferencias entre el espectro del virus fd y del virus fd-cys en la región 2400-2600  $\text{cm}^{-1}$ , ocurre lo mismo cuando se grafica la misma región de los nanocables de oro y el control negativo (Fig. 31c)<sup>77</sup>.

## 5.5. Reacciones de bioconjugación fd- moléculas pequeñas

### 5.5.1. fd-diaminas

El virus fd fue modificado nuevamente utilizando esta vez tres moléculas diferentes: etilendiamina (EDA), dietilentriamina (DETA) y ácido itacónico (ITA). Estas moléculas fueron seleccionadas pues se han utilizado previamente como parte de biomateriales biocompatibles<sup>78,79</sup>, además de que son pequeñas por lo que se esperaba que no ejercieran un efecto significativo en el tamaño de los virus, más bien solo en la carga de los mismos. La unión entre diaminas y virus daría

una carga más positiva a los virus, mientras que con el ácido dicarboxílico se esperaba lo contrario, una carga más negativa que la del virus nativo<sup>70</sup>.

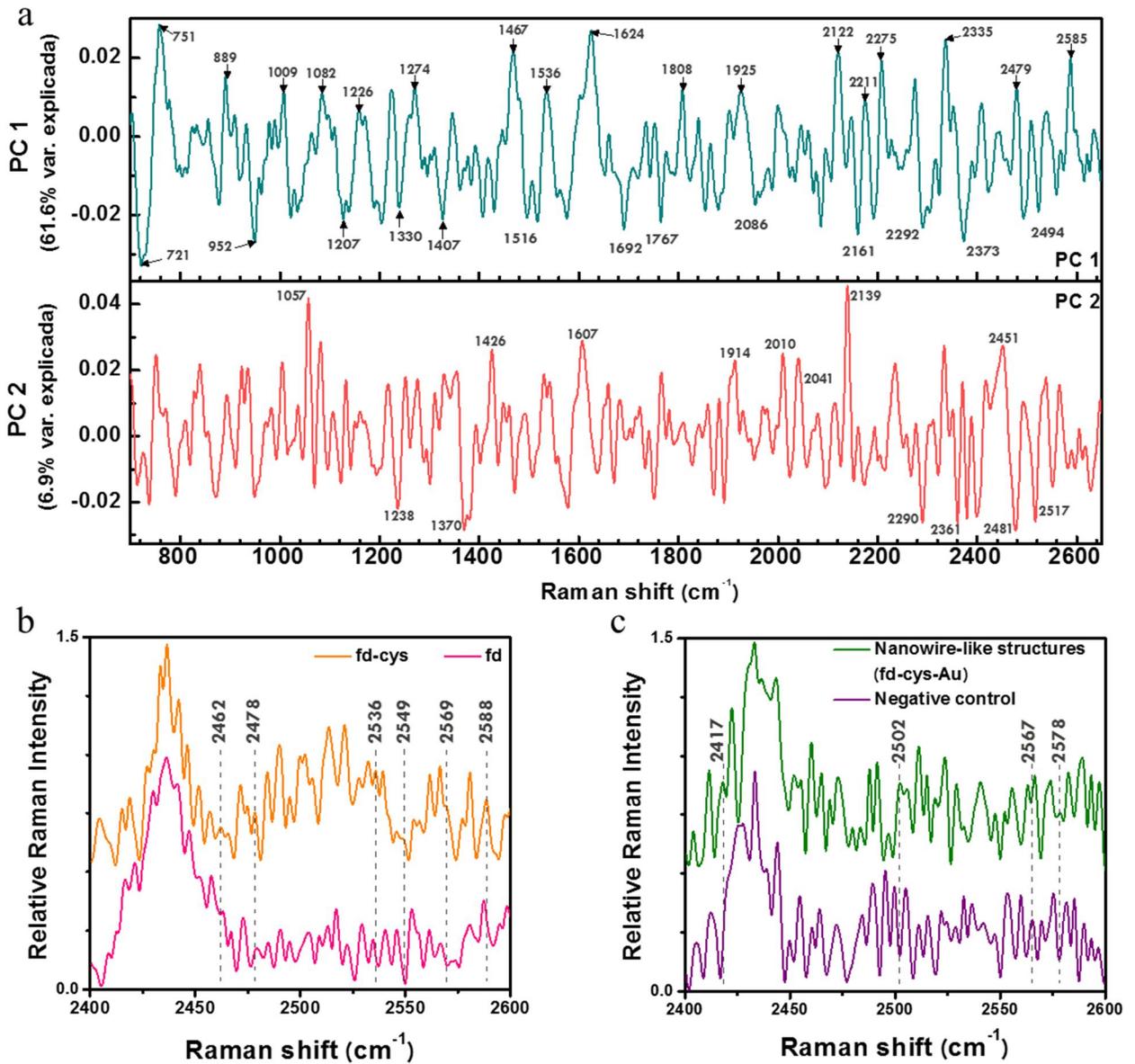


Fig. 31. Principales diferencias entre los virus analizados. a) Valores de PC1 y PC2 dados por el PCA vs el corrimiento Raman para los espectros de los virus fd wt y fd-cys. Los picos señalados con flechas corresponden a las diferencias principales entre ambos espectros analizados. Diferencias principales correspondientes a los grupos de azufre de los espectros SERS comparados: b) virus fd wt y fd-cys, y c) estructuras tipo nanocable de oro y su control negativo (virus sin reducción de disulfuros mezclados con AuNP's). Los espectros se encuentran desplazados verticalmente para facilitar su visualización.

Una vez que se llevó a cabo la reacción de bioconjugación se observó que cuando se utilizaron diaminas, la mezcla de reacción se volvió blanca y turbia (Fig. 32a y c arriba), contrario a la reacción con ácido itacónico que permaneció translúcida (Fig. 32b). En las membranas de diálisis de las mezclas con diaminas se observó la presencia de estructuras filamentosas, parecidas a algodón (Fig. 32a y c, centro), lo que sugirió que los virus se encontraban agregados. Al agitar estas muestras las estructuras tipo algodón desaparecieron, a la vez que la suspensión se volvió turbia y de color blanco. Al ultracentrifugar para concentrar los virus modificados, los que se unieron a aminas formaron películas blancas que se desintegraban con la agitación en vórtex (Fig. 32a y c, abajo). En el caso de los virus modificados con ITA, no se observaron estructuras parecidas (Fig. 32b centro y abajo). Los virus modificados se observaron mediante TEM. En el caso del virus fd-ITA se observaron partículas virales que se ven prácticamente iguales a los virus sin modificar (Fig. 33).

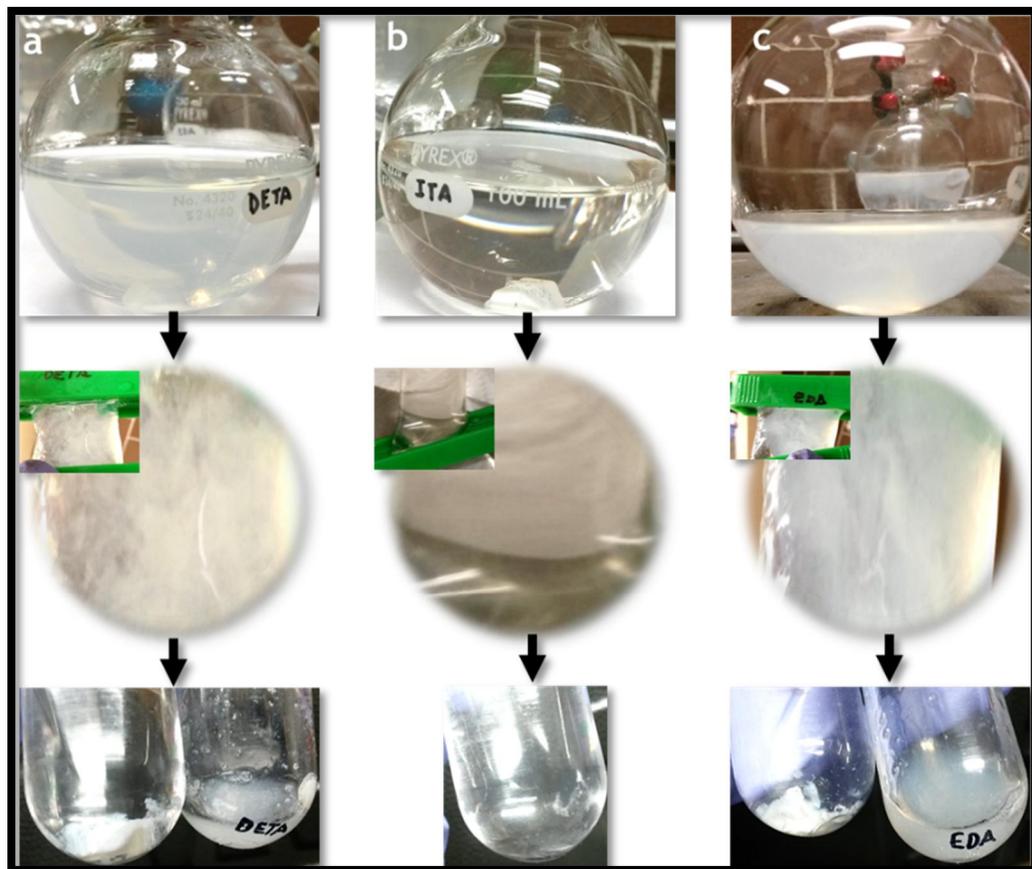


Fig. 32. Reacciones entre el virus fd y a) dietilentriamina (DETA), b) ácido itacónico (ITA) y c) etilendiamina (EDA). Se muestran las mezclas de reacción después de ser dializadas y ultracentrifugadas para concentrar los virus modificados. Se muestra un acercamiento a la membrana de diálisis, en el caso de los virus con DETA y EDA, se observaron estructuras parecidas a fibras de algodón, a diferencia del virus con ITA que permaneció incoloro y translúcido.

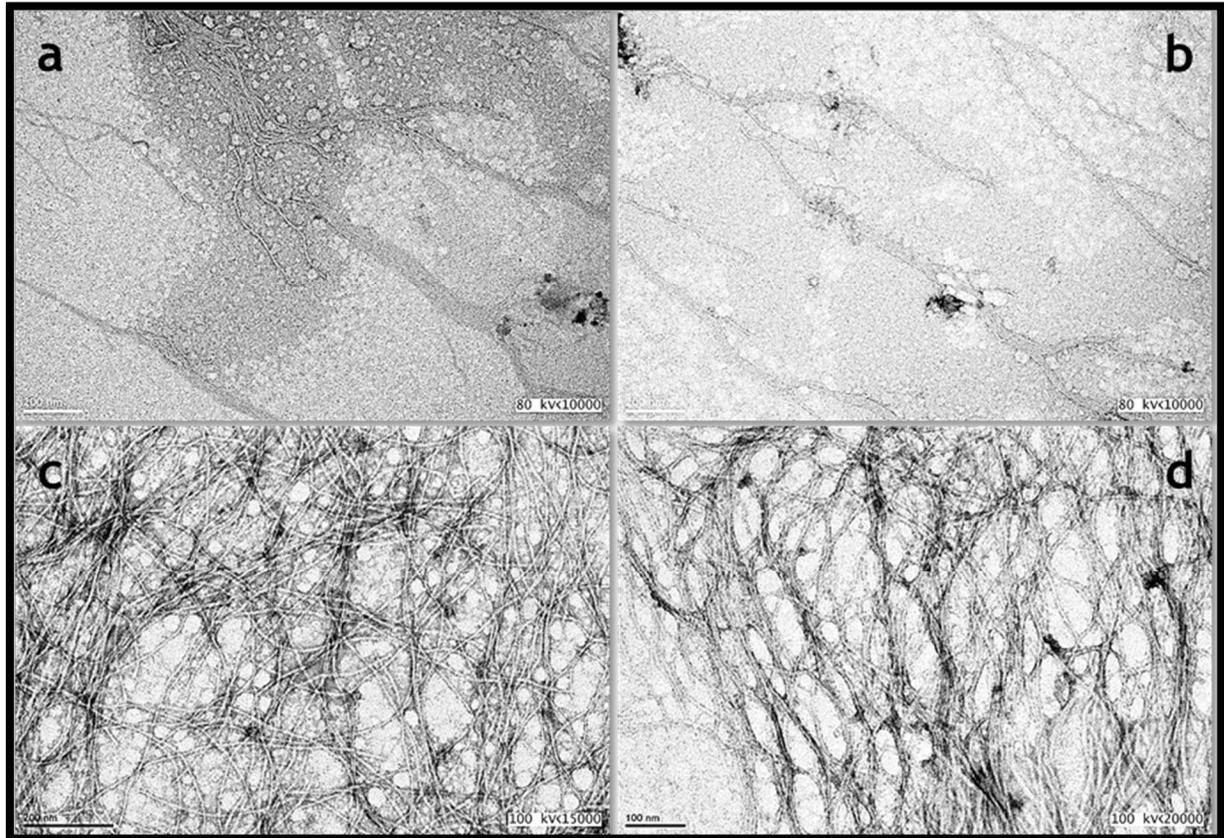


Fig. 33. Micrografías electrónicas de los virus modificados con ácido itacónico. No se presentaron fibras como en el caso de los virus modificados con diaminas, la agregación que se observa es muy probablemente debida al secado de la muestra en la rejilla, los virus son agregados por arrastramiento mientras la gota se va secando.

En el caso de los virus modificados con diaminas se observaron fibras relativamente grandes en toda la rejilla (Fig. 34 a y b). Un acercamiento a las fibras muestra que cada una de ellas está formada por varios virus agregados lateralmente (Fig. 34 c-f). Las fibras son relativamente uniformes en grosor, con tamaños de entre 2 y 5 micras. En algunos casos, como en la Fig. 34f, se pueden apreciar partículas virales individuales en los extremos de las fibras. No se pudo determinar la longitud de estas fibras pues en general se encuentran agregadas lo cual dificulta observar en qué punto terminan.

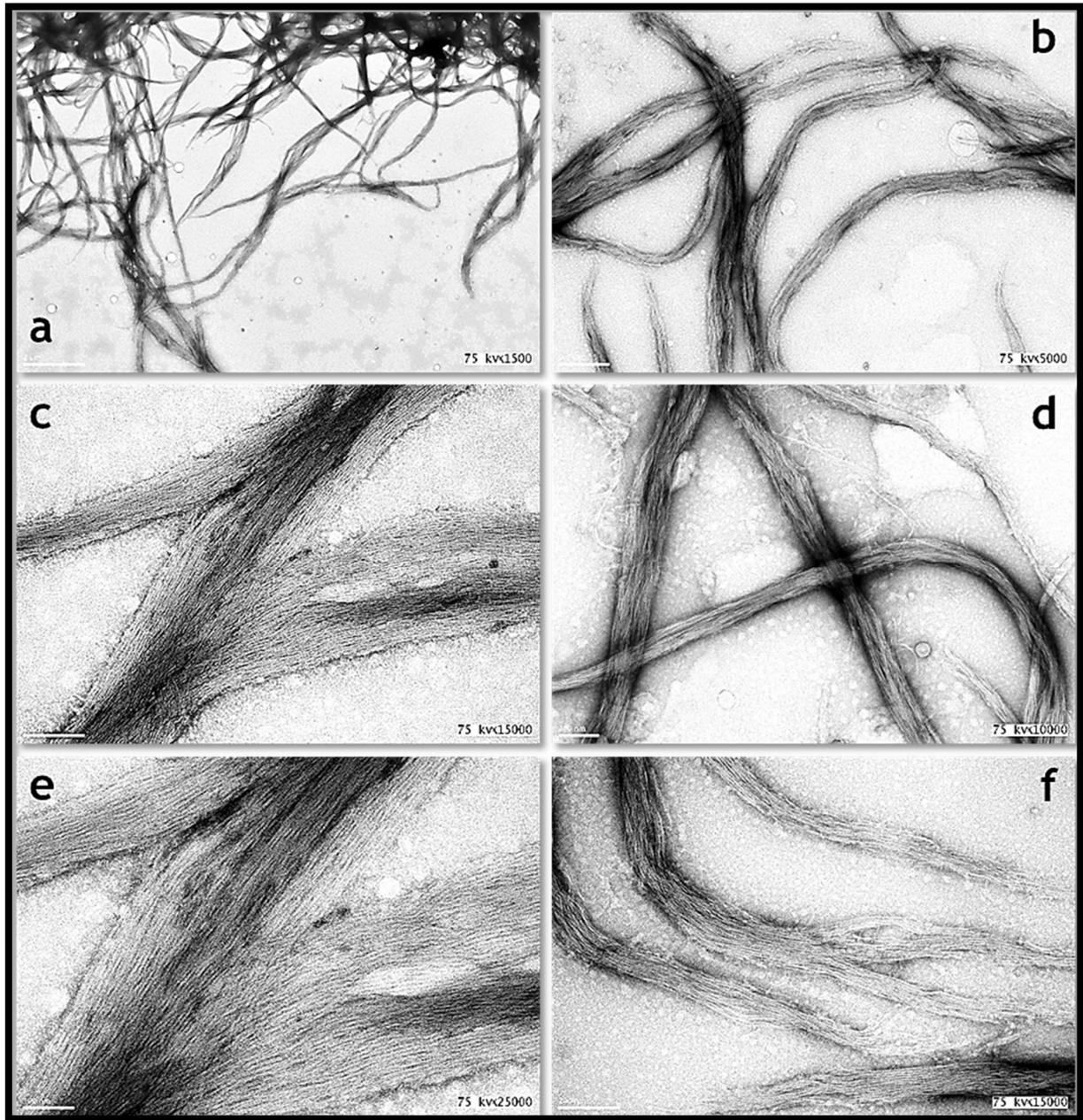


Fig. 34. Micrografías electrónicas de los virus modificados con dietiltriethylamina (a, c y e) y etilendiamina (b, d y f). En ambos casos se formaron fibras muy largas de aproximadamente 100nm de grosor. Se observa también que los virus se encuentran agregados lateralmente.

En un intento por evitar la agregación de los virus se decidió llevar a cabo las reacciones de bioconjugación con aminas, pero cambiando la fuerza iónica del medio. Se probaron tres concentraciones de NaCl, 100mM, 500mM y 1M, obteniendo como resultado fibras en todos los casos (Fig. 35).

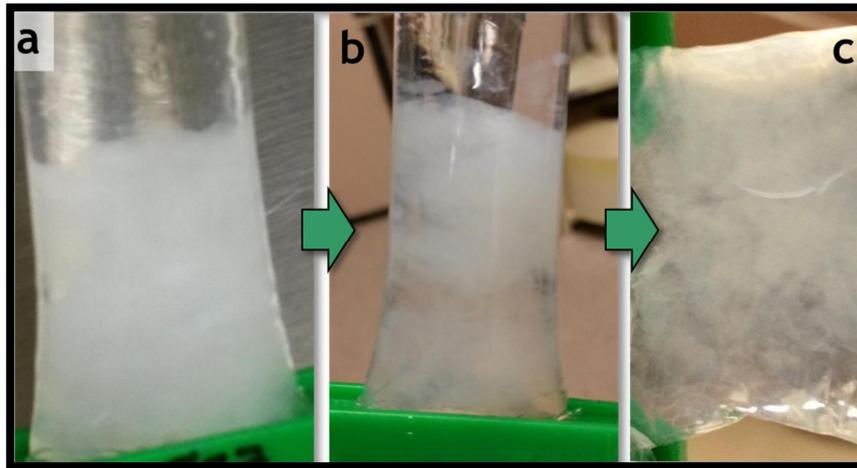


Fig. 35. Diálisis de una de las tres reacciones entre el virus fd y DETA para intentar evitar la formación de fibras. Las reacciones se llevaron a cabo con tres concentraciones diferentes de NaCl: 1M, 500 mM y 100 mM. En todos los casos se presentaron fibras, como se observa en esta reacción realizada con 1M de NaCl. Después de 12 h de diálisis los virus se agregaron en el fondo de la bolsa de diálisis (a), una ligera agitación desprendió dichos agregados (b) y con más agitación toda la suspensión se volvió turbia (c)

Para determinar la carga promedio de los virus modificados, se hicieron mediciones de potencial zeta a diferentes pH (5, 6, 7.2 y 10). En la Fig. 36 se pueden observar los cambios en la carga de los virus modificados y del virus sin modificar. Como se esperaba, los virus fd-EDA y fd-DETA son más positivos que el virus fd nativo, sin embargo, en el caso del virus fd modificado con ácido itacónico, no se logró obtener una carga más negativa que el virus wt. Aún no es claro por qué ocurre lo anterior a pesar de que se realizaron 3 rondas de modificación química. Es posible como en el caso de las modificaciones con cisteína que las moléculas de ITA reaccionen entre sí más rápido de lo que lo hacen con el virus.

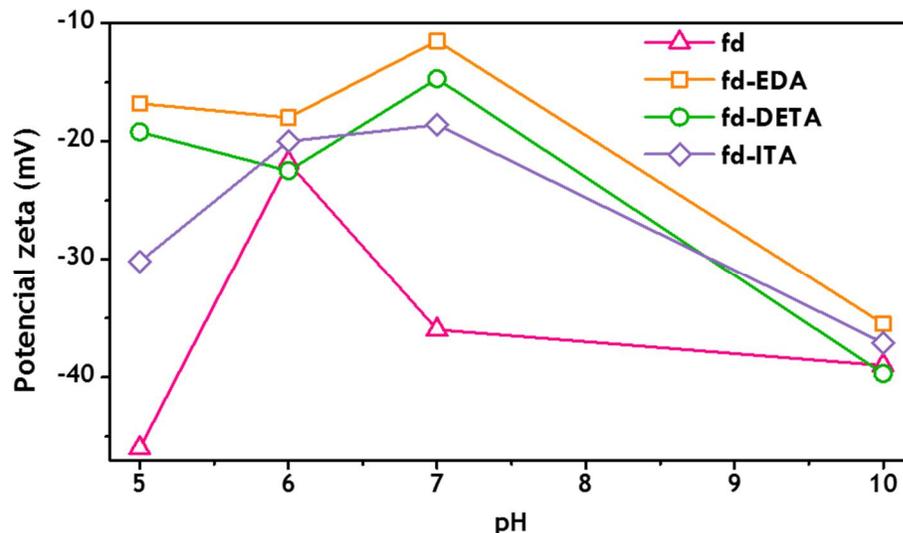


Fig. 36. Potencial zeta de los virus modificados con EDA, DETA, ITA y el virus fd wt. Se analizaron las muestras en 4 valores de pH: 5, 6, 7 y 10 utilizando reguladores de baja conductividad.

## 5.5.2. SDS-PAGE

Asimismo, para determinar el grado de modificación de los virus, se realizó la técnica de SDS-PAGE, en la que una proteína en particular se desnaturaliza, lo cual afecta su patrón de migración en el gel de poliacrilamida. En la Fig. 37 se observa la fotografía del gel obtenido teñido con azul de Coomassie. El virus fd nativo (wt fd) muestra solo tres bandas, las dos primeras correspondientes a las proteínas de las puntas (la primera muy probablemente corresponde a la pIII), y una tercera banda, muy grande, que corresponde a la proteína de la envoltura pVIII, la más abundante en la estructura del virus. Un patrón idéntico se observa para el virus fd-cys, en este caso la modificación con cisteína no afecta para nada el peso molecular de la pVIII, que aparece a la misma altura que la del virus nativo. Los virus modificados con diaminas tienen un patrón interesante pues una serie de bandas aparece a lo largo del gel. Estas bandas corresponden con la formación de dímeros, trímeros, tetrámeros, etc., de las proteínas pVIII. En el caso del virus fd-ITA, se observan dos bandas adicionales a las tres ya esperadas.

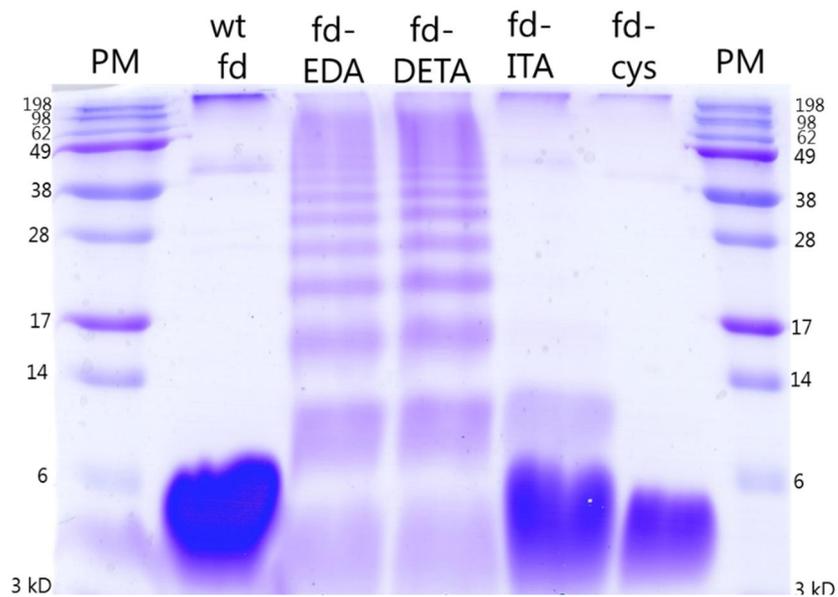


Fig. 37. SDS-PAGE de diferentes muestras de virus: fd wt, fd-EDA, fd-DETA, fd-ITA y fd-cys. El virus fd wt tiene dos bandas de gran peso molecular correspondientes a las proteínas de los extremos de la partícula viral (pIII, pVI, pIX y pVII) y una banda bastante intensa de bajo PM (~5 kD) que corresponde a la proteína pVIII. Los virus fd-EDA y fd-DETA muestran un patrón de bandas que corresponden a la formación de dímeros, trímeros, etc. de la proteína pVIII. El virus modificado con ITA muestra algo parecido, pero con muchas menos bandas que en el caso de las diaminas. Se incluyó el virus fd-cys, cuyo patrón es idéntico al del virus fd wt.

## SERS y PCA de virus modificados

Los virus modificados fueron adicionados con AuNPs de 30nm de diámetro para ser analizadas mediante SERS. En la Fig. 38 se observan las suspensiones de virus mezcladas con las AuNPs. Se observó que en el caso de los virus fd-EDA y fd-DETA, se formaron pequeños agregados de nanopartículas que no precipitaban, lo cual puede indicar que las AuNPs se encuentran interaccionando con las fibras de virus, aunque es necesario observarlas mediante TEM para analizar el tipo de estructuras que pudieran estar formando, pues puede tratarse de nuevos bionanocompositos.

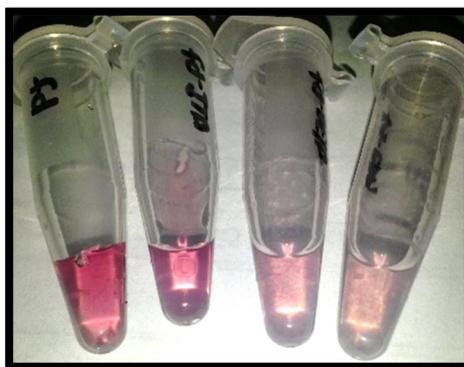


Fig. 38. Muestras de los virus fd wt, fd-ITA, fd-DETA, fd-EDA (de izquierda a derecha) mezclados con AuNPs de 40nm para ser analizadas mediante SERS. Se observa que los virus unidos a diaminas formaron agregados visibles a simple vista con las AuNPs.

En la Fig. 39 se muestran los espectros SERS promedio de los virus fd, fd-EDA, fd-DETA y fd-ITA. No hay diferencias significativas a primera vista entre los espectros, salvo algunos cuantos picos que se indican con líneas punteadas y cuya asignación vibracional se encuentra en la Tabla S2 (Apéndice I). Adicionalmente, se realizó el PCA de los espectros SERS obtenidos. En la Fig. 40a se muestra la gráfica tridimensional que contiene los tres primeros componentes principales obtenidos al analizar todos los espectros SERS obtenidos. Se puede apreciar la clara separación de tres grupos: los espectros del virus fd, los del virus fd-ITA y uno más formados por los virus fd-EDA y fd-DETA. Es muy probable que estos dos tipos de espectros se agrupen debido a que la estructura de las diaminas es bastante parecida pues cuando se analizan solamente estos dos tipos de espectros, el PCA proporciona dos grupos diferenciados (Fig. 40b).

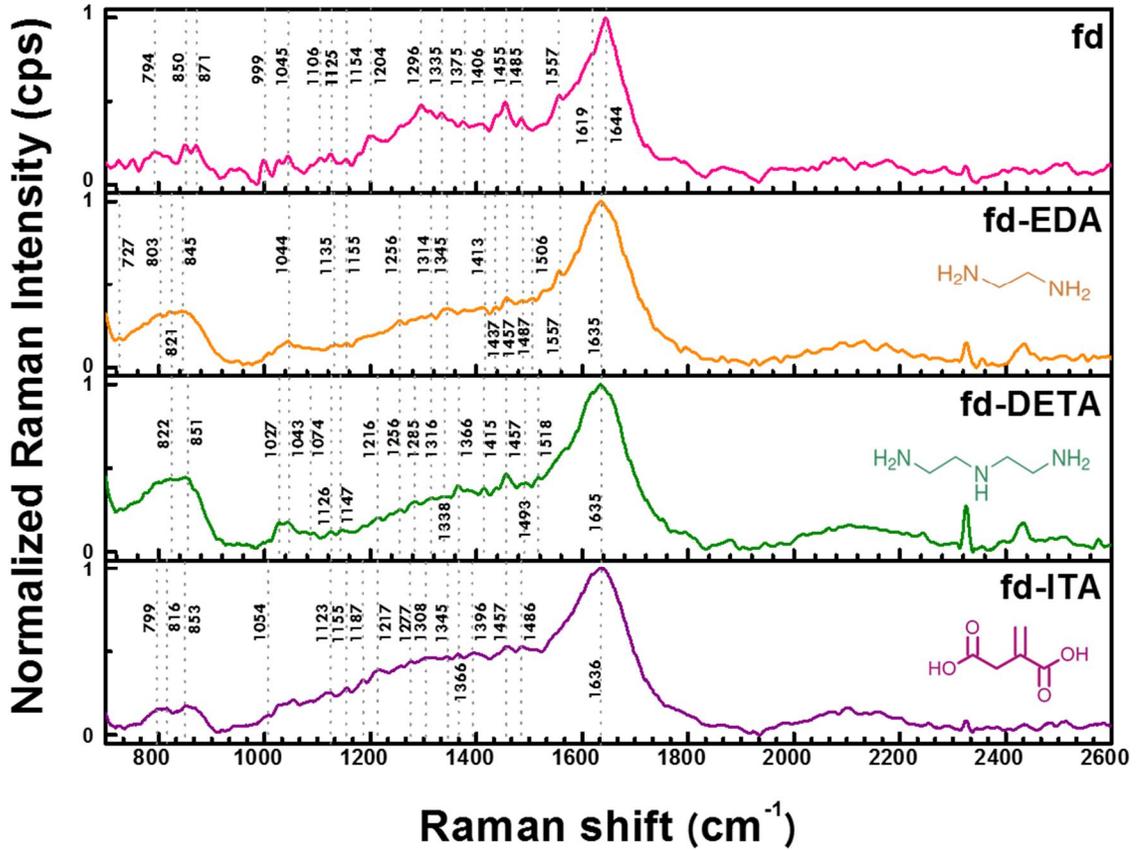


Fig. 39. Espectros SERS promedio de los virus fd wt, y de los virus modificados: fd-EDA, fd-DETA y fd-ITA. Se adicionaron AuNP's de 30 nm de diámetro a cada muestra para obtener el incremento de la señal de Raman.

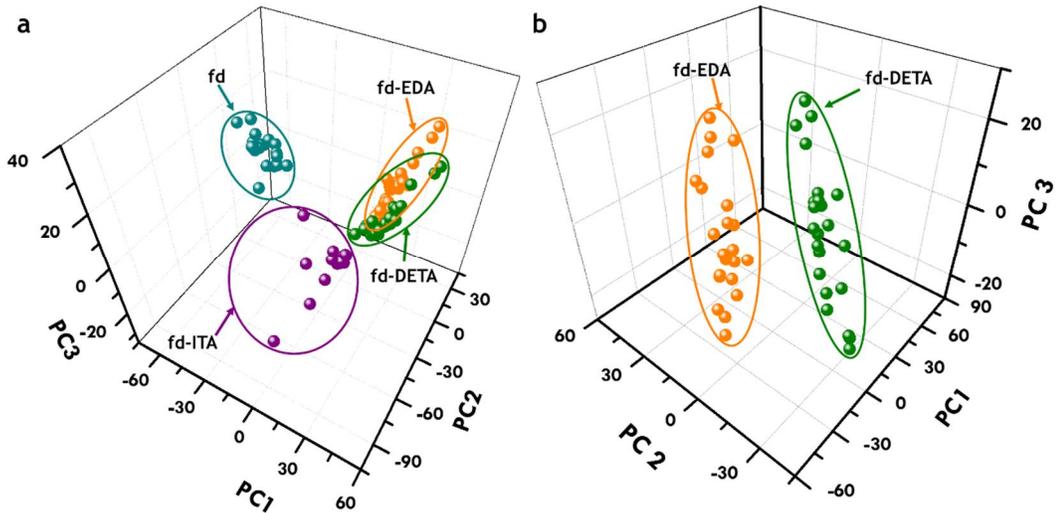


Fig. 40. Gráficas tridimensionales de los tres primeros componentes principales obtenidos mediante PCA. Se analizaron los virus fd wt y bioconjugados con EDA, DETA e ITA. A) Se observa la separación de grupos que corresponden a cada tipo de virus, los virus modificados con diaminas aparecen muy cercanos, formando prácticamente un solo grupo que claramente se separan cuando son comparados entre sí (b).

## 5.6. Hidrogeles y crecimiento celular

Los virus modificados de diferente carga fueron mezclados entre si para formar ambientes tridimensionales de tipo hidrogel (Tabla 9), que permitieran el crecimiento de células adherentes, como las HEPG2 (Fig. 41). Este se trató de un experimento preliminar, en el que se determinó si las células podrían ser capaces de crecer en nuestros medios hechos con virus. Los virus modificados con aminos le proporcionan un aspecto turbio a la suspensión (Fig. 41b, c, e-h). En el caso de la muestra de virus modificada con dietilentriamina (fd-DETA) se observó una viscosidad muy alta pues le tomaba un gran intervalo de tiempo a la suspensión fluir hacia abajo cuando el tubo que la contenía se invertía (Fig. 41i), mientras que la muestra con menor viscosidad corresponde a la del virus fd-ITA.

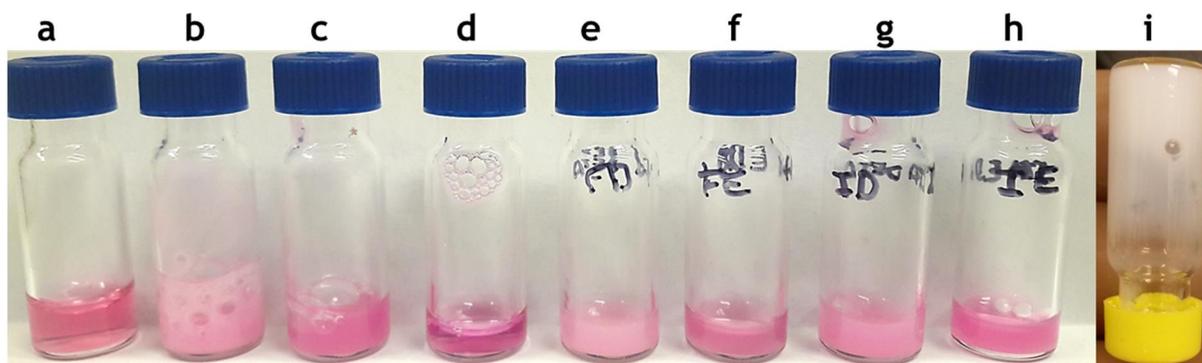


Fig. 41. Preparaciones de virus para evaluar el crecimiento de células. Los virus fueron ultracentrifugados y resuspendidos en medio DMEM. a) fd wt (40mg/mL), b) fd-DETA (30 mg/mL), c) fd-EDA (30 mg/mL), d) fd-ITA (20 mg/mL), e) fd wt + fd-DETA (1:1), f) fd wt + fd-EDA (1:1), g) fd-ITA + fd-DETA (1:1) y f) fd-ITA + fd-EDA (1:1). Se emplearon las mezclas de virus en medio (por duplicado) para sembrar las células en una microplaca de 96 pozos. La coloración rosa se debe al medio de cultivo, las muestras b y c son blancas cuando se encuentran solo en agua como se observa en (i) que contiene el virus fd-DETA.

Las células se mantuvieron en incubación en presencia de los diferentes virus durante aproximadamente 80 h a 37°C, se adicionó medio de cultivo fresco y sin virus cuando fue necesario (cuando el color del medio cambió). Aunque en todas las muestras con virus se advirtió la presencia de células, se observó que el número de éstas se incrementó solo en los pozos con virus fd wt y fd-ITA (Fig. 42). En el resto de los casos se observaron células a diferentes alturas en el pozo de la microplaca, sin embargo, nunca aumentó el número de células. Es muy probable que la alta viscosidad de estas muestras haya impedido la entrada de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> hasta las células, por lo que es necesario probar concentraciones menores de estos virus. Se observó que las células se

desarrollaron mejor en presencia de los virus modificados con ácido itacónico; en dicha muestra las células pudieron adherirse al fondo de la placa y aparentan haber crecido en capas, aunque otros experimentos son necesarios para confirmar esto.

En la Fig. 42 se muestran las observaciones realizadas del crecimiento de las células HEPG2 con y sin virus durante 80 h. En la muestra que no contiene virus, las células se desarrollaron normalmente y alcanzaron 100% de confluencia alrededor de las 80h (Fig. 42g). Las células que crecieron en presencia de los virus fd-ITA alcanzaron dicha confluencia antes de las 60h como se puede observar en la Fig. 42f. A diferencia del resto de los pozos en donde la concentración de virus era mayor y las células no se desarrollaron, parece que la concentración del virus modificado con ácido itacónico permitió que las células se adhirieran al fondo de la placa y proliferaran más rápido que en la muestra control (sin virus). Al observar esta muestra a diferentes alturas, se detectó la presencia de agregados grandes de células, que en la Fig. 42i se observa una masa redondeada sobre las células adheridas al fondo de la placa, lo cual sugiere que las células fueron capaces de crecer más allá del fondo de la placa como monocapa. Por otro lado, los virus sin modificar, fd wt, parecen haber permitido el desarrollo de cúmulos pequeños de células. A las 18 h se observaron tanto células aisladas como agregados de entre 2 y hasta alrededor de 10 células (Fig. 42b). A las 60 h los agregados tenían un mayor número de células y se apreciaban a diferentes alturas a lo largo del medio de cultivo en el pozo sin ser dispersados por agitación moderada lo cual sugiere que las células crecen adheridas a un soporte tridimensional proporcionado por el virus. Dichos agregados se observan como sombras oscuras (flechas) en las Fig. 42e y h. El número de células en los agregados no cambió después de las 80 h. Es probable que a pesar de que la matriz tridimensional que formó el virus permitió el crecimiento de las células también dificultó el flujo apropiado de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y nutrientes a las células.

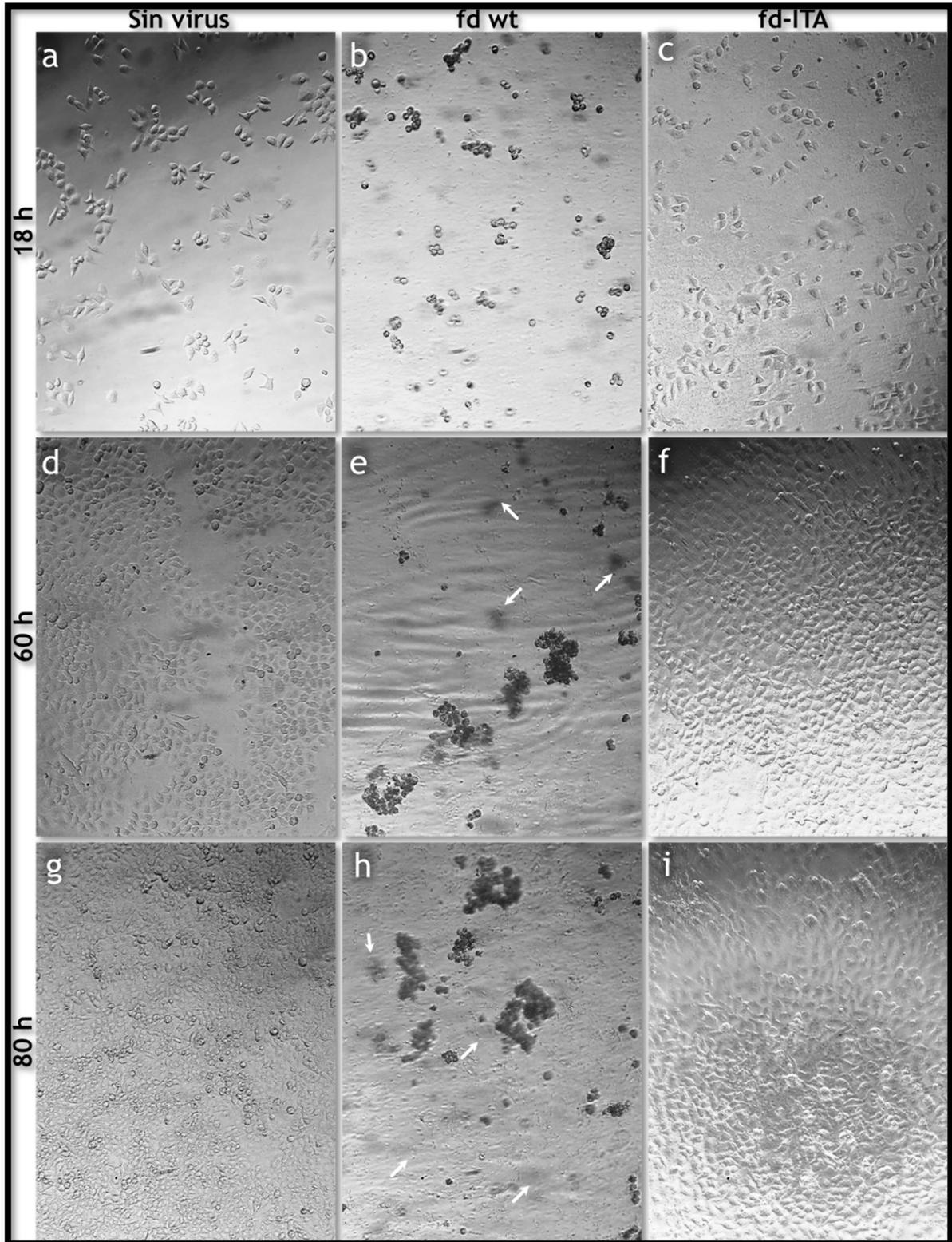


Fig. 42. Fotografías del crecimiento de células HEPG2 con y sin virus fd (fd wt y fd-ITA). Se monitoreó el crecimiento de las células a las 18h, 60h y 80h. Se observa que las células alcanzaron la confluencia en las muestras sin virus y con virus fd-ITA (g, i). En el caso del virus fd wt, sólo se observó la presencia de agregados celulares (b, e, h) que, al parecer, aumentaron en número de células. Se realizó una observación más (no mostrada) a las 100 h, no se registraron cambios significativos. Las flechas indican agregados en otro campo de la muestra y que estaban desenfocados cuando se tomó la fotografía.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La reciente unión entre nanomateriales con estructuras biológicas ha abierto puertas insospechadas en la investigación biológica y biomédica, con aplicaciones nunca antes vistas que aprovechan las propiedades únicas que resultan de la combinación de estos bloques de construcción. El diseño de bionanomateriales también tiene un gran futuro en aplicaciones relacionadas con el transporte y almacenamiento de energía, así como también en la obtención de dispositivos ópticos cada vez más pequeños. Nos encontramos así en una era en la que la naturaleza sirve como fuente de inspiración para la construcción de nuevos materiales que emulan propiedades que han evolucionado hasta nuestros días desde el propio origen de la vida.

El uso de virus como bloque de construcción eficiente ha sido ya desarrollado por diferentes grupos en los últimos años. No solo son relativamente fáciles de obtener, producir y purificar, sino que son lo bastante simples para poder modificarlos según las necesidades del bionanomaterial que se desee desarrollar. Algunas de las limitaciones comunes era el hecho de que para obtener partículas virales con propiedades muy específicas era necesario modificar el propio material genético del virus, métodos que, a pesar de ser ya bastante conocidos, no siempre son de fácil acceso en laboratorios orientados más a la síntesis orgánica o al análisis fisicoquímico de los sistemas coloidales. Asimismo, algunas propiedades no pueden ser fácilmente introducidas mediante ingeniería genética, pues se compromete no solo el plegamiento de las subunidades que conforman la partícula viral sino también el propio ensamblaje de la misma. La adopción de reacciones de bioconjugación para la modificación a la medida de virus ha ayudado a sobrepasar estas limitaciones. Reacciones de bioconjugación ya utilizadas en el pasado para modificar biomacromoléculas como los anticuerpos, son utilizadas hoy en día para “decorar” la superficie de partículas virales.

Los virus filamentosos resultan interesantes, pues algunos de ellos han sido utilizados como modelo de estudio de sistemas coloidales formados por polímeros rígidos y semirrígidos. En la naturaleza existen ejemplos de sistemas coloidales de gran importancia, como el citoplasma de las células y la matriz extracelular, estas suspensiones coloidales tienen propiedades reológicas muy especiales que los hacen adecuados para sostener la vida. El estudio de suspensiones de virus es

importante tanto para comprender los sistemas coloidales biológicos como para desarrollar sistemas artificiales que imiten los procesos bioquímicos que ocurren de manera natural en todos los sistemas vivos.

En este trabajo se propuso desarrollar bionanomateriales utilizando al virus filamentoso fd como elemento básico de construcción. Este virus ha sido utilizado en nuestro grupo como modelo de estudio de sistemas coloidales, su comportamiento fue comparado con el que presentan otros coloides filamentosos como las estructuras poliméricas y las micelas tubulares gigantes. En este trabajo se incluye una parte de dicho estudio, en el cual analizamos el comportamiento viscoelástico de las suspensiones de virus cambiando su concentración y la fuerza iónica del medio. Observamos que, además, la viscosidad de las suspensiones virales depende prácticamente solo de la concentración de los virus y que la fuerza iónica en el medio juega un papel menos importante en la dinámica del fluido. Las curvas de flujo obtenidas (viscosidad vs. razón de corte) reflejan el fenómeno conocido como transición de voltereta (*tumbling transition*) de las partículas virales, especialmente cuando la concentración de los virus es mayor a los 25mg/mL. Al inicio de las curvas se observa que la viscosidad de las suspensiones decae, pero a ciertas razones de corte la suspensión presenta picos para luego volver a decaer. Este fenómeno ya descrito por otro grupo, indica que los virus sufren cierto grado de desorganización (voltereta) al ser arrastrados por el flujo que impone el reómetro, pero recuperan rápidamente el orden, por lo que continúan fluyendo fácilmente lo cual se refleja con el decaimiento de la viscosidad.

El estudio de las propiedades viscoelásticas fue realizado mediante reología mecánica y microreología por DWS. Con el primer caso se obtiene información a frecuencias bajas y, en el segundo caso, a frecuencias mucho mayores. Pudimos observar que la naturaleza de las suspensiones de virus es viscoelástica, utilizando el reómetro mecánico se alcanza a observar que a bajas frecuencias el fluido es principalmente viscoso, aunque al llegar al límite de frecuencias del aparato se nota que el módulo elástico es mayor. Esto último fue comprobado mediante microreología, que analiza lo que ocurre a frecuencias más altas que en el reómetro mecánico y que muestra que al inicio, efectivamente, el módulo elástico es mayor, solo durante un intervalo pequeño de frecuencias antes de disminuir y darle paso al módulo viscoso. Esto resultará importante para el desarrollo de biomateriales como los hidrogeles que se desarrollaron en este trabajo.

En este trabajo también los virus fueron utilizados para construir nanoestructuras combinadas con nanopartículas de oro. Adicionando moléculas de cisteína a la superficie del virus fue posible decorarlos con nanopartículas de oro. La adición de cisteínas se logró utilizando una reacción de bioconjugación mediada por carbodiimidas. Se observó que con ciclos adicionales de bioconjugación con cisteína (vía carbodiimidas) el número de nanopartículas que se unían a la superficie del virus era mayor, lo cual es de suma importancia si estos nanocables son utilizados para la conducción de electricidad pues es necesario que las partículas estén en una densidad suficiente como para tocarse entre sí. Aún queda pendiente evaluar la capacidad de estos materiales para conducir electricidad efectivamente y ser incorporados en microdispositivos o bien, como parte de cultivos celulares en los que se requiere de cierta corriente de electrones para estimular el crecimiento de la célula. Los virus que no fueron modificados con cisteína, es decir, el virus fd wt, es capaz de unirse también a nanopartículas de oro gracias a la presencia de forma natural de cisteínas en los extremos de la partícula viral. Las partículas se unieron principalmente a uno de los extremos, probablemente el que contiene la mayor cantidad de cisteínas y por lo tanto de grupos tiol disponibles. Esta propiedad puede utilizarse en un futuro para crear "tapetes virales", utilizando una superficie nanoestructurada de oro los virus podrían ser capaces de unirse por uno de sus extremos a esta superficie, creando un material tipo cepillo o tapete (semejante a los *polymer brushes*) cuyas propiedades de superficie dependerán de las propiedades del virus. De esta manera se pueden diseñar superficies altamente hidrofóbicas si los virus se modifican con moléculas orgánicas no miscibles en agua. La incorporación de anticuerpos a las partículas o a los virus de este nanobiocomposito tentativo puede hacerlo funcionar como biosensor.

El estudio de nanobiocompositos se realiza normalmente mediante herramientas que permiten visualizar directamente la forma y tamaño de las estructuras obtenidas. En este trabajo utilizamos la microscopía electrónica de transmisión como una técnica eficaz para estudiar las partículas virales modificadas. Sin embargo, las propias limitaciones de esta técnica no permiten confirmar, por ejemplo, que una reacción de bioconjugación entre el virus y moléculas tan pequeñas como las estudiadas haya sido exitosa. Debido a esta problemática se utilizó un método adicional de caracterización, la espectroscopia Raman en una de sus variantes más sensibles: SERS. Mediante esta técnica pudimos obtener espectros de los virus modificados, así como de los bionanocompositos producidos. El análisis de los espectros Raman fue mejorado enormemente al

aplicar un método estadístico utilizado en quimiometría, el análisis de componentes principales (PCA), mediante el cual se pueden encontrar patrones en conjuntos grandes de datos. Gracias a esta técnica pudimos no solo determinar que efectivamente había ocurrido un cambio en la estructura del virus, sino que también pudimos definir a qué se debía dicho cambio analizando los grupos funcionales implicados en los picos más importantes de los espectros. Además, se aplicó el método a los virus bioconjugados con las moléculas pequeñas, este método demostró ser capaz de diferenciar nanocables de oro de virus que no se unieron a las nanopartículas. Finalmente, se pudo diferenciar entre los mismos nanocables y los virus con AuNPs unidas a uno de sus extremos.

Esta metodología, SERS + PCA, ha probado ser sumamente útil para la caracterización de bionanocompositos. Utilizamos nanopartículas de oro para incrementar la señal Raman, pero es muy importante evaluar otro tipo de partículas que incrementen con mayor eficacia la señal Raman. Se sugiere el uso de nanopartículas de plata de diferentes formas, pero especialmente morfologías que contengan vértices como ocurre en los prismas y cubos, pues se sabe que es con este tipo de morfologías se logra un mayor incremento pues el plasmón de superficie es mucho más intenso en dichas regiones. La metodología de análisis desarrollada, utilizando SERS y PCA, nos permite incursionar en una nueva área de investigación en la cual, analizando fluidos humanos se pueden caracterizar padecimientos que aquejan a la población mexicana como son la obesidad y la diabetes.

Utilizando la misma reacción de bioconjugación para formar enlaces amida con cisteínas, se adicionaron tres diferentes moléculas pequeñas a la superficie del virus: etilendiamina (EDA), dietilentriamina (DETA) y ácido itacónico (ITA). Las dos primeras moléculas son diaminas mientras que el último es un ácido dicarboxílico. Se utilizaron dichas moléculas para modificar la carga neta de las partículas virales: los virus unidos a aminas serían positivos y los que se unieran al ácido serían más negativos. En la práctica no obtuvimos partículas virales con carga positiva, aunque resultó menos negativa que el virus no modificado (fd wt). En el caso de los virus modificados con ácido itacónico, no se obtuvo una carga más negativa que el virus fd wt, sólo ligeramente más positiva. No fue posible obtener virus más negativos a pesar de que la reacción de bioconjugación se repitió hasta tres veces para aumentar la cantidad de moléculas unidas. Aún no es claro el porqué de este resultado, aunque es probable que las moléculas de ITA sean capaces de reaccionar entre ellas mucho más rápido de los que lo hacen con el virus. Las modificaciones con aminas dieron un resultado interesante, los virus se agregan lateralmente formando fibras de virus bastante largas. Se

tiene planeado utilizar estas fibras alineadas para la producción de nanohilos, mediante la técnica de electrohilado que proporciona fibras de tamaños de escala de micras, con las que se podrán confeccionar sistemas interesantes para el crecimiento de células o para ser implantados en animales de experimentación.

Los virus modificados con diaminas y con el ácido dicarboxílico y el virus wt fueron mezclados para obtener hidrogeles físicos, es decir, formados debido a la diferencia de cargas entre los componentes de la matriz. Se utilizaron los virus en concentraciones que los ubican en la fase nemática del diagrama de fases de su cristal líquido, pues se pensó que la orientación que adquieren los virus serían útiles para el crecimiento de las células. Se utilizaron células HEPG2 para evaluar la capacidad de estos hidrogeles como soporte de crecimiento. Se observó que las células se multiplicaron únicamente en presencia del virus fd wt y del virus modificado con ácido itacónico. Algo de crecimiento se observó en la mezcla de virus fd-ITA con virus fd-EDA. Cabe mencionar que los virus fd-ITA se encontraban en menor concentración que el resto de los virus utilizados en el experimento, por lo que es posible que esta menor concentración haya sido un factor clave para el crecimiento de las células. Se observó que con estos virus las células alcanzaron más rápido la confluencia que las células que crecieron en ausencia de virus. Asimismo, se pudieron detectar agregados de células por arriba de la monocapa de células adherida al fondo de la placa de cultivo, lo cual indicaría que las células pudieron utilizar a los virus para continuar creciendo por encima de la monocapa, es decir, a lo largo del eje vertical. Los virus fd wt, sin modificar, permitieron el desarrollo de células, pero sin alcanzar jamás la confluencia. Las células crecieron aparentemente en racimos pequeños, estos no crecieron más al final del experimento.

Las muestras modificadas con aminas resultaron ser bastante viscosas, es muy probable que debido a esta viscosidad las células inoculadas quedaron atrapadas a la vez que la transferencia de  $O_2$  y  $CO_2$  fue mínima, lo cual limitó el crecimiento de las mismas. Es necesario evaluar diferentes concentraciones de los virus modificados para determinar la concentración adecuada de virus que, como en el caso del virus fd-ITA permitan la proliferación de las células a lo largo de todos los ejes del cultivo. Aunque aún no son concluyentes estos resultados la presencia de virus sí parece tener un efecto positivo en el desarrollo celular, por lo que los siguientes experimentos serán fundamentales para la formulación de medios que permitan la expansión de las células de manera tridimensional.

Como en el caso de los virus fd wt, se requiere estudiar las propiedades reológicas de los hidrogeles que se obtengan en el futuro, en vista de que hemos comprobado que, en sistemas formados por filamentos, la viscosidad puede ser un factor limitante para el crecimiento de las células en el sentido que altera el flujo de nutrientes y gases necesarios para la sobrevivencia de la célula. Estos resultados preliminares abren la posibilidad de estudiar en nuestro grupo, nuevas modificaciones de los virus, que favorezcan uno u otro tipo de líneas celulares, entre los principales candidatos se encuentran los polímeros conductores como polianilina, que se sabe que podrían funcionar como soporte para células musculares, neuronas, osteoblastos, entre otros.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Smith, M. T.; Hawes, A. K.; Bundy, B. C. Reengineering Viruses and Virus-like Particles through Chemical Functionalization Strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 620–626.
- (2) Li, F.; Wang, Q. Fabrication of Nanoarchitectures Templated by Virus-Based Nanoparticles: Strategies and Applications. *Small* **2014**, *10*, 230–245.
- (3) Wnęk, M.; Górzny, M. L.; Ward, M. B.; Wälti, C.; Davies, A. G.; Brydson, R.; Evans, S. D.; Stockley, P. G. Fabrication and Characterization of Gold Nano-Wires Templated on Virus-like Arrays of Tobacco Mosaic Virus Coat Proteins. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 025605.
- (4) Lim, J.-S.; Kim, S.-M.; Lee, S.-Y.; Stach, E. a.; Culver, J. N.; Harris, M. T. Formation of Au/Pd Alloy Nanoparticles on TMV. *J. Nanomater.* **2010**, *2010*, 1–6.
- (5) Oh, D.; Qi, J.; Lu, Y.-C.; Zhang, Y.; Shao-Horn, Y.; Belcher, A. M. Biologically Enhanced Cathode Design for Improved Capacity and Cycle Life for Lithium-Oxygen Batteries. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2756.
- (6) Yoo, S. Y.; Chung, W.-J.; Kim, T. H.; Le, M.; Lee, S.-W. Facile Patterning of Genetically Engineered M13 Bacteriophage for Directional Growth of Human Fibroblast Cells. *Soft Matter* **2011**, *7*, 363.
- (7) Griffith, L. G.; Swartz, M. a. Capturing Complex 3D Tissue Physiology in Vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 211–224.
- (8) Ma, P. X. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 184–198.
- (9) Kumar, C. S. S. R. *Nanotechnologies for the Life Sciences Vol. 9. Tissue, Cell and Organ Engineering*; Kumar, C. S. S. R., Ed.; Wiley-VCH, 2006.
- (10) Dvir, T.; Timko, B. P.; Kohane, D. S.; Langer, R. Nanotechnological Strategies for Engineering Complex Tissues. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 13–22.
- (11) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, 2nd ed.; Academic Press Elsevier, 2008.
- (12) Woltman, S. J.; Jay, G. D.; Crawford, G. P. *Liquid Crystals. Frontiers in Biomedical Applications*; World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, 2007.
- (13) Fraden, S. Phase Transitions in Colloidal Suspensions of Virus Particles. In *Observation, prediction and simulation of phase transitions in complex fluids*; Baus, M.; Rull, L. F.; Ryckaert, J. P., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1995; pp. 113–164.
- (14) Löwen, H. Interaction between Charged Rodlike Colloidal Particles. *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *72*, 424–427.
- (15) Dogic, Z.; Fraden, S. Ordered Phases of Filamentous Viruses. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2006**, *11*, 47–55.
- (16) Lauffer, M. A. Optical Properties of Solutions of Tobacco Mosaic Virus Protein. *J. Biol. Chem.* **1938**.
- (17) Graf, H.; Löwen, H. Phase Diagram of Tobacco Mosaic Virus Solutions. *Phys. Rev. E* **1999**, *59*, 1932–1942.
- (18) Maeda, H.; Maeda, Y. Liquid Crystal Formation in Suspensions of Hard Rodlike Colloidal Particles: Direct Observation of Particle Arrangement and Self-Ordering Behavior. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 1–4.
- (19) Tang, J.; Fraden, S. Isotropic Cholesteric Phase Transition in Colloidal Suspensions of Filamentous Bacteriophage Fd. *Liq. Cryst.* **1995**, *19*, 459–467.
- (20) Tomar, S.; Green, M. M.; Day, L. A. DNA-Protein Interactions as the Source of Large-Length-Scale Chirality Evident in the Liquid Crystal Behavior of Filamentous Bacteriophages. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3367–3375.
- (21) Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries That Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904–2074.
- (22) Journal, B.; Nano, N.; Issue, S.; White, C.-. Editorial: Nanobio versus Bionano – What’s in a Name? **2013**, 158–159.
- (23) Sapsford, K. E.; Tyner, K. M.; Dair, B. J.; Deschamps, J. R.; Medintz, I. L. Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4453–4488.
- (24) Stephanopoulos, N.; Francis, M. B. Choosing an Effective Protein Bioconjugation Strategy. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 876–884.
- (25) Nakajima, N.; Ikada, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 123–130.
- (26) Russel, M.; Model, P. Filamentous Phage. In *The Bacteriophages*; Calendar, R., Ed.; Oxford University Press: United States of America, 2006; pp. 146–160.
- (27) Ackermann, H.-W. 5500 Phages Examined in the Electron Microscope. *Arch. Virol.* **2007**, *152*, 227–243.
- (28) Canchaya, C.; Proux, C.; Fournous, G.; Bruttin, A.; Brüssow, H. Prophage Genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 238–276.
- (29) Flynn, C. E.; Lee, S.; Peelle, B. R.; Belcher, A. M. Viruses as Vehicles for Growth, Organization and Assembly of Materials. *Acta Mater.* **2003**, *51*, 5867–5880.
- (30) Huang, Y.; Chiang, C.-Y.; Lee, S. K.; Gao, Y.; Hu, E. L.; De Yoreo, J.; Belcher, A. M. Programmable Assembly of Nanoarchitectures Using Genetically Engineered Viruses. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1429–1434.
- (31) Hoess, R. H. Protein Design and Phage Display. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3205–3218.
- (32) Marvin, D. A.; Symmons, M. F.; Straus, S. K. Structure and Assembly of Filamentous Bacteriophages. *Prog.*

- Biophys. Mol. Biol.* **2014**, *114*, 80–122.
- (33) Straus, S. K.; Scott, W. R. P.; Symmons, M. F.; Marvin, D. A. On the Structures of Filamentous Bacteriophage Ff (fd, f1, M13). *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 521–527.
- (34) Berkowitz, S. a; Day, L. a. Mass, Length, Composition and Structure of the Filamentous Bacterial Virus Fd. *J. Mol. Biol.* **1976**, *102*, 531–547.
- (35) Karlsson, F.; Borrebaeck, C. A. K.; Nilsson, N. The Mechanism of Bacterial Infection by Filamentous Phages Involves Molecular Interactions between TolA and Phage Protein 3 Domains. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 2628–2634.
- (36) Lubkowski, J.; Hennecke, F.; Plückthun, A.; Wlodawer, A. Filamentous Phage Infection: Crystal Structure of g3p in Complex with Its Coreceptor, the C-Terminal Domain of TolA. *Structure* **1999**, *7*, 711–722.
- (37) Wang, Y. A.; Yu, X.; Overman, S.; Tsuboi, M.; Thomas, G. J.; Egelman, E. H. The Structure of a Filamentous Bacteriophage. *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 209–215.
- (38) Opella, S. J.; Zeri, A. C.; Park, S. H. Structure, Dynamics, and Assembly of Filamentous Bacteriophages by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, *59*, 635–657.
- (39) Vos, W. L.; Nazarov, P. V.; Koehorst, R. B. M.; Spruijt, R. B.; Hemminga, M. A. From “I” to “L” and Back Again: The Odyssey of Membrane-Bound M13 Protein. *Trends Biochem. Sci.* **2009**, *34*, 249–255.
- (40) Holliger, P.; Riechmann, L.; Williams, R. L. Crystal Structure of the Two N-Terminal Domains of g3p from Filamentous Phage Fd at 1.9 Å: Evidence for Conformational Lability. *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 649–657.
- (41) Nagarajan, R.; Hatton, A. T. *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation and Functionalization*; Nagarajan, R.; Hatton, A. T., Eds.; Oxford University Press: USA, 2008; Vol. 1.
- (42) Langer, R.; Tirrell, D. A. Designing Materials for Biology and Medicine. *Nature* **2004**, *428*, 487–492.
- (43) Sperl, R. A.; Parak, W. J. Surface Modification, Functionalization and Bioconjugation of Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc. Ser. A, Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *368*, 1333–1383.
- (44) Chalmers, J. M.; Griffiths, P. R. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*; Wiley, 2002.
- (45) Murray, W. A.; Barnes, W. L. Plasmonic Materials. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3771–3782.
- (46) Campion, A.; Kambhampati, P.; Harris, C. Surface-Enhanced Raman Scattering. **1998**, *27*, 241–250.
- (47) Le Ru, E.; Etchegoin, P. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*; Elsevier: Great Britain, 2009; Vol. 1.
- (48) Bereton, R. G. *Applied Chemometrics for Scientists*; John Wiley and Sons Ltd, 2007; Vol. 1.
- (49) Quinn, G. P.; Keough, M. J. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*; Cambridge University Press: USA, 2002; Vol. 1.
- (50) Varmuza, K.; Filzmoser, P. *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*; CRC Press, 2009.
- (51) Davies, A. M. C.; Fearn, T. Back to Basics: Applications of Principal Component Analysis. *Spectrosc. Eur.* **2005**, *17*, 30–31.
- (52) Lin, J.; Chen, R.; Feng, S.; Pan, J.; Li, Y.; Chen, G.; Cheng, M.; Huang, Z.; Yu, Y.; Zeng, H. A Novel Blood Plasma Analysis Technique Combining Membrane Electrophoresis with Silver Nanoparticle-Based SERS Spectroscopy for Potential Applications in Noninvasive Cancer Detection. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2011**, *7*, 655–663.
- (53) González-Solís, J. L.; Martínez-Espinosa, J. C.; Salgado-Román, J. M.; Palomares-Anda, P. Monitoring of Chemotherapy Leukemia Treatment Using Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Lasers Med. Sci.* **2014**, *29*, 1241–1249.
- (54) Chen, B.; Li, S.; Li, J.; Guo, Z.; Chen, Q.; Mai, H. Optimal Multivariate Method for Raman Spectroscopy Based Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *J. Appl. Phys.* **2013**, *114*, 244702.
- (55) Nogueira, G. V.; Silveira, L.; Martin, A. A.; Zângaro, R. A.; Pacheco, M. T. T.; Chavantes, M. C.; Pasqualucci, C. A. Raman Spectroscopy Study of Atherosclerosis in Human Carotid Artery. *J. Biomed. Opt.* **2005**, *10*, 031117.
- (56) Sambrook, J.; Russell, D. W. Working with Bacteriophage M13 Vectors. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Sambrook, J.; Russell, D. W., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 2001; pp. 3.1–3.52.
- (57) Purdy, K. R. Liquid Crystal Phase Transitions of Monodisperse and Bidisperse Suspensions of Rodlike Colloidal Virus, Brandeis University, 2004.
- (58) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15700–15707.
- (59) Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q. Extinction Coefficient of Gold Nanoparticles with Different Sizes and Different Capping Ligands. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2007**, *58*, 3–7.
- (60) Sarmiento-Gomez, E.; Montalvan-Sorrososa, D.; Garza, C.; Mas-Oliva, J.; Castillo, R. Rheology and DWS Microrheology of Concentrated Suspensions of the Semiflexible Filamentous Fd Virus. *Eur. Phys. J. E* **2012**, *35*.
- (61) Sambrook, J.; Russell, D. W. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Sambrook, J.; Russell, D. W., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 2001; pp. 2026–2041.
- (62) Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*; John Wiley and Sons Ltd, 2004.
- (63) Hutornoj, V.; Niedre-Otomere, B.; Kozlovska, T.; Zajackina, A. Comparison of Ultracentrifugation Methods for Concentration of Recombinant Alphaviruses: Sucrose and Iodixanol Cushions. *Environ. Exp. Biol.* **2012**, *10*, 117–123.

- (64) Graf, C.; Kramer, H.; Deggelmann, M.; Hagenbuchle, M.; Johner, C.; Martin, C.; Weber, R. Rheological Properties of Suspensions of Interacting Rodlike FD-Virus Particles. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 4920–4928.
- (65) Lettinga, M. P.; Dogic, Z.; Wang, H.; Vermant, J. Flow Behavior of Colloidal Rodlike Viruses in the Nematic Phase. *Langmuir* **2005**, *21*, 8048–8057.
- (66) Ripoll, M.; Holmqvist, P.; Winkler, R.; Gompper, G.; Dhont, J.; Lettinga, M. Attractive Colloidal Rods in Shear Flow. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 15–18.
- (67) Chung, W.-J.; Merzlyak, A.; Lee, S.-W. Fabrication of Engineered M13 Bacteriophages into Liquid Crystalline Films and Fibers for Directional Growth and Encapsulation of Fibroblasts. *Soft Matter* **2010**, *6*, 4454.
- (68) Yoo, S. Y.; Kobayashi, M.; Lee, P. P.; Lee, S.-W. Early Osteogenic Differentiation of Mouse Preosteoblasts Induced by Collagen-Derived DGEA-Peptide on Nanofibrous Phage Tissue Matrices. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 987–996.
- (69) Hansen, R. E.; Winther, J. R. An Introduction to Methods for Analyzing Thiols and Disulfides: Reactions, Reagents, and Practical Considerations. *Anal. Biochem.* **2009**, *394*, 147–158.
- (70) Zhang, Z.; Buitenhuis, J.; Cukkemane, A.; Brocker, M.; Bott, M.; Dhont, J. K. G. Charge Reversal of the Rodlike Colloidal Fd Virus through Surface Chemical Modification. *Langmuir* **2010**, *26*, 10593–10599.
- (71) Avery, K. N.; Schaak, J. E.; Schaak, R. E. M13 Bacteriophage as a Biological Scaffold for Magnetically-Recoverable Metal Nanowire Catalysts: Combining Specific and Nonspecific Interactions To Design Multifunctional Nanocomposites. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2176–2178.
- (72) Lee, S.-Y.; Royston, E.; Culver, J. N.; Harris, M. T. Improved Metal Cluster Deposition on a Genetically Engineered Tobacco Mosaic Virus Template. *Nanotechnology* **2005**, *16*, S435–S441.
- (73) Lee, S.-K.; Yun, D. S.; Belcher, A. M. Cobalt Ion Mediated Self-Assembly of Genetically Engineered Bacteriophage for Biomimetic Co-Pt Hybrid Material. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 14–17.
- (74) Overman, S. A.; Kristensen, D. M.; Bondre, P.; Hewitt, B.; Thomas, G. J. Effects of Virion and Salt Concentrations on the Raman Signatures of Filamentous Phages Fd, Pf1, Pf3, and PH75. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13129–13136.
- (75) Günther, J.; Ahrens, H.; Förster, S.; Helm, C. Bundle Formation in Polyelectrolyte Brushes. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 1–4.
- (76) Raso, S. W.; Clark, P. L.; Haasepettingell, C.; King, J.; Thomas, G. J. Distinct Cysteine Sulfhydryl Environments Detected by Analysis of Raman S-H Markers of Cys 3 Ser Mutant Proteins. **2001**, 899–911.
- (77) Montalvan-Sorrosa, D.; González-Solis, J. L.; Mas-Oliva, J.; Castillo, R. Filamentous Virus Decoration with Gold Nanoparticles: Global Fingerprints of Bionanocomposites Acquired with SERS. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 57329–57336.
- (78) Mishra, R. K.; Ray, A. R. Synthesis and Characterization of Poly N-[3-(dimethylamino) Propyl] Methacrylamide-Co-Itaconic Acid Hydrogels for Drug Delivery. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *119*, 3199–3206.
- (79) Guo, X.; Ayala, J. E.; Gonzalez, M.; Stancescu, M.; Lambert, S.; Hickman, J. J. Tissue Engineering the Monosynaptic Circuit of the Stretch Reflex Arc with Co-Culture of Embryonic Motoneurons and Proprioceptive Sensory Neurons. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5723–5731.
- (80) Deng, L.-W.; Perham, R. N. Delineating the Site of Interaction on the pIII Protein of Filamentous Bacteriophage Fd with the F-Pilus of Escherichia Coli. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 603–614.
- (81) Karlsson, F.; Borrebaeck, C. A. K.; Nilsson, N. The Mechanism of Bacterial Infection by Filamentous Phages Involves Molecular Interactions between TolA and Phage Protein 3 Domains. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 2628–2634.
- (82) Marvin, D. A. Filamentous Phage Structure, Infection and Assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 150–158.
- (83) Horiuchi, K. Initiation Mechanisms in Replication of Filamentous Phage DNA. *Genes Cells* **1997**, *2*, 425–432.
- (84) Higashitani, N.; Higashitani, a.; Guan, Z. W.; Horiuchi, K. Recognition Mechanisms of the Minus-Strand Origin of Phage f1 by Escherichia Coli RNA Polymerase. *Genes Cells* **1996**, *1*, 829–841.
- (85) Feng, J.-N.; Russel, M.; Model, P. A Permeabilized Cell System That Assembles Filamentous Bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 4068–4073.
- (86) Russel, M.; Model, P. Thioredoxin Is Required for Filamentous Phage Assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 29–33.
- (87) Guy-Caffey, J. K.; Webster, R. E. The Membrane Domain of a Bacteriophage Assembly Protein. Membrane Insertion and Growth Inhibition. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 5496–5503.
- (88) Marciano, D. K.; Russel, M.; Simon, S. M. Assembling Filamentous Phage Occlude pIV Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 9359–9364.
- (89) Rakonjac, J.; Model, P. Roles of pIII in Filamentous Phage Assembly. *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 25–41.
- (90) Rakonjac, J.; Feng, J. N.; Model, P. Filamentous Phage Are Released from the Bacterial Membrane by a Two-Step Mechanism Involving a Short C-Terminal Fragment of pIII. *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 1253–1265.

## 8. APÉNDICES

### I. ASIGNACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES DE LOS ESPECTROS RAMAN Y PCA

Tabla S1. Diferencias principales entre los virus fd y fd-cys obtenidas mediante PCA.

Corrimiento Raman (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de modo vibracional	Asignación tentativa de grupos funcionales
721	<i>s, p</i> asym CNC str	Tertiary amides
	P=S str	P=S
751	<i>s</i> , amide VII	Primary thioamides
	<i>m, p</i> skeletal vib	Branched alkanes
	<i>m-s, p</i> asym CSC str	CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> -
	<i>m, p</i> O-C=O in-plane def	Formates
	<i>m-s, C<sub>4</sub>O</i> skeletal vib and CO def	Tertiary alcohols
	<i>m-s</i> sym skeletal vib	Tertiary butyl groups
889	<i>m-s, p</i> C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
	<i>m</i> , CH def	<i>cis</i> - CH=CH-
	<i>m-s</i> , skeletal vib	Straight chain alkanes
	<i>m-s</i> , sym COC str	Aliphatic ethers
	<i>s, p</i> CCO str	Primary and secondary alcohols
952	<i>s, p</i> sym COC str	Ethers
	<i>w</i> CH def	Vinyl compounds -CH=CH <sub>2</sub>
	<i>vs</i> ring vib	Polysubstituted pyridines
	<i>m-s, p</i> C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
1009	<i>m-s</i> , C=C, C=N str	Pyrimidines
	<i>m-w</i> , P-H def	P-H
	<i>s, p</i> CH in -plane def	<i>Ortho</i> disubstituted benzenes
	<i>s</i> , CH <sub>2</sub> /CH wagging vib	Cyclopropyl compounds
	<i>vs</i>	1,3,5-Trisubstituted benzenes
	<i>s, p</i> sym COC str	Ethers
	<i>m-s</i> , C-C vib	-OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
1057	<i>s, p</i> sym COC str	Ethers
	<i>m-w</i> , P-H def	P-H
	<i>m-s</i> CCC str	Straight chain alkanes
	<i>m</i> CO-C str	Formates
	<i>s, p</i> CH in-plane def	Orthodisubstituted benzenes
	<i>m-s</i> ring vib	2-monosubstituted pyridines
1082	<i>m-s</i> , C-N str	Aliphatic amines
	<i>m-w</i> , P-H def	P-H
	<i>s, p</i> sym C=C=C str	Allenes
	<i>m-s</i> , CCC str	Straight chain alkanes
	<i>m-w, p</i> sym CNC str	Saturated aliphatic ethers
	<i>s, p</i> sym COC str	Ethers
	<i>s</i> , ring vib	ring =C-O-C=
1207	<i>s</i> , amide III band	trans secondary amides
	<i>s, p</i> N=N=N sym str	Azides
	<i>s</i> , CH def	cis (sat) CH=CH (sat)

	<i>m</i> , CC <sub>3</sub> vib	t-butyl groups
	<i>m-w</i> , P=O str	P=O str
	<i>m-s</i> , C-N str	Aliphatic amines
	<i>m-s</i> C-O-O str	Formates
<b>1226</b>	<i>m-s</i> , C-N str	Aliphatic amines
	<i>m-w</i> , P=O str	P=O str
	<i>s</i> , CH def	<i>cis</i> (sat) CH=CH (sat)
	<i>m</i> , CC <sub>3</sub> vib	t-butyl groups
	<i>m-s</i> , ring vib	<i>p</i> -disubstituted benzenes
	<i>m-s</i> , CO-O str	Acetates
<b>1238</b>	<i>s</i> , <i>p</i> N=N=N sym str	Azides
	<i>s</i> , amide III band	trans secondary amides
	<i>s</i> , CH def	<i>cis</i> (sat) CH=CH (sat)
	<i>s</i> , <i>p</i> sym	Nitrates -O-NO <sub>2</sub>
	<i>m</i> , CC <sub>3</sub> vib	t-butyl groups
<b>1274</b>	<i>s</i> , amide III	<i>trans</i> secondary amides
	<i>s</i> , <i>p</i> N=N=N sym str	Azides
	<i>s</i> , CH def	<i>trans</i> (sat) CH=CH (sat) and <i>cis</i> (sat) CH=CH (sat)
	<i>m</i> , CC <sub>3</sub> vib	t-butyl groups
<b>1330</b>	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Carboxylate ions
	<i>m-s</i> , CH in-plane rocking	Aldehydes
	<i>m-w</i> , OH def	Phenols
	<i>s-m</i> , asym N-C-N str	Ureas
	<i>w</i> , CH in-plane def	=C=CH (hydrocarbons)
	<i>s</i> , C-N amide III band	Cis form secondary amides
	<i>w</i> , sym CH <sub>3</sub> def	PCH <sub>3</sub>
	<i>s</i> , <i>p</i> N=N=N sym str	Azides
<b>1370</b>	<i>s</i> , CH def	Cis (sat) CH=CH (sat)
	<i>m-s</i> , CH in-plane rocking	Aldehydes
	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Aromatic acid salts and carboxylate ions
	<i>m-s</i> , <i>p</i> CH <sub>2</sub> def	Vinyls-CH=CH <sub>2</sub>
<b>1407</b>	<i>s</i> , amide III band	Primary thioamides
	<i>w</i> , asym CH <sub>3</sub> def	-PCH <sub>3</sub>
	<i>m-s</i> , CH in-plane rocking	Aldehydes
	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Aromatic acid salts and carboxylate ions
	<i>m-s</i> , <i>p</i> CH <sub>2</sub> def	Vinyls-CH=CH <sub>2</sub>
<b>1426</b>	<i>m-w</i> , OCH <sub>3</sub> , OCH <sub>2</sub> def	-OCH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> -
	<i>s</i> , <i>p</i> N=C=O sym str	Isocyanates -N=C=O
	<i>w</i> , asym CH <sub>3</sub> def	-PCH <sub>3</sub>
	<i>m-s</i> , CH in-plane rocking	Aldehydes
	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Aromatic acid salts and carboxylate ions
	<i>m-s</i> , <i>p</i> CH <sub>2</sub> def	Vinyls-CH=CH <sub>2</sub>
<b>1467</b>	<i>s</i> , amide III band	Primary thioamides
	<i>m-w</i> , OCH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> def	n-Alkanes
	<i>m-w</i> , CH <sub>2</sub> sym def	Cyclopropyl compounds and POCH <sub>3</sub>
<b>1516</b>	<i>w</i> , NH def	Secondary amines
	<i>m-w</i> , asym NO <sub>2</sub> str	Aromatic nitro compounds
	<i>w</i> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> sym def	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
<b>1536</b>	<i>w</i> , NH def	Secondary amines
	<i>w</i> , amide II	Ureas
	<i>w</i> , CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asym str	Aromatic acid salts
	<i>s</i> , C=C str	C=C conjugated with C=C or C=O and <i>cis</i> unsat -CH=CH-unsat

<b>1607</b>	<i>w</i> , NH <sub>2</sub> scissoring	Primary amines
	<i>m</i> , C=O str	Enol from diketones
	<i>s</i> , several bands ring C=C str	Benzene derivatives
	<i>w</i> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> asym str	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
	<i>w</i> , CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asym str	Aromatic acid salts
	<i>w</i> , amide III band	Ureas
<b>1624</b>	<i>w-m</i> , amide I and II	Primary and secondary amides
	<i>w</i> , NH <sub>2</sub> scissoring	Primary amines
	<i>s</i> , C=C str	<i>trans</i> (unsat) -CH=CH-(unsat) and C=C conjugated with C=C, C=O or with aryl
	<i>s</i> , several bands ring C=C str	Benzene derivatives
	<i>m</i> , C=O str	Enol from diketones
	<i>w</i> , CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asym str	Carboxylic acid salts
<b>1692</b>	<i>w-m</i> , C=O str	αβγ -unsat. aliphatic carboxylic acids (as dimer), aryl aldehydes, thiol acids, -COSH and αβγ -unsat. ketones <i>s-cis</i> form
<b>1767</b>	<i>w-m</i> , C=O str	Secondary amides
	<i>m</i> , <i>p</i> C=O str	Aryl and α, β-unsat acid chlorides
<b>1808</b>	<i>m-w</i> , <i>p</i> C=O str	Sat. Aliphatic acid chlorides and αβγ unsat β -lactones (unsat 5 membered ring)
<b>1925</b>	<i>v</i> , asym C=C=C str	Allenes and symmetrically disubstituted allenes
<b>2010</b>	<i>m-s</i> , <i>p</i> br, asym NCS str	Isothiocyanates -N=C=S
<b>2041</b>	<i>m-s</i> , <i>p</i> br, asym NCS str	Isothiocyanates -N=C=S
<b>2086</b>	<i>m-s</i> , <i>p</i> br, asym NCS str	Isothiocyanates -N=C=S
<b>2122</b>	<i>v</i> , asym -N=C=C str	Ketenimines >C=N=N-
	<i>m-s</i> , <i>p</i> asym str	Azides -N=N=N
	<i>v</i>	Ketenes >C=C=O
<b>2139</b>	<i>v</i> , asym -N=C=C str	Ketenimines >C=N=N-
	<i>m-s</i> , <i>p</i> asym str	Azides -N=N=N
<b>2161</b>	<i>v</i> , asym -N=C=C str	Ketenimines >C=N=N-
	<i>v</i>	Ketenes >C=C=O
	<i>m-s</i> , <i>p</i> asym str	Azides -N=N=N
	<i>m-s</i> , <i>p</i> br, asym NCS str	Isothiocyanates -N=C=S
<b>2211</b>	<i>m-s</i> , CN str	P-CN
<b>2275</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2292</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2335</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2361</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2373</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2479</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2494</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2517</b>	<i>s</i> , <i>p</i> S-H str	<b>Mercaptans, aliphatic thiols and thiophenols</b>
	<i>s</i> , <i>p</i> S-H str	<b>CH<sub>2</sub>SH</b>
<b>2585</b>	<i>s</i> , <i>p</i> S-H str	<b>Mercaptans, aliphatic thiols, thiophenols and CH<sub>2</sub>SH</b>

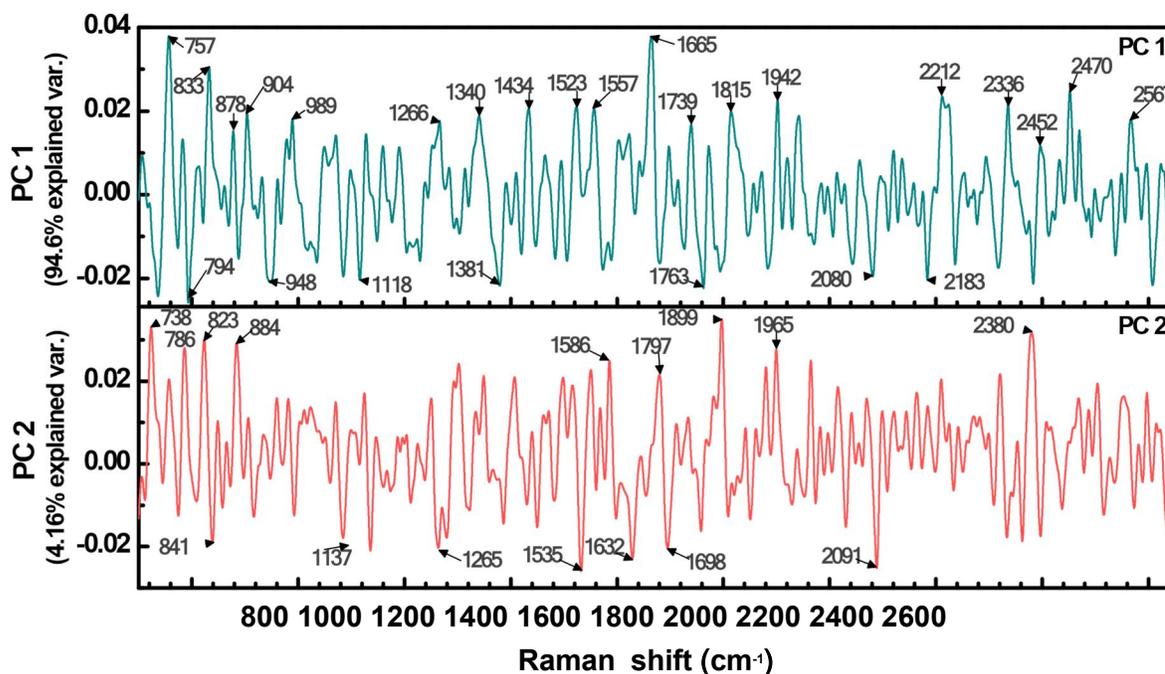


Fig. S1. Primer y Segundo PC's de los espectros de los virus fd-cys-Au y el control negativo

Tabla S2. Asignación de los grupos funcionales y modos para los 3 primeros PC's de los espectros de los virus fd-cys-Au y el control negativo y mostrados en la Fig. S1

Corrimiento Raman (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de modo vibracional	Asignación tentativa de grupos funcionales
<b>738</b>	<i>s</i> , C-S str	Aliphatic sulphides and disulphides
	<i>m</i> , NO <sub>2</sub> def	Nitroamines N-NO <sub>2</sub>
	<i>m-s</i> , <i>p</i> asym CSC str	CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> -
	<i>m</i> , <i>p</i> O-C=O in-plane def	Formates
	<i>m-s</i> , sym skeletal vib	Tertiary butyl groups
<b>757</b>	<i>s</i> , <i>p</i> asym CNC str	Tertiary amides
	<i>s</i> , amide I	Thioamides
	<i>s</i> , amide VII	Primary thioamides
	P=S str	P=S
	<i>m</i> , <i>p</i> skeletal vib	Branched alkanes
	<i>m-s</i> , ring vib	<i>Para</i> disubstituted benzenes
	<i>m-s</i> , <i>p</i> asym CSC str	CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> -
	<i>m</i> , <i>p</i> O-C=O in-plane def	Formates
	<i>m-s</i> , sym skeletal vib	Tertiary butyl groups
<b>786</b>	<i>s</i> , <i>p</i> asym CNC str	Tertiary amides
	POP str	P-O-P
	P=S str	P=S
	<i>s</i> , amide I band	Thioamides
	<i>m</i> , <i>p</i> skeletal vib	Branched alkanes
	<i>m-s</i> , ring vib	<i>Para</i> disubstituted benzenes
	<i>m-s</i> , C <sub>4</sub> O skeletal vib and Co def	Tertiary alcohols
	<i>m-s</i> , C <sub>4</sub> O skeletal vib and Co def	Tertiary alcohols

<b>794</b>	<i>s, p</i> asym CNC str	Tertiary amides
	POP str	P-O-P
	P=S str	P=S
	<i>s</i> , amide I band	Thioamides
	<i>m, p</i> skeletal vib	Branched alkanes
<b>823</b>	<i>m-s</i> , C-S str	Secondary thioamides
	<i>m-s</i> , skeletal vib	Straight chain and branched alkanes
	<i>s, p</i> CCO str	Primary and secondary alcohols
	<i>m-s</i> , sym COC str	Aliphatic and vinyl ethers
	<i>s, p</i> asym CNC str	Tertiary amides
	POP str	P-O-P
	P=S str	P=S
	<i>m-s</i> , ring vib	Para disubstituted benzenes
	<i>m-s</i> , C <sub>3</sub> O skeletal vib	Secondary alcohols
<b>833</b>	<i>m-s</i> , C-S str	Secondary thioamides
	<i>s, p</i> asym CNC str	Tertiary amides
	<i>s</i> , amide I	Thioamides
	<i>s, p</i> CCO str	Primary and secondary alcohols
	<i>m-s</i> , sym COC str	Aliphatic and vinyl ethers
	POP str	P-O-P
	P=S str	P=S
	<i>m-s</i> , skeletal vib	Straight and branched chain alkanes
	<i>m-s</i> , C <sub>3</sub> O skeletal vib	Secondary alcohols
	<i>m-s</i> , ring vib	<i>Para</i> disubstituted benzenes
<b>841</b>	<i>m-s</i> , C-S str	Secondary thioamides
	<i>m-s</i> , skeletal vib	Straight chain alkanes
	<i>s, p</i> CCO str	Primary and secondary alcohols
	<i>m-s</i> , sym COC str	Aliphatic and vinyl ethers
	<i>s, p</i> asym CNC str	Tertiary amides
	POP str	P-O-P
	P=S str	P=S
	<i>s</i> amide I band	Thioamides
<b>878</b>	<i>m-s, p</i> C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
	<i>m-s</i> , C-S str	Secondary thioamides
	<i>m</i> , CH def	<i>cis</i> CH=CH-
	<i>m-s</i> , skeletal vib	Straight chain alkanes
	<i>s, p</i> CCO str	Primary and secondary alcohols
	<i>m-s</i> , sym COC str	Aliphatic ethers
<b>884</b>	<i>m-s</i> , skeletal vib	Straight chain alkanes
	<i>s, p</i> CCO str	Primary and secondary alcohols
	<i>m-s</i> , sym COC str	Aliphatic ethers
	<i>m-s, p</i> C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
	<i>m</i> , CH def	<i>cis</i> CH=CH-
	<i>m-s</i> , C-S str	Secondary thioamides
<b>904</b>	<i>m-s, p</i> C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
	<i>m</i> , CH def	<i>cis</i> CH=CH-
<b>948</b>	<i>s, p</i> sym COC str	Ethers
	<i>vs</i> ring vib	Polysubstituted pyridines
	<i>w</i> CH def	Vinyl compounds -CH=CH <sub>2</sub>
<b>989</b>	<i>m-s, p</i> C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
	<i>m-s</i> , C=C, C=N str	Pyrimidines
	<i>s</i> , ring vib	Pyridines

	<i>m-w</i> , P-H def	P-H
	<i>s</i> , <i>p</i> sym COC str	Ethers
	<i>s</i> , CH <sub>2</sub> /CH wagging vib	Cyclopropyl compounds
	<i>m</i> , CH def	<i>trans</i> CH=CH- and <i>cis</i> CH=CH-
<b>1118</b>	<i>m-w</i> , P=O str	P=O str
	<i>m-s</i> , C-N str	Aliphatic amines
	<i>m-w</i> , P-H def	P-H
	<i>w</i> , asym C-O-C str	Saturated aliphatic amines
	<i>s</i> , <i>p</i> sym COC str	Ethers
<b>1137</b>	<i>m-w</i> , P-H def	
	<i>w</i> , asym C-O-C str	Saturated aliphatic amines
	<i>s</i> , <i>p</i> sym COC str	Ethers
<b>1265</b>	<i>s</i> , amide III	<i>trans</i> secondary amides
	<i>s</i> , <i>p</i> N=N=N sym str	Azides
	<i>s</i> , CH def	<i>cis</i> (sat) CH=CH (sat)
	<i>m</i> , CC <sub>3</sub> vib	t-butyl groups
<b>1340</b>	<i>s</i> , C-N amide III	<i>cis</i> form secondary amides
	<i>s-m</i> , asym N-C-N str	Ureas
	<i>s</i> , <i>p</i> N=N=N sym str	Azides
	<i>m-s</i> , CH in-plane rocking	Aldehydes
	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Carboxylate ions
	<i>m-w</i> , OH def	Phenols
<b>1381</b>	<i>s</i> , CH def	<i>cis</i> (sat) CH=CH (sat)
	<i>s</i> , amide III band	Primary thioamides
	<i>m-s</i> , CH in-plane rocking	Aldehydes
	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Aromatic acid salts and carboxylate ions
	<i>m-s</i> , <i>p</i> CH <sub>2</sub> def	Vinyls-CH=CH <sub>2</sub>
<b>1434</b>	<i>s</i> , amide III	Primary thioamides
	<i>m-s</i> , CH in-plane rocking	Aldehydes
	<i>m-s</i> , <i>p</i> CH <sub>2</sub> def	Vinyls-CH=CH <sub>2</sub>
	<i>m-w</i> , OCH <sub>3</sub> , OCH <sub>2</sub> def	-OCH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> -
	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Aromatic acid salts and carboxylate ions
<b>1523</b>	<i>w</i> , amide III	Ureas
	<i>w</i> , NH def	Secondary amines
	<i>w</i> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> sym def	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
<b>1557</b>	<i>w</i> , amide III	Ureas
	<i>w</i> , NH def	Secondary amines
	<i>s</i> , several bands ring C=C str	Benzene derivatives
<b>1586</b>	<i>w</i> , NH <sub>2</sub> scissoring	Primary amines
	<i>m</i> , C=O str	Enol from diketones
	<i>w</i> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> asym str	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
	<i>w</i> , CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asym str	Aromatic acid salts
	<i>w</i> amide III band	Ureas
<b>1632</b>	<i>s-m</i> , asym NO <sub>2</sub> str	Nitrates -ONO,
	<i>s</i> , C=C str	C=C conjugated with C=C or C=O or with aryl and <i>cis</i> (unsat) -CH=CH-unsat
	<i>w-m</i> , amides II	Primary amides
	<i>w</i> , NH <sub>2</sub> scissoring	Primary amines
	<i>m</i> , C=O str	Enol from diketones
	<i>s</i> , several bands ring C=C str	Benzene derivatives
<b>1665</b>	<i>w-m</i> , NH <sub>2</sub> def	Primary amides
	<i>m-w</i> , amide I	Primary, secondary and tertiary amides

	<i>m-s</i> , C=N str	Imines =C=N-
	<i>s</i> , C=C str	=C=C-N
	<i>s</i> , C=C str	<i>trans</i> (unsat)-CH=CH-(unsat)
	<i>m-w</i> , C=O str	Unsat ketones
<b>1698</b>	<i>w-m</i> , C=O str	Unsat aliphatic carboxylic acids (as dimer), thiol acids, -COSH and secondary amides
	<i>v</i> , C=O str	Aryl aldehydes
	<i>w</i> , C=O str	Unsat ketones <i>cis</i> form
<b>1739</b>	<i>m</i> , C=O str	Sat. aliphatic esters, ketones and aldehydes and cationic $\alpha$ amino acids
<b>1763</b>	<i>m-w</i> , C=O str	$\alpha$ -lactones (sat 5-membered ring)
<b>1797</b>	<i>m-w</i> , C=O str	$\alpha$ lactones (4-membered ring) and sat. aliphatic acid chlorides
<b>1815</b>	<i>m-w</i> , C=O str	Lactones (4-membered ring)
<b>1942</b>	<i>v</i> , asym C=C=C str	Allenes and asymmetrically disubstituted allenes >C=C=CH <sub>2</sub>
<b>1965</b>	<i>v</i> , asym C=C=C str	Allenes and monosubstituted allenes >C=C=CH <sub>2</sub>
<b>2080</b>	<i>m-s</i> , <i>p</i> asym str	Azides -N=N=N
<b>2091</b>	<i>m-s</i> , <i>p</i> br, asym NCS str	Isothiocyanates -N=C=S
<b>2183</b>	<i>m-s</i> , <i>p</i> asym str	Azides -N=N=N
<b>2212</b>	<i>s</i> , C=N str	Aliphatic nitriles
	<i>m-s</i> , CN str	P-CN
<b>2336</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2380</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2452</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2470</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2567</b>	<i>s</i> , <i>p</i> S-H str	Mercaptans, aliphatic thiols, thiophenols and CH <sub>2</sub> SH

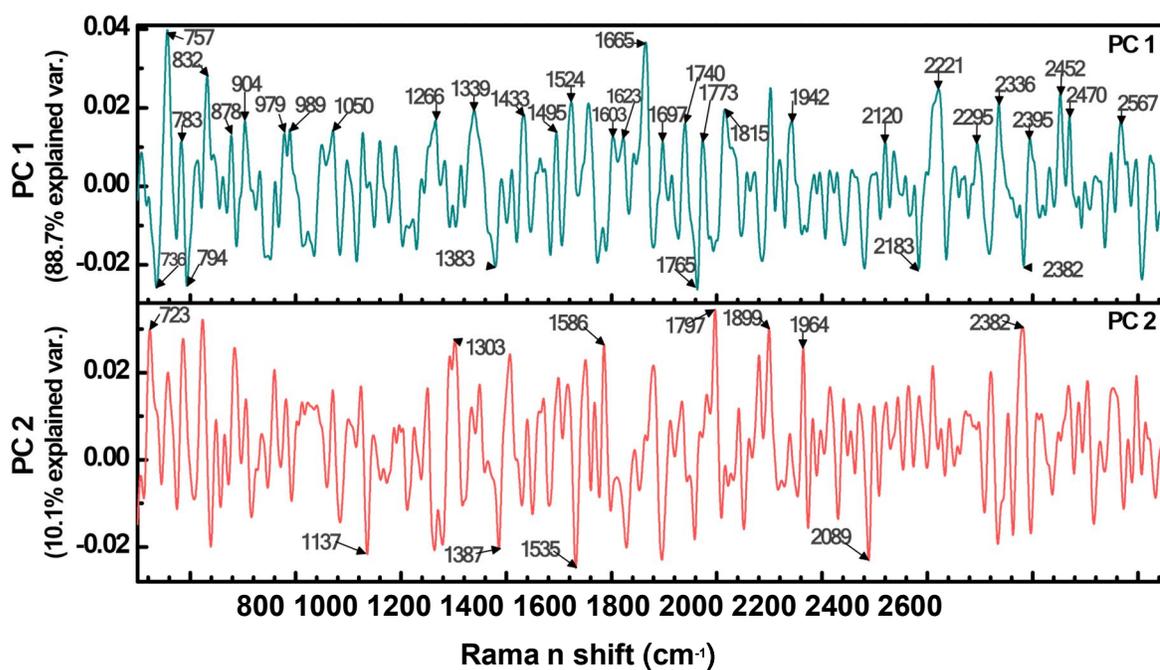


Fig. S2. Primer y Segundo PC's de los espectros de los virus fd-cys-Au y el fd-Au.

Tabla S3. Asignación de los grupos funcionales y modos para los 3 primeros PC's de los espectros de los virus fd-cys-Au y fd-Au y mostrados en la Fig. S2.

Corrimiento Raman (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de modo vibracional	Asignación tentativa de grupos funcionales
<b>723</b>	<i>m-s, p</i> asym CSC str	CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> -
	<i>m, p</i> O=C=O in-plane def	Formates
	<i>s</i> , amide VII	Primary thioamides
	<i>m-s, sym</i> skeletal vib	Tertiary butyl groups
	<i>s</i> , C-S str	Aliphatic sulphides and disulphides
<b>736</b>	<i>m</i> , NO <sub>2</sub> def	Nitroamines >N-NO <sub>2</sub>
	<i>m-s, p</i> asym CSC str	CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> -
	<i>m, p</i> O=C=O in-plane def	Formates
	<i>m-s sym</i> skeletal vib	Tertiary butyl groups
	<i>s</i> , C-S str	Aliphatic sulphides and disulphides
<b>757</b>	<i>s, p</i> asym CNC str	Tertiary amides
	P=S str	P=S
	<i>m, p</i> skeletal vib	Branched alkanes
	<i>m-s</i> , ring vib	<i>Para</i> disubstituted benzenes
	<i>m, p</i> CCl str	Saturated aliphatic acid chlorides
	<i>m-s, sym</i> skeletal vib	Tertiary butyl groups
	<i>m-s, p</i> asym CSC str	CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> -
	<i>m, p</i> O=C=O in-plane def	Formates
<b>783</b>	<i>s, p</i> asym CNC str	Tertiary amides
	P=S str	P=S
	POP str	P-O-P
	<i>m, p</i> skeletal vib	Branched alkanes
	<i>m-s</i> , ring vib	<i>Para</i> disubstituted benzenes
	<i>m-s</i> , CO def	Tertiary alcohols
<b>794</b>	<i>m-s</i> , CO skeletal vib and CO def	Tertiary alcohols
	<i>s, p</i> asym CNC str	Tertiary amides
	POP str	P-O-P
	P=S str	P=S
	<i>m, p</i> skeletal vib	Branched alkanes
	<i>m-s, p</i> asym CNC str	Tertiary amides
<b>832</b>	POP str	P-O-P
	P=S str	P=S
	<i>m-s</i> , skeletal vib	Straight and branched chain alkanes
	<i>m-s, sym</i> COC str	Aliphatic and vinyl ethers
	<i>s, p</i> CCO str	Primary and secondary alcohols
	<i>m-s, ring</i> vib	<i>para</i> disubstituted benzenes
	<i>m-s, p</i> C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
<b>878</b>	<i>m</i> , CH def	<i>cis</i> CH=CH-
	<i>m-s</i> , skeletal vib	Straight chain alkanes
	<i>s, p</i> CCO str	Primary and secondary alcohols
	<i>m-s, sym</i> COC str	Aliphatic ethers
	<i>m-s, p</i> C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
<b>904</b>	<i>m</i> , CH def	<i>cis</i> CH=CH-
	<i>m-s, p</i> C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
<b>979</b>	<i>s</i> , ring vib	Pyridines
	<i>m-s, p</i> C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
	<i>m</i> , CH def	<i>trans</i> CH=CH- and <i>cis</i> CH=CH-

<b>989</b>	<i>m-s</i> , p C-N str	Saturated primary and secondary nitro compounds
	<i>m-s</i> , C=C, C=N str	Pyrimidines
	<i>s</i> , ring vib	Pyridines
	<i>m-w</i> , P-H def	P-H
	<i>m</i> , CH def	<i>trans</i> CH=CH- and <i>cis</i> CH=CH-
	<i>s</i> , CH <sub>2</sub> /CH wagging vib	Cyclopropyl compounds
	<i>s</i> , <i>p</i> sym COC str	Ethers
<b>1050</b>	<i>m-s</i> , ring vib	2-monosubstituted pyridines
	<i>m-s</i> , CCC str	Straight chain alkanes
	<i>s</i> , <i>p</i> CH in-plane def	<i>orthodisubstituted</i> benzenes
	<i>s</i> , <i>p</i> sym COC str	Ethers
	<i>m</i> , CO-C str	Formates
<b>1071</b>	<i>w</i> , asym C-O-C str	Saturated aliphatic amines and ethers
	<i>m-s</i> , CCC str	Straight chain alkanes
	<i>s</i> , <i>p</i> sym C=C=C str	Allenes
<b>1128</b>	<i>m-s</i> , C-N str	-CO, NH, NH <sub>2</sub>
	<i>s</i> , <i>p</i> sym COC str	Ethers
<b>1137</b>	<i>m-w</i> , P-H def	P-H
	<i>w</i> , asym C-O-C str	Saturated aliphatic amines
	<i>s</i> , <i>p</i> sym COC str	Ethers
<b>1160</b>	<i>m-s</i> , C-N str	Aliphatic amines
<b>1190</b>	<i>m-s</i> , C-N str	Aliphatic amines
	<i>s</i> , CH def	<i>cis</i> (sat) CH=CH (sat)
	<i>m</i> , CC <sub>3</sub> vib	t-butyl groups
	<i>m-s</i> , C-O-O str	Formates
<b>1266</b>	<i>s</i> , amide III	<i>trans</i> secondary amides
	<i>s</i> , <i>p</i> N=N=N sym str	Azides
	<i>s</i> , CH def	<i>cis</i> (sat) CH=CH (sat)
	<i>m</i> , CC <sub>3</sub> vib	t-butyl groups
<b>1303</b>	<i>v</i> , asym SO <sub>2</sub> str	Sulphones
	<i>w</i> , sym CH <sub>3</sub> def	PCH <sub>3</sub>
	<i>s</i> , <i>p</i> N=N=N sym str	Azides
<b>1339</b>	<i>s</i> , C-N amide III	<i>cis</i> form secondary amides
	<i>s-m</i> , asym N-C-N str	Ureas
	<i>s</i> , <i>p</i> N=N=N sym str	Azides
	<i>m-s</i> , CH in-plane rocking	Aldehydes
	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Carboxylate ions
<b>1383</b>	<i>s</i> , CH def	<i>cis</i> (sat) CH=CH (sat)
	<i>s</i> , amide III band	Primary thioamides
	<i>s</i> , <i>p</i> N=C=O sym str	Isocyanates -N=C=O
	<i>m-s</i> , CH in-plane rocking	Aldehydes
	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Aromatic acid salts and carboxylate ions
	<i>m-s</i> , p CH <sub>2</sub> def	Vinyls-CH=CH <sub>2</sub>
<b>1433</b>	<i>m-s</i> , CH in-plane rocking	Aldehydes
	<i>m-s</i> , p CH <sub>2</sub> def	Vinyls-CH=CH <sub>2</sub>
	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Aromatic acid salts and carboxylate ions
<b>1495</b>	<i>w</i> , NH def	Secondary amines
	<i>w</i> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> sym def	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
<b>1524</b>	<i>w</i> , amide III	Ureas
	<i>w</i> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> sym def	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
<b>1535</b>	<i>m-s</i> , <i>p</i> sym CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str	Aromatic acid salts
	<i>w</i> , amide III band	Ureas

	<i>w</i> , NH def	Secondary amines
	<i>m-w</i> , asym NO <sub>2</sub> str	Aromatic nitro compounds
<b>1556</b>	<i>w</i> , NH def	Secondary amines
	<i>w</i> , amide III	Ureas
	<i>s</i> , several bands ring C=C str	Benzene derivatives
<b>1586</b>	<i>w</i> , NH <sub>2</sub> scissoring	Primary amines
	<i>m</i> , C=O str	Enol from diketones
	<i>w</i> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> asym str	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
	<i>w</i> , CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asym str	Aromatic acid salts
<b>1603</b>	<i>w</i> , NH <sub>2</sub> scissoring	Primary amines
	<i>w</i> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> asym str	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
	<i>s</i> , C=C str	C=C conjugated with C=C or C=O
	<i>s</i> , several bands ring C=C str	Benzene derivatives
	<i>m</i> , C=O str	Enol from diketones
<b>1623</b>	<i>w-m</i> , amides II	Primary amides
	<i>w</i> , NH <sub>2</sub> scissoring	Primary amines
	<i>w</i> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> asym str	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
	<i>s</i> , C=C str	C=C conjugated with C=C, C=O or with aryl
	<i>m</i> , C=O str	Enol from diketones
<b>1665</b>	<i>m-w</i> , amide I band	Primary, secondary and tertiary amides
	<i>w-m</i> , NH <sub>2</sub> def	Primary amides
	<i>s</i> , <i>p</i> C=C str	=C=CH- and =C=C-N
	<i>m-w</i> , C=O str	αβγ unsat ketones and ureas
<b>1697</b>	<i>w-m</i> , C=O str	αβγ unsat. aliphatic carboxylic acids (as dimer), aryl aldehydes, αβγ -unsat ketones <i>s-cis</i> form and αβγ -unsat dicarboxylic acids, thiol acids, -COSH, secondary amides
<b>1740</b>	<i>m</i> , C=O str	Sat aliphatic esters, ketones and aldehydes and cationic α amino acids (aq. sln.)
<b>1765</b>	<i>m-w</i> , <i>p</i> C=O str	Aryl and α, β-unsat acid chlorides
	<i>m-w</i> , C=O str	Lactones (sat 5-membered ring)
<b>1773</b>	<i>m-w</i> , C=O str	Lactones (sat 5-membered ring)
<b>1797</b>	<i>m-w</i> , C=O str	β lactones (4-membered ring)
	<i>m-w</i> , <i>p</i> C=O str	Sat. aliphatic acid chlorides
<b>1815</b>	<i>m-w</i> , C=O str	Lactones (4-membered ring)
	<i>m-w</i> , <i>p</i> C=O str	Sat. aliphatic acid chlorides
<b>1942</b>	<i>v</i> , asym C=C=C str	Allenes and asymmetrically disubstituted allenes =C=C=CH <sub>2</sub>
<b>1964</b>	<i>v</i> , asym C=C=C str	Allenes and monosubstituted allenes >C=C=CH <sub>2</sub>
<b>2089</b>	<i>m-s</i> , <i>p</i> asym str	Azides -N=N=N
<b>2120</b>	<i>v</i> , asym -N=C=C str	Ketenimines >C=N=N-
	<i>m-s</i> , <i>p</i> asym str	Azides -N=N=N
<b>2183</b>	<i>m-s</i> , <i>p</i> asym str	Azides -N=N=N
<b>2221</b>	<i>s</i> , C=N str	Aliphatic nitriles
	<i>m-s</i> , CN str	P-CN
<b>2295</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2336</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2382</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2395</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2452</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2470</b>	<i>m-w</i> , P-H str	P-H
<b>2567</b>	<i>s</i> , <i>p</i> S-H str	<b>Mercaptans, aliphatic thiols, thiophenols and CH<sub>2</sub>SH</b>

## II. PCA (ALGORITMO EN MATLAB)

```

clc;clear;
MM=load('C:\Users\Dana\Desktop\PCAs\PCA_Normal\Corrimiento_prom.txt','-ascii'); %Carga Archivo de corrimientos
400-2000
M=load('C:\Users\Dana\Desktop\PCAs\PCA_Normal\Au5_mas_Au30.txt','-ascii');
%M=normaliza(JJ);
[linea,columna]=size(M); %Obtiene tamaño de la Matriz
for i=1:columna
    Y=normaliza(M(:,i));
    %Y=M(:,i);
    %Lambda=1000000000 y p=0.1, p=0.3 PC1 y PC2, PC4 y PC2
    %ycorr=baseline(Y,1000000000,.3);
    %Lambda=100000 y p=0.01 PC1 y PC3
    ycorr=baseline(Y,100000,.2);
    %ycorr=baseline(Y,100000,.02);
    CC1=smooth(Y-ycorr); %RESTA LINEA BASE AL ESPECTRO ORIGINAL
    %CC=normaliza(CC1);
    BX(i,:)=CC1;
end
[ly,ly]=size(BX);
%figure(4)
%plot(MM(:,1),BX(1,:));
stdr = std(BX);
sr_SM = BX./repmat(stdr,ly,1);
[pcs_SM,newdata_SM,variances_SM,t2_SM] = princomp(sr_SM);
CompX=1;
CompY=2;
FF=newdata_SM(:,1:5);
figure(2)
%HOMBRES Y MUJERES
%h2=plot(newdata_SM(1:20,CompX),newdata_SM(1:20,CompY),'r*',newdata_SM(21:40,CompX),newdata_SM(21:40
,CompY),'b*',newdata_SM(41:60,CompX),newdata_SM(41:60,CompY),'g*'); %GRAFICA NORMALIZADO Y SMOOTH
%h2=plot(newdata_SM(1:20,xcomponente),newdata_SM(1:20,ycomponente),'o',newdata_SM(21:40,xcomponente),n
ewdata_SM(21:40,ycomponente),'>',newdata_SM(41:60,xcomponente),newdata_SM(41:60,ycomponente));
h2=plot(newdata_SM(1:27,CompX),newdata_SM(1:27,CompY),'o',newdata_SM(28:48,CompX),newdata_SM(28:48,C
ompY),'*');
legend('fd-cys-Au5 SERS','fd-Au5 SERS',1)
xlabel('PC1','FontSize',14);
ylabel('PC2','FontSize',14);
gname;
%*****PARA OBTENER PCS VS CORRIMIENTO
componente=1;
for i=1:5
    PESOS(:,i)=smooth(pcs_SM(i,:));
end
%PARA LA COMPONENTE 4 PC4
maxx_C4=max(pcs_SM(componente,:));
minx_C4=min(pcs_SM(componente,:));
con_C4=maxx_C4-minx_C4;
conx_C4=pcs_SM(componente,:)-con_C4;
XXX=smooth(smooth(conx_C4));
figure(3)
%plot(MM(400:4000,:),conx_C4,'-', 'MarkerFaceColor',[.1 .8 .1], 'Color','k', 'MarkerSize', 12, 'MarkerSize', 12);
h3=plot(MM(:,1),XXX(:,1),'-', 'MarkerFaceColor',[.1 .8 .1], 'Color','b', 'MarkerSize', 12);
legend('fd-cys-Au5 SERS','fd-Au5 SERS',1);
xlabel('Raman Shift (cm-1)','FontSize',14);
ylabel('PC1','FontSize',14);
grid on
save fd-cys-Au-newdata.TXT FF -ascii
save fd-cys-Au-pcs.TXT PESOS -ascii
%save Matlab_varios-newdata.TXT FF -ascii
%save Matlab_varios-pcs.TXT PESOS -ascii
%save Matlab_varios-var.TXT variances_SM -ascii

```

## III. INFECCIÓN, REPLICACIÓN Y ENSAMBLE DE LOS VIRUS FILAMENTOSOS

### Infección

El proceso de infección de *E. coli* por bacteriófagos filamentosos, requiere la interacción de la proteína pIII del virus con el pili F y el sistema proteico TolQRA de la bacteria<sup>35,36</sup>. Los pili bacterianos están anclados en la membrana bacteriana y son capaces de retraerse mediante la despolimerización de sus subunidades en la membrana. Los virus f1, M13 y fd utilizan al pili F de *E. coli* como receptor (Fig. S3), mientras que el bacteriófago Icke utiliza los pili N o P<sup>35,80</sup>.

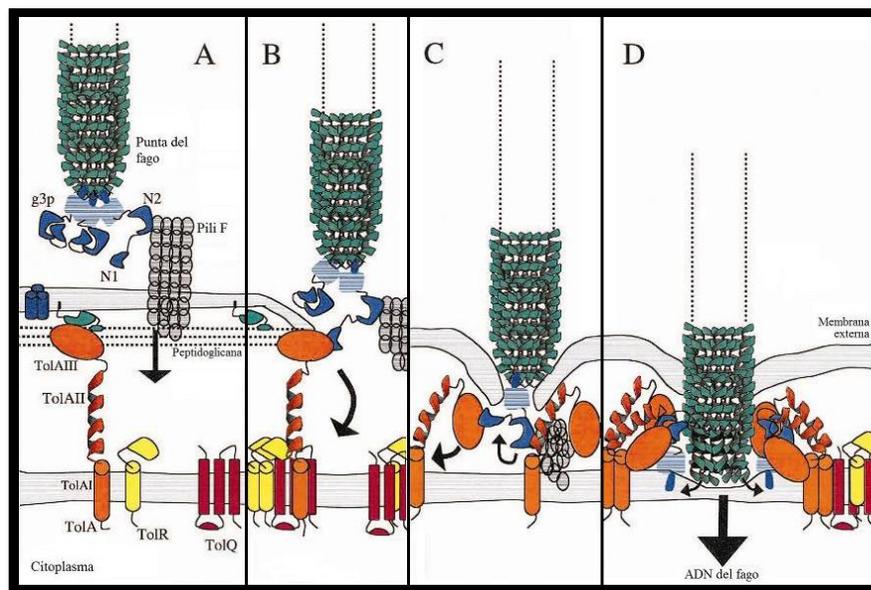


Fig. S3. Modelo de los eventos iniciales en la infección del bacteriófago fd a *E. coli*. Modificado de Karlsson y col., 2003<sup>35</sup>. El dominio N2 de la proteína 3 (pIII) del bacteriófago interactúa con el pili F de la bacteria (A). TolA interactúa con las proteínas OmpF (cilindros azules) y la lipoproteína Pal (verde) (B). Después de la retracción del pili F, el dominio N1 de pIII del virus se une al C-terminal de la proteína bacteriana TolA (TolAIII) (C). La retracción del pili acerca los dominios de pIII a los dominios de TolA. TolA adquiere un estado más compacto que provoca que las membranas interna y externa estén más cerca. En este punto, el dominio central de TolA (TolAII) interactúa con el dominio N2 de pIII. Mediante la acción de TolA, la proteína pVIII y probablemente la pVII y la pIX son despolimerizadas y se integran en la membrana al tiempo que el DNA entra en el citoplasma<sup>81</sup>. La proteína pIII es insertada en la membrana interna; esta región del virus se abre para permitir la entrada del DNA a la bacteria<sup>35</sup> (Fig. 3D).

## Replicación

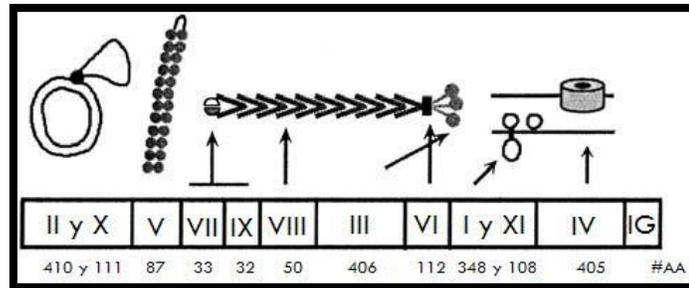


Fig. S4. Genes y productos de los virus filamentosos f1, M13 y fd. *Modificado de Russel y Model, 2006.*

El genoma de los Ff contiene 9 genes y una región mayor no codificante (IG) con los orígenes de replicación de las cadenas (+). Dos de estos genes codifican para dos proteínas, dando un total de once proteínas codificadas. Las proteínas pII, pX y pV se requieren para generar la cadena sencilla de DNA; pI, pXI y pIV se requieren en la morfogénesis del virus. pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX son componentes de la partícula viral<sup>82</sup>.

Una vez que el DNA de cadena sencilla (cadena (+)) entra en el citoplasma, las enzimas del huésped sintetizan la cadena (-). Un iniciador de RNA se necesita para sintetizar la cadena (-). La forma replicativa (FR), de doble cadena, es el molde para la expresión de los genes del virus. La expresión de los genes del virus es necesaria para la posterior replicación de la FR inicial. La proteína pII corta la cadena (+) de la FR en su origen, que se encuentra en la región IG<sup>83,84</sup>.

El extremo 3' es alargado por la DNA polimerasa III del huésped utilizando la cadena (-) como molde. La cadena (+) original es desplazada por la Rep helicasa al tiempo que la nueva cadena (+) es sintetizada. Al término de la síntesis de la cadena (+) el DNA es cortado y recircularizado por la actividad de pII para formar de nuevo la FR. Cabe mencionar que pX (idéntica en los 111 residuos del C-terminal de pII) se requiere para la acumulación estable de cadenas sencillas en esta etapa, el mecanismo es aún desconocido<sup>26</sup>.

La proteína dimérica pV se une cooperativamente con las nuevas cadenas (+) generadas en cuanto su concentración aumenta. Este proceso las protege y previene la acción de la polimerasa evitando su conversión a FR. Al inicio de la infección, cuando los niveles de pV son bajos, las cadenas sencillas recién sintetizadas son convertidas inmediatamente a la FR, entonces tanto la FR como las proteínas del virus incrementan exponencialmente. Cuando estas proteínas se unen al DNA, colapsan la cadena sencilla en una estructura con forma de bastón, que tiene un tamaño de 800-900nm de longitud. En esta estructura el DNA deja expuesta la Señal de Empaque (*SE, packaging signal*), debido a que la unión con pV es relativamente débil<sup>26</sup>.

## Ensamblaje

El ensamblaje de los bacteriófagos filamentosos es un proceso secretor que ocurre en la membrana citoplásmica<sup>85</sup>. Las 8 proteínas codificadas por el virus que están directamente relacionadas con el ensamble (ver apartado anterior), son proteínas integrales en la membrana (Fig. S5), aquí, formando un complejo, se encuentran las tres proteínas de morfogénesis del virus (pI, pXI y pIV), posicionadas en ambos lados de las dos membranas. Los resultados de estudios bioquímicos indican que el C-terminal del dominio periplásmico de las proteínas pI y pXI (proteínas de la membrana interna) interactúan con el N-terminal del dominio periplásmico de la proteína pIV (proteína de la membrana externa).

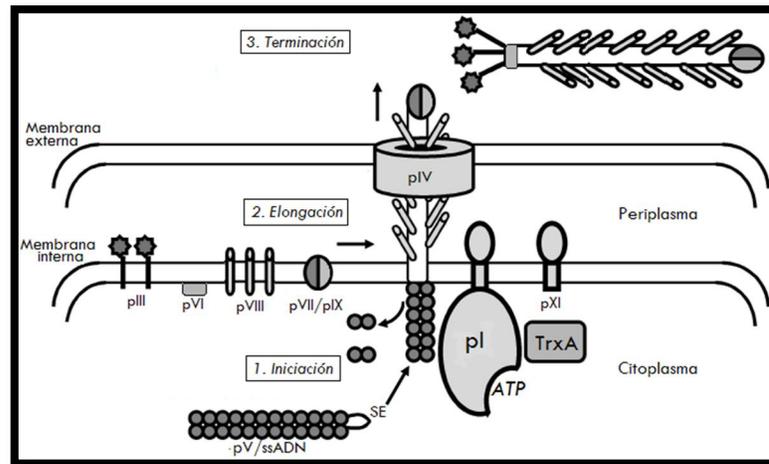


Fig. S5. Modelo hipotético de los procesos de ensamblado extrusión de un bacteriófago filamentoso, modificado de *Russel y Model, 2006*<sup>26</sup>.

El ensamblaje de la partícula viral requiere de un sitio de ensamble, una cadena sencilla de DNA apropiadamente presentada, la proteína mayor de envoltura (pVIII), 4 proteínas menores de envoltura (pVII, pIX, pIII y pVI) y la presencia de la tioredoxina reductasa del huésped<sup>86</sup>.

Las proteínas pI y pXI forman un complejo multimérico con alrededor de seis copias de cada una<sup>87</sup>. El dominio N-terminal citoplásmico de pI contiene un motivo de unión al DNA, el cual es esencial para el inicio ensamble del bacteriófago.

La elongación del virus (2), involucra el reemplazo sucesivo de los dímeros de pV por las proteínas de envoltura embebidas en la membrana pVIII, así como la salida simultánea del DNA a través de la membrana<sup>26</sup>. La proteína pIV forma un multímero en la membrana externa compuesta de 12 a 14 subunidades. Este complejo resistente a detergentes tiene forma de barril con una cavidad central de aproximadamente 8nm de diámetro, suficiente para soportar el paso del bacteriófago ensamblado<sup>88</sup>. El alargamiento del bacteriófago continúa hasta que el final del DNA viral se encuentra cubierto con pVIII; en este punto las proteínas pIII y pVI, también embebidas en la membrana, se incorporan al extremo terminal de la partícula viral naciente, estas proteínas sufren un cambio conformacional que las estabiliza y las desprende de la membrana<sup>89,90</sup> (3).

## IV. FIGURAS ADICIONALES

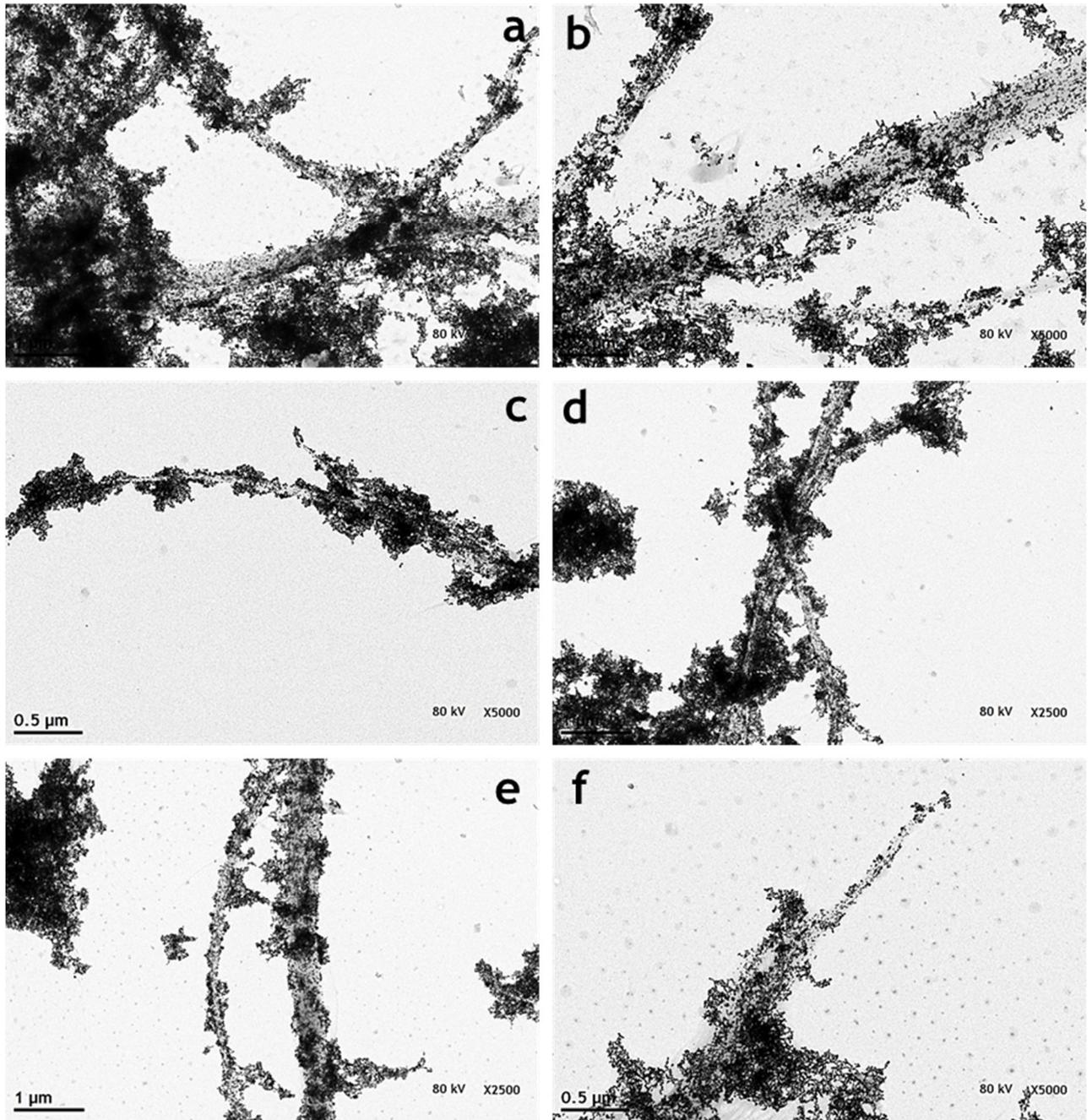


Fig. S6. Micrografías electrónicas de nanocables de oro (virus fd-cys unidos a AuNP's), después de ser sometidos a diferentes tiempos de sonicación: a y b) 10 s, c y d) 30 s, e y f) 1min. En algunas regiones de los virus se observan agregados de AuNP's, los cuales no se desagregaron a pesar de la sonicación.

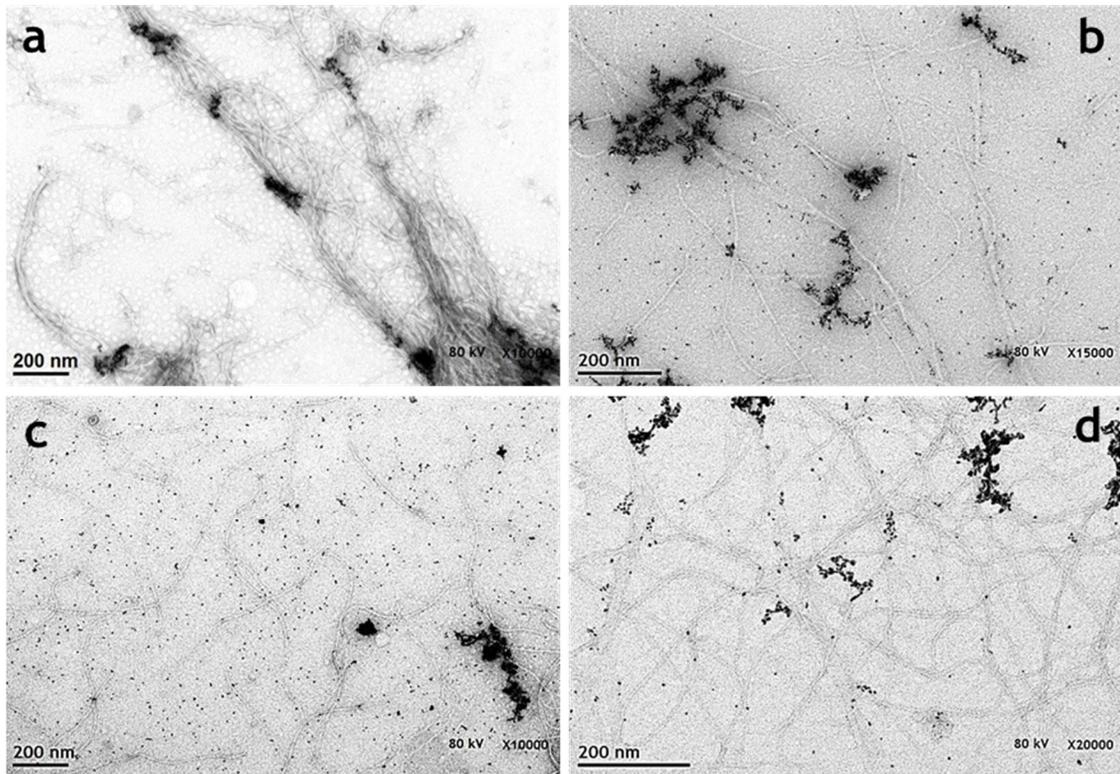


Fig. S7. Micrografías electrónicas de virus fd-cys, sin reducir y en presencia de AuNP's. esta muestra corresponde al control negativo, se aprecia que, en su mayoría, las AuNP's (puntos electrodensos) no se unen al virus.

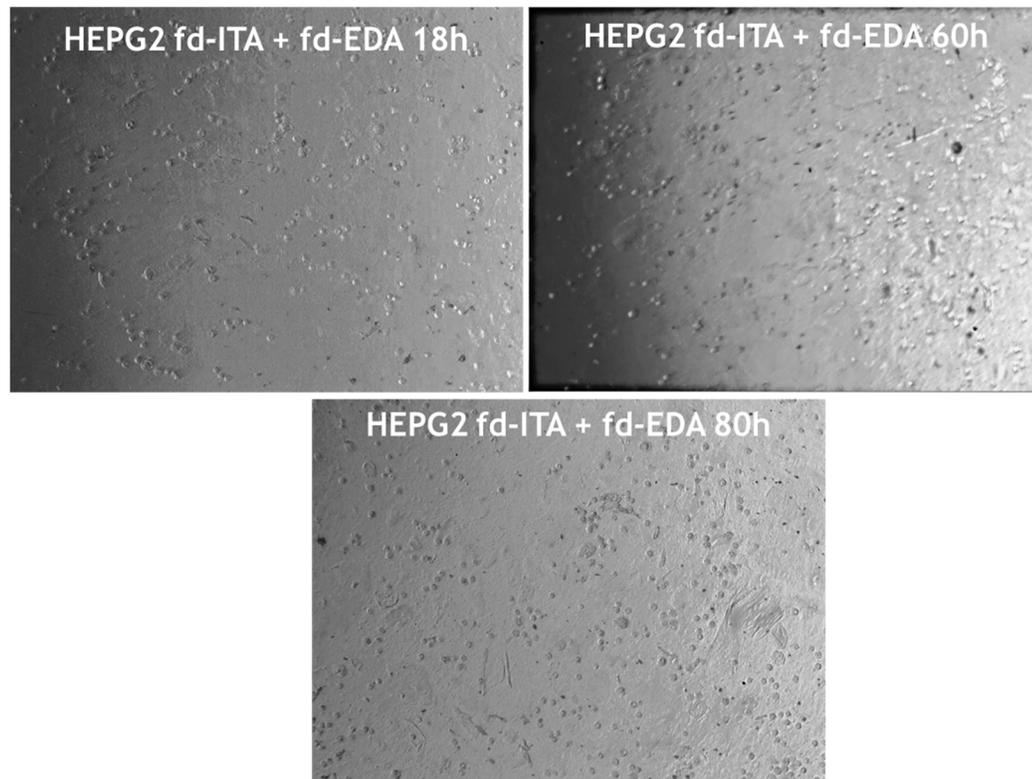


Fig. S8. cultivo de células HEPG2 en presencia de la mezcla de virus fd-ITA + fd-EDA, a las 18, 60 y 80 h. al parecer, si hubo crecimiento en este medio, aunque no se alcanzó la confluencia.

## V. ARTÍCULOS PUBLICADOS Y EN PREPARACIÓN

- Rheology and DWS Microrheology of Concentrated Suspensions of the Semiflexible Filamentous fd-Virus. 2012. E. Sarmiento-Gomez, **D. Montalvan-Sorrosa**, C. Garza, J. Mas-Oliva and R. Castillo, The European Physical Journal E, 35:35, DOI 10.1140/epje/i2012-12035-8
- Microenvironmentally Controlled Secondary Structure Motifs of Apolipoprotein A-I Derived Peptides. 2014, P. Mendoza-Espinosa, **D. Montalvan-Sorrosa**, V. García-González, A. Moreno, R. Castillo & J. Mas-Oliva. Molecular and Cellular Biochemistry, DOI 10.1007/s11010-014-2050-2
- Filamentous virus decoration with gold nanoparticles: global fingerprints of bionanocomposites acquired with SERS. 2014. **D. Montalvan-Sorrosa**, J. L. González-Solis, J. Mas-Oliva and R. Castillo. RSC Advances, 4, 57329, DOI 10.1039/c4ra10656c
- Chemically modified viral hydrogels. **D. Montalvan-Sorrosa**, O. Herrera-Talancón, P. Toledo-Ibelles, J. Mas-Oliva and R. Castillo. **En preparación**