



Fundació
La Marató de TV3

XVII SIMPOSIUM

Lesions medul·lars i cerebrals adquirides



MATERIALS NANOESTRUCTURATS ELECTROACTIUS PER A ELÈCTRODES EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL, ESTIMULACIÓ I REPARACIÓ

Maria Nieves Casañ Pastor

Institut de Ciència de Materials de Barcelona

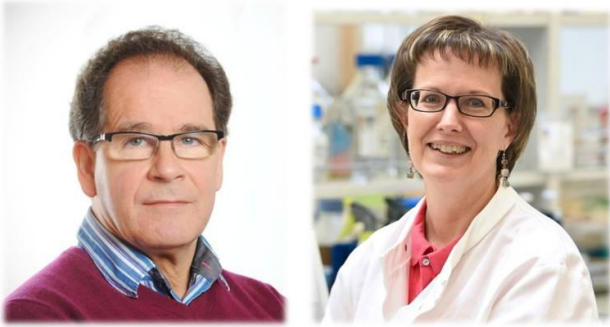
M. Cristina Suñol Esquirol

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Ann Marie Rajnicek

Institut of Medical Sciences Aberdeen, Regne Unit





1. Projecte

L'aplicació de camps elèctrics per a la reparació de lesions necessita nous materials adequats a aquesta finalitat. Fins a l'actualitat, l'electroestimulació del sistema nerviós és funcional i intenta mitigar símptomes, objectiu que s'aconsegueix amb polsos d'alta freqüència, per minimitzar el mal al teixit circumdant. Usualment els elèctrodes són de platí o aliatges corresponents, fet que causa la formació de radicals a la interfície elèctrode-teixit, derivats de la reducció de l'oxigen o de l'oxidació de l'aigua; això provoca perjudicis i l'encapsulació de l'elèctrode.

Aquest projecte ha intentat desenvolupar nous materials o recobriments que facilitin un nou mecanisme en el qual l'aplicació del camp no resulti en formació de radicals, sinó que el nou material, d'acord amb les seves propietats de valència mixta, assumeixi la transferència electró-ió de la interfície.

Així, el projecte s'ha focalitzat en:

- A) Desenvolupament de **nous materials** electroactius: materials nanoestructurats de valència mixta que funcionin com a "amortidors" en l'intercanvi a la interfície. Formació d'híbrids i possible *alliberament* durant el protocol d'acció.
- B) Desenvolupament d'**elèctrodes** basats en aquests materials híbrids, amb geometries adients per a l'aplicació del camp elèctric.
- C) **Nanoestructuració** d'elèctrodes com a sistemes híbrids, que puguin superar els problemes de materials individuals, tot augmentant l'estabilitat del material, la capacitat de càrrega i la seva ciclabilitat. Més enllà de la formació d'híbrids, la formació **multicapes o composites** pot reforçar el material i millorar-ne les propietats electroquímiques. Igualment, la formació de recobriments pot permetre utilitzar elèctrodes base ja comercials. Es veurà l'efecte dels nanotubs com a bastida d'IrOx, o bicapes de polímers conductors amb aminoàcids. Així mateix, la superfície pot ser modulada elèctricament i permetre la incorporació de factors de creixement, principis actius o adherir molècules significatives.

D) **Disseny de la forma geomètrica final** com a *arrays* de microelèctrodes, formes cilíndriques ajustades a la medul·la espinal.

E) Avaluació *in vitro* d'**elèctrodes** en absència i en presència de camps elèctrics aplicats.

2. Resultats

1) S'han obtingut nous materials híbrids electroactius d'òxids d'iridi i nanocarbons com: **IrOx-nanotubs de carboni, IrOx-òxid de grafit, IrOx-òxid de grafè o IrOx-grafè pristi**, com a capes fines transparents que faciliten l'estudi de cultius o com a recobriments gruixuts d'alta capacitat de càrrega. També polímers conductors, com **PEDOT o polipirrol amb aminoàcids** s'han obtingut en forma de bicapes d'alta biocompatibilitat i reproductibilitat.

Hem mostrat que IrOx s'adhereixen a grafè i a plaquetes òxid de grafè, així com a grafit o a nanotubs de carboni. Aquest fet indueix una autoacoblament en forma col·loïdal, mentre que facilita l'electrodeposició de carboni impulsat per IrOx. El procés funciona per a tots els materials de carboni assajats, com s'havia descrit anteriorment per nanotubs. Els polímers conductors també han estat inclosos en un trihíbrid. Les propietats electroquímiques resultants palesen un efecte significatiu del carboni en la capacitat d'emmagatzematge de càrrega (vegeu més endavant) que està disminuïda si el polímer conductor PEDOT també s'inclou en l'híbrid.

Els nanocarbons (CNT) indueixen una nanoestructura en el material final, tal com es mostra en el cas dels nanotubs de la figura 1, i dóna lloc a una fase més estable, que pot ser sotmesa a un nombre de cicles 100 vegades superior. En aquest exemple, els CNT actuen com els cables d'acer en formigó armat. Les propietats electroquímiques, com a resultat d'això, són molt més reversibles i impliquen capacitats de càrrega majors.

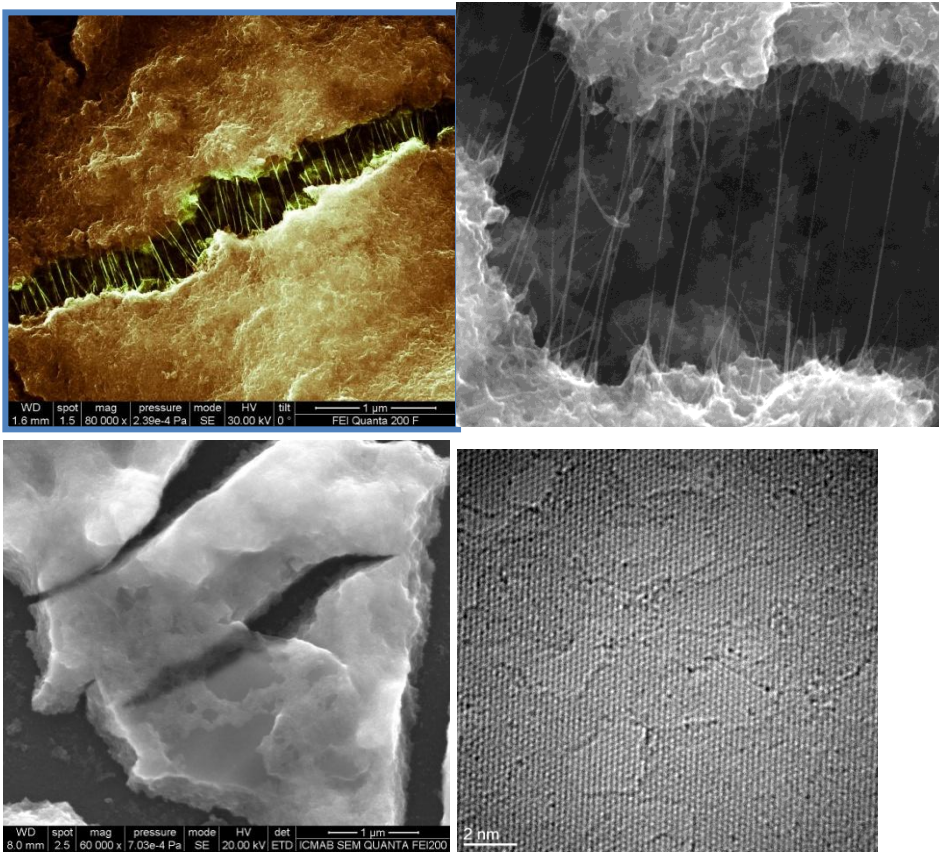


Figura 1. Imatges de SEM dels IrOx-nanotubs de carboni, dels IrOx-nanotubs de carboni-PEDOT que mostren la bastida dels híbrids nanoestructurats, i del material nanoestructurat en forma de milfulles d'òxid de grafè-IrOx, juntament amb el grafè exfoliat (HRTEM).

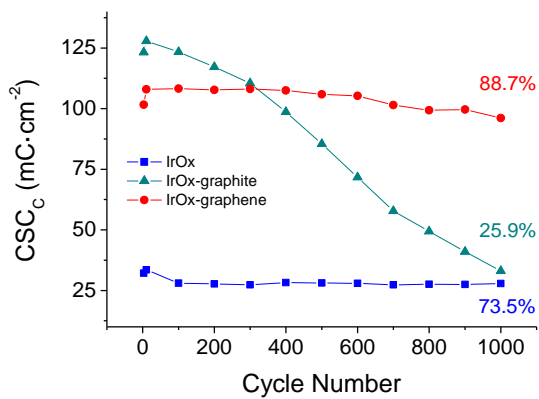
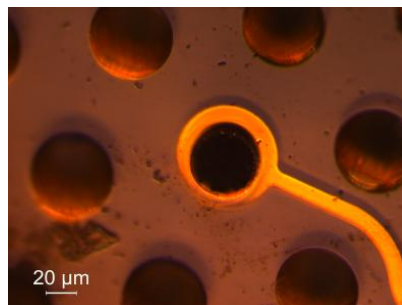


Figura 2. Capacitat d'emmagatzematge de càrrega (CSC), dels IrOx-grafit i IrOx-òxid de grafè respecte d'IrOx pur.

La figura 2 mostra com el grafè manté el 90% de la seva capacitat d'emmagatzematge de càrrega (CSC) després de 1.000 cicles, mentre que el grafit la perd bruscament al

voltant dels 200 cicles. D'altra banda, el grafè pristi obtingut per exfoliació electroquímica, segons que ha estat reportat pel nostre grup, també s'ha utilitzat per formar híbrids IrOx-grafè, amb resultats significativament diferents dels d'òxid de grafè. Una rugositat significativament més baixa produeix una millora similar en la capacitat de càrrega per al material. Aquest fet evidencia que el grafè pristi contribueix més a l'electroquímica del material que l'òxid de grafè. Totes les fases contenen la mateixa relació K/Ir, d'acord amb els espectres XPS identificats, com l'oxihidroxid d'iridi ja descrit prèviament, **KzIrOx(OH)y.nH2O**. Només la que conté òxid de grafè té oxigen addicional, mentre que l'obtinguda amb grafè pristi no té oxigen addicional, la qual cosa demostra que és grafè sense dopar.

2) Totes les fases s'han obtingut com a revestiments sobre elèctrodes plans de platí de diverses geometries i mides, i també sobre silicona mèdica platinitzada flexible i microelèctrodes. Totes les propietats electroquímiques són reproduïbles en tots els casos. Tots els processos impliquen procediments d'electrodeposició altament reproduïbles i confirmen els materials per recobrir qualsevol elèctrode disponible al mercat. El control del gruix global i de la CSC és possible en tots els materials híbrids. Els polímers són biocompatibles quan el contraió és un aminoàcid, i així s'ha depositat la bicapa.



3) També per a tots els casos, s'ha demostrat la biocompatibilitat amb el creixement de neurones, mitjançant la preparació de cultius primaris neuronals sobre els materials (taula 2) i es compara entre els materials. Quan el component de carboni és el grafè o l'òxid de grafè, els cultius cel·lulars mostren la mateixa compatibilitat òptima que s'indica anteriorment per als polímers conductors bicapes aminoàcid-IrOx, IrOx-CNT. Només en un cas (*nitrurating* grafè) el material ha resultat tòxic (no mostrat). I en el cas de PEDOT, sense tensioactiu PSS, es troba una molt escassa viabilitat.

Taula 2. Comparació dels materials en termes de viabilitat neuronal de les cèl·lules depositades a la part superior de materials nanoestructurats i cultivades *in vitro* fins a 5 dies.

	Material nanoestructurat	Viabilitat neuronal. % de neurones (cèl·lules amb marcatge per la proteïna tau) respecte del material control (borosilicat o IrOx)
Doped PEDOT monofilms	PEDOT-lysine 0,01 M	< 5%
	PEDOT-glutamine 0,01 M	< 5%
	PEDOT-glycine 0,1 M	< 5%
	PEDOT-glutamic acid 0,1 M	< 5%
	PEDOT-sodium glutamate 0,1 M	< 5%
	PEDOT-PSS	< 5%
Doped PPY monofilms	PPY-PSS	< 5%
	PPY-DBS	< 5%
Doped PEDOT/PPY bilayered films	PEDOT/PPY-glutamine 0,01 M	91 %
	PEDOT/PPY-glutamine 0,1 M	122 %
	PEDOT/PPY-lysine 0,01 M	97 %
	PEDOT/PPY-inosine	90 %
IrOx hybrids	IrOx-Carbon nanotubes (CNT)	90 %
	IrOx-PEDOT-CNT	< 5%
	IrOx-graphite oxide	112 %
	IrOx-graphene oxide	98 %
	IrOx-electrochemical graphene	94 %
Pt	Pt	< 5%

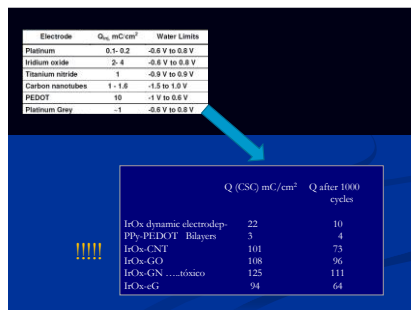
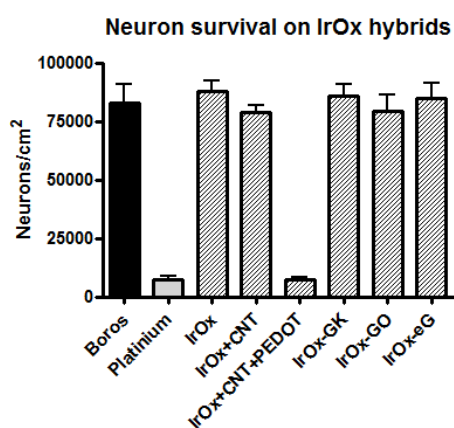


Figura 3. Quantificació del nombre de neurones en cultius cel·lulars depositats sobre híbrids de nanotubs de carboni-IrOx i el que inclou polímer, en comparació amb els materials de referència borosilicat, elèctrodes comercials de platí pur i IrOx.

La comparació entre els materials que es mostren i d'altres obtinguts a l'inici del projecte permet identificar els materials amb comportament òptim en termes de propietats electroquímiques i de biocompatibilitat neuronal, prèviament a l'aplicació del camp elèctric.

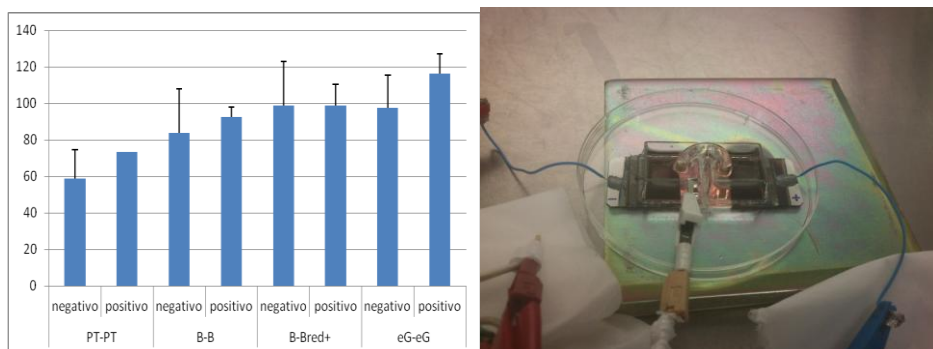


Figura 4. Valors de CSC obtinguts anteriorment a aquest projecte de La Marató i els valors resultants el 30 de juny de 2015 (projecte actual).

4) Un model *in vitro*, la lesió per *scratch* del cultiu de cèl·lules, ha estat elegit per avaluar elèctrodes i s'han definit protocols de camp elèctric (EF) per a l'aplicació de camp elèctric amb elèctrodes implantats. S'ha realitzat la comparació amb cap camp elèctric i amb elèctrodes de platí estàndard. La comparació entre les capacitats de càrrega, com es mostra a la part 1, permet obtenir una hipòtesi òptima per als híbrids

IrOx-nanocarboni altament compatibles. Tot i això, els experiments d'EF inclouen també bicapes de polímers per considerar els diversos tipus de materials, i es va dur a terme amb IrOx, IrOx-grafè i PEDOT-ppy-lisina, utilitzant el vidre i Pt com a materials de referència. S'han aplicat polsos controlats de corrent o de potencial, amb càrrega limitada, per evitar un comportament capacitiu, i/o la formació de gas amb els canvis de pH. La viabilitat cel·lular disminueix notablement quan se supera la CSC. També s'han desenvolupat models de cocultius astròcits-neurones com un model futur.

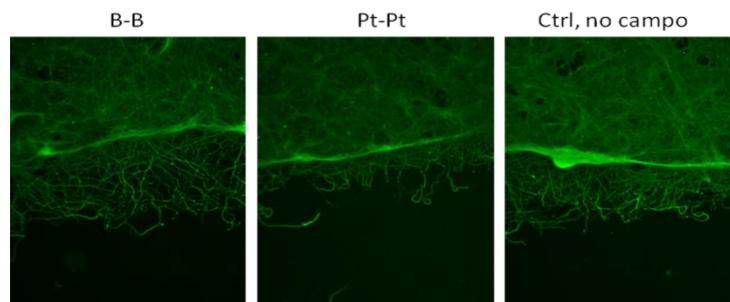


Figura 4. Percentatge de reompliment de la lesió de tipus scratch per a diversos materials i combinacions ànode i càtode

3. Implicacions i rellevància

S'han trobat nous materials per ser utilitzats amb seguretat en l'electroestimulació de baixa freqüència en lesions traumàtiques, com a recobriments o en forma massiva. Demostren la reparació *in vitro*. Se n'està planificant una segona fase *in vivo*.

4. Bibliografia derivada del projecte i presentacions

Elisabet Prats-Alfonso; Llibertat Abad; Nieves Casan-Pastor; Javier Gonzalo-Ruiz; Eva Baldrich.

Iridium Oxide sensor for biomedical applications. Case urea-urease in real urine Samples.

Biosensors and Bioelectronics, 39, 2013, 163-169 **SCI impact index: 5.437**

A.M. Cruz, N. Casañ-Pastor.

Graded conducting titanium-iridium oxide coatings for bioelectrodes in neural systems

Thin Solid Films, 534, **2013**, 316–324, **SCI impact index: 1.97**

J. Moral-Vico , N. M. Carretero, E. Perez, C. Suñol, M. Lichtenstein, N. Casañ-Pastor.

Dynamic electrodeposition of aminoacid-polypyrrole on aminoacid-PEDOT substrates: conducting polymer bilayers as electrodes in neural systems.

Electrochim. Acta 111 (**2013**), 250-260. **SCI Impact index: 3.90**

J. Moral-Vico,, S. Sánchez-Redondo, E. Perez, M. Lichtenstein, C. Suñol, N. Casañ-Pastor.

Nanocomposites of iridium oxide and conducting polymers as electroactive phases in biological media.

Acta Biomaterialia, 10 (2014) 2177–2186. **SCI impact index: 5.684**

Nina M. Carretero,† Mathieu P. Lichtenstein,‡ Estela Pérez,† Laura Cabana,† Cristina Suñol,‡,# Nieves Casañ-Pastor*†.

"IrOx-Carbon Nanotubes Hybrid:A Nanostructured Material for Electrodes with Increased Charge Capacity in Neural systems.

Acta Biomaterialia, 10, **2014**, 4548-4558 . **SCI impact index: 5.684**

N. M. Carretero†, M. P. Lichtenstein††, E. Pérez†, S. Sandoval†, G. Tobias†, C. Suñol††# , N. Casan-Pastor†*

Enhanced Charge Capacity in Iridium Oxide-Graphene Oxide Hybrids.

Electrochimica Acta , 157, **2015**, 369-377 **SCI impact index: 4.086**

E. Pérez, M. P. Lichtenstein, C. Suñol , N. Casan-Pastor*

Coatings of Nanostructured Pristine Graphene-IrOx Hybrids for Neural Electrodes: Layered Stacking and the role of non-oxygenated Graphene.

Materials Science & Engineering C, 55, **2015**, 218-226. **SCI impact index: 2.736**

PATENT DEMANADA

N. Casañ-Pastor, M. Lichtenstein, E. Pérez Soler, C. Suñol Esquirol.

PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ELECTRODOS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES NEURONALES MEDIANTE UN MODELO DE LESIÓN IN VITRO Y PROTOCOLOS DE ACCIÓN DE CAMPO ELÉCTRICO.

201531912, presentada 24 diciembre 2015

PUBLICACIONES EN PREPARACIÓ

Z. Zao, J. Moral, N. Casañ-Pastor, C. McCaig, A. Rajniecek

Neuron Growth and Survival on Conductive Materials during electric field exposure.

Biomaterials, per sen enviat el juliol 2016

N. Carretero*, M. Lichtenstein*, J. Moral, E. Perez, C. Suñol*, N. Casan-Pastor*.

Iridium oxide hybrids containing carbon nanotubes and conducting polymers: A sequence of evaluation of electrodes for the neural system, and in vitro astrocytes-neuron co-culture cell model.

M. Lichtenstein, E. Perez, C. Suñol*, N. Casan-Pastor*.

Electric field protocols in Scratch model, using electroactive electrode materials.

E. Perez, R. Villa, S. Falk, G. Gabriel, N. Casan-Pastor*.

Electrodeposition of iridium oxide hybrids in microelectrodes, electrochemical properties and sensitivity.

INVITACIONES

Ann Rajniecek: **invited talks** at the Gordon research Conference in Bioelectrochemistry.

N. Casañ-Pastor: **invited seminar** at Georgetown University, DC, USA (octubre 2012).

N. Casañ-Pastor: **invited seminar** at IBEC (Barcelona), abril 2013

COMUNICACIONES A CONGRESSOS

J. Moral-Vico, N.M. Carretero, E. Perez, C. Suñol, N. Casañ-Pastor .

Electroactive materials in Biological systems

Electrochemical Society, Hawaii, Octubre 2012. **Comunicació oral**

M.P. Lichtenstein, J. Moral-Vico, N.M. Carretero, N. Casañ-Pastor, C. Suñol.
Neural growth and functional development on new biocompatible hybrid materials.
Meeting of the Spanish Neuroscience Society. Oviedo. September 25-26, 2013. **Pòster**

N. Carretero, Mathieu Lichtenstein, Cristina Suñol, N. Casañ Pastor
Electrochemical Graphene and graphene Ir hybrids.
TNT Octubre 2014, Barcelona. Comunicació oral

N. Carretero, E. Perez, M. Alanyologlu, Mathieu Lichtenstein, Cristina Suñol, N. Casañ Pastor.
Electrochemical Graphene and graphene Ir hybrids.
Graphene Symposium, **Trobades Científiques de la Mediterrania Josep Miquel Vidal**,
Menorca, octubre, **2014. Comunicació oral**

M. Lichtenstein, E. Pérez, N. Carretero, N. Casañ-Pastor, C. Suñol
Glial and neural growth and functional development on new nanostructured iridium oxide hybrid materials.
5th Zing Conferences on Bionanomaterials. Algarve, abril 2015. **Pòster**

E.Perez^a, N. Carretero, M. Lichtenstein^b, C. Suñol^b, N. Casañ-Pastor^{a*}
Nanostructured materials for neural electrodes: Hybrids of iridium oxide with graphene, nanotubes or conducting polymers.
5th Zing Conference in Bionanomaterials. Algarve, abril 2015. **Comunicació oral**

E. Pérez, M. Lichtenstein, C. Suñol, N. Casañ-Pastor*
IrOx nanoparticles driving graphene electrodeposition: Nanostructured coatings for neural bioelectrodes.
5th Zing Conference in Bionanomaterials. Algarve, abril 2015. **Pòster**

Estela Pérez, Sophia Falk, Rosa Villa, Gemma Gabriel Nieves Casañ-Pastor
Macro and microelectrodes based on iridium oxide-graphene hybrid nanostructured coatings (<http://graphsense.icn2.cat/>)
ICREA Workshop on Graphene Biosensors. Barcelona, 25-26 de maig, 2015.
Comunicació oral

N. Carretero, E. Perez, M. Lichtenstein, C. Suñol, N. Casañ-Pastor*

<http://icmab.es/icmab-news/events/upcoming/262-june/1997-hintbcn-scientific-workshop-on-biomedical-health-and-bio-related-applications-of-hybrid-materials>

Nanostructuring hybrid materials to be used as neural electrodes: Electrodeposition of Hybrids of IrOx-CNT, IrOx-graphene and IrOx-conducting polymers.

HINTBCN: Scientific-workshop-on-biomedical-health-and-bio-related-applications-of-hybrid-materials. Barcelona, 8-9 de juny. **Comunicació oral**

E. Pérez, M. Lichtenstein, C. Suñol, N. Casañ-Pastor*

Synthesis and characterization of a new pristine graphene-IrOx hybrid for neural bioelectrodes

<http://icmab.es/icmab-news/events/upcoming/262-june/1997-hintbcn-scientific-workshop-on-biomedical-health-and-bio-related-applications-of-hybrid-materials>

HINTBCN: Scientific-workshop-on-biomedical-health-and-bio-related-applications-of-hybrid-materials. Barcelona, 8-9 de juny. **Pòster**

Resums acceptats

R. Fernández-Pacheco, R. Arenal, E. Pérez, F. Sandiumenge and N. Casañ-Pastor

STEM and HRTEM Analysis of IrOx-Graphene Nanoparticles: at the Root of Bioelectroactive Coatings for Neural Electrodes.

Microscopy at the Frontiers of Science 2015 (MFS2015), EMS sponsored event. 9-11 setembre 2015. Porto University. **Portugal**

E. Pérez, M. Lichtenstein, C. Suñol, N. Casañ-Pastor*

Pristine graphene versus Graphene Oxide in IrOx-Hybrids. Enhanced charge capacity in Coatings for Neural Electrodes.

Latest Advances on Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications (NANO BIOAPP2015). Barcelona, 8 setembre 2015.