



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DESARROLLO DEL  $\mu$ ChipVP6Au:  
HACIA EL RESTABLECIMIENTO DE LA FUNCIÓN CELULAR EN EL  
TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Francisca Villanueva Flores.

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Laura A. Palomares Aguilera. IBT

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leonor Pérez Martínez.

Dra. Hailin Zhao Hu.

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Ciudad de México. agosto, 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## **Dedicatoria**

A Dios, siempre a ti primero, que has sido la luz en mi oscuridad.

A Tito, Micky, Lucy, Vero, Colio y Mamá. Los amo familia, gracias por ser el incondicional pilar de amor y valores que me guían. Y a mi Pedro, mi compañero de vida, a quien amo, valoro, admiro y respeto tanto.

Y muy especialmente a Laura, que más que mi asesora fue una mentora para mí. Gracias por confiar más en mí que ni yo misma. Gracias no sólo por hacer de mí una mejor científica sino sobre todo una mejor persona. Estoy contigo eternamente agradecida. Este trabajo es tan tuyo como mío, porque sin tu apoyo, orientación y confianza nada de esto hubiera sido posible.

## Agradecimientos

*Por su asesoría y ejemplo de excelencia:*

Dra. Laura A. Palomares

Dra. Leonor Pérez

Dra. Hailin Hu

Dr. Ignacio López

M.V.Z. Elizabeth Mata

Dr. Enrique Reynaud

Dra. Elena Arriaga

*Por su entrañable amistad y comentarios siempre constructivos:*

Dr. Octavio T. Ramírez

M. en C. Martha Contreras

Dra. Ana Alcalá

Dra. Mabel Rodríguez

Grupo Palomares-Ramírez

Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada

Dr. Christopher Wood

M. en C. Andrés Saralegui

Dr. Arturo Pimentel

M. en C. Xochitl Alvarado

*Por su valioso apoyo técnico:*

Instituto de Biotecnología, UNAM.

M. en C. Martha A. Contreras

M. en C. Vanessa Hernández

M. en C. Ana Ruth Pastor

Ing. Alberto Porras

Dra. Guadalupe Zavala

Dra. Blanca I. García

Dra. Mariana Gutiérrez

Dr. Luis Covarrubias

Instituto de Energías Renovables, UNAM:

M. en C. Luis F. Payán

Dra. Patricia Altúzar

Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia, UNAM:

Dr. Mathieu Hautefeuille

Fis. Félix Cerón

Dr. Jehú López

Dr. Genaro Vázquez

Facultad de Química, UNAM:

M. en C. Mariana Ramírez Gilly

Laboratorio Central de Microscopía del

Instituto de Física, UNAM:

M. en C. Manuel Aguilar Franco

Laboratorio de Fuerza Atómica y Confocal del

Instituto de Química, UNAM:

M. en C. Melina Tapia

*Por su comprometida participación:*

M. D. Andrés Castro (Servicio social)

Biol. Marco Méndez (Verano de investigación)

Ing. Mireya Mariscal (Verano de investigación)

Ing. Norma Mendoza (Tesis de licenciatura)

Andrés Wences (Estancia de investigación)

*Por su enriquecedora colaboración:*

Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología,  
UNAM:

Dr. José Ocotlán Flores

Instituto de Energías Renovables, UNAM:

Dra. Margarita Miranda

Laboratorio Nacional de Soluciones

Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia,

UNAM:

Dr. Mathieu Hautefeuille

*Por su siempre útil apoyo administrativo:*

Lic. Karin Levy

Lic. Larisa Campos

Lic. Antonio Bolaños

Lic. Gloria Villa

*Por el financiamiento del presente trabajo:*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada y al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IT-200416.

# Índice

Dedicatoria .....	3
Agradecimientos .....	4
Índice.....	6
Índice de figuras .....	8
Lista de abreviaturas .....	11
<b>CAPÍTULO I. PRESENTACIÓN .....</b>	<b>14</b>
Resumen.....	14
Introducción.....	18
<b>CAPÍTULO II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>20</b>
Diseño de andamios para la ingeniería de tejido neural .....	20
Requerimientos básicos de los andamios para ingeniería de tejido cerebral .....	20
Diseño del $\mu$ ChipVP6-Au .....	33
<b>CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE ESTUDIO .....</b>	<b>39</b>
Hipótesis.....	39
Objetivo general .....	39
Objetivos particulares .....	39
<b>CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA .....</b>	<b>40</b>
Materiales y métodos .....	40
Bloque I. Síntesis y caracterización del acetato de poli(vinil alcohol co-vinilo) (PAcVA) .....	41
Bloque II. Producción de nntVP6-Au y estudio de biocompatibilidad.....	49
Bloque III. Construcción y caracterización del $\mu$ ChipVP6-Au .....	52
Bloque IV. Implantación intracraneal del $\mu$ ChipVP6-Au en un modelo murino de Parkinson.....	54
Análisis de resultados.....	58
<b>CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
Bloque I. Síntesis y caracterización del acetato de poli(vinil alcohol co-vinilo) (PAcVA) .....	60
Bloque II. Producción de nntVP6-Au y estudio de su biocompatibilidad.....	80
Bloque III. Construcción y caracterización del $\mu$ ChipVP6-Au .....	95
Bloque IV. Implantación intracraneal del $\mu$ ChipVP6-Au en un modelo murino de Parkinson.....	104
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>110</b>
Bloque I. Síntesis y caracterización del acetato de poli(vinil alcohol co-vinilo) (PAcVA) .....	110

Bloque II. Producción de nntVP6-Au y estudio de su biocompatibilidad.....	110
Bloque III. Construcción y caracterización del $\mu$ ChipVP6-Au .....	111
Bloque IV. Implantación intracraneal del $\mu$ ChipVP6-Au en un modelo murino de Parkinson.....	112
CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS.....	114
LISTA DE ANEXOS: Productos generados durante el doctorado.....	115
REFERENCIAS .....	116



## Índice de figuras

### CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

<i>Figura 1.</i> Parámetros y estrategias en el diseño de materiales para la ingeniería de tejido neuronal.....	21
<i>Figura 2.</i> Respuesta clásica a la implantación de un dispositivo tipo en el cerebro.....	23
<i>Figura 3.</i> Esquema simplificado de un hidrogel implantado que establece nuevas conexiones funcionales entre las células sembradas y las neuronas del huésped.....	24
<i>Figura 4.</i> Propiedades mecánicas del cerebro y diferentes materiales para la ingeniería de tejido neuronal.....	25
<i>Figura 5.</i> Esquema de cómo los tamaños de poros en los andamios regulan la unión celular, la interacción y la migración.....	26
<i>Figura 6.</i> Impacto de la topografía en el fenotipo de cultivos neuronales <i>in vitro</i> .....	28
<i>Figura 7.</i> Modelo de hidrogel con factores de crecimiento inmovilizados y ejemplo de aplicación para la restauración del tejido cerebral.....	30
<i>Figura 8.</i> Efectos de dos sustratos conductores sobre la fisiología neuronal.....	32
<i>Figura 9.</i> Esquema simplificado de la sinapsis química y eléctrica.....	34
<i>Figura 10.</i> Esquema de la formación y estructura de los nntVP6-Au.....	36

### CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA

<i>Figura 1.</i> Esquema de la propuesta experimental para la construcción del $\mu$ ChipVP6-Au.....	40
<i>Figura 2.</i> Diagrama de flujo de la estrategia experimental.....	41
<i>Figura 3.</i> Esquema experimental del montaje para análisis de conductividad por AFM.....	43
<i>Figura 4.</i> Esquema experimental del procedimiento para la caracterización mecánica del PAcVA por compresión uniaxial.....	44
<i>Figura 5.</i> Esquema experimental de la celda de tres pozos empleada para la caracterización electroquímica del PAcVA por CV.....	46
<i>Figura 6.</i> Diseño realizado para el grabado con láser en moldes de PMMA del $\mu$ ChipVP6-Au en serie y paralelo.....	53
<i>Figura 7.</i> Pruebas de comportamiento para evaluar la función sensoriomotora en un modelo murino de Parkinson.....	56

### CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<i>Figura 1.</i> Síntesis del PAcVA.....	60
--	----

<b>Figura 2.</b> Mecanismo de reacción para la síntesis de acetales como producto de reacción de un aldehído con un alcohol en medio ácido.....	61
<b>Figura 3.</b> Análisis por FTIR de PAcVA.....	63
<b>Figura 4.</b> Imágenes SEM y AFM de películas de PAcVA deshidratadas.....	64
<b>Figura 5.</b> Propiedades mecánicas del PAcVA hidratado de tres grados de entrecruzamiento.....	65
<b>Figura 6.</b> Contenido de agua e hinchamiento máximo de películas de PAcVA en presencia de agua desionizada con diferente contenido de GA.....	67
<b>Figura 7.</b> Dinámica de hinchamiento del PAcVA a diferentes grados de entrecruzamiento y diferente pH.....	67
<b>Figura 8.</b> Voltamogramas cíclicos del PAcVA parcial y completamente hidratado con diferentes grados de entrecruzamiento.....	69
<b>Figura 9.</b> Inmovilización de fluoresceína en películas de PAcVA.....	70
<b>Figura 10.</b> Liberación de fluoresceína del PAcVA como función del grado del entrecruzamiento.....	72
<b>Figura 11.</b> Absorción de glucosa, lactato, glutamina y glutamato en el PAcVA.....	77
<b>Figura 12.</b> Micrografías ópticas de campo claro de células mHypoE-N1 crecidas sobre diferentes sustratos.....	78
<b>Figura 13.</b> Crecimiento celular en películas de PAcVA (10% GA).....	80
<b>Figura 14.</b> Producción de la proteína recombinante VP6.....	82
<b>Figura 15.</b> Purificación de la proteína VP6 de sobrenadante.....	83
<b>Figura 16.</b> Purificación de la proteína VP6 de pellet.....	84
<b>Figura 17.</b> Resonancia del plasmón superficial en AuNPs dispersas y agregadas.....	85
<b>Figura 18.</b> Espectros de extinción UV-Vis de la cinética de funcionalización de nntVP6-Au con diferentes agentes reductores.....	86
<b>Figura 19.</b> Micrografías de SEM de muestras de nntVP6 y nntVP6-Au obtenidas por el ensamblaje típico <i>in vivo</i> , como por ensamblaje químico <i>in vitro</i> .....	87
<b>Figura 20.</b> Ensayos de MTS para medir la actividad metabólica como medida indirecta de la viabilidad celular ante diferentes concentraciones de los nanocomplejos indicados en la figura.....	89
<b>Figura 21.</b> Micrografías de TEM de muestras de nntVP6-Au funcionalizados con dos diferentes agentes reductores.....	90
<b>Figura 22.</b> Células mHypoE-N1 expuestas a $31.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ de nntVP6 y nnVP6-Au o ausencia de nanopartículas como control.....	92

<b>Figura 23.</b> Células A-549 expuestas a $31.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ de nntVP6 y nnVP6-Au o ausencia de nanopartículas como control.....	93
<b>Figura 24.</b> Ensayos de inmunofluorescencia de las células A-549 y mHypoE-N1.....	95
<b>Figura 25.</b> Mapa topográfico y de conductividad del composito PAcVA+nntVP6-Au.....	97
<b>Figura 26.</b> Micrográficas de fluorescencia de microimpresiones de gelatina marcada con fluoresceína sobre películas de PAcVA con diferentes fuerzas aplicadas.....	98
<b>Figura 27.</b> Análisis de la resistividad de la microimpresión de nntVP6-Au en películas de PAcVA.....	100
<b>Figura 28.</b> Circuitos electrónicos de nntVP6-Au impresos sobre películas de PAcVA para formar el $\mu\text{ChipVP6-Au}$ .....	101
<b>Figura 29.</b> Crecimiento celular sobre el $\mu\text{ChipVP6}$ y $\mu\text{ChipVP6-Au}$ .....	103
<b>Figura 30.</b> Imágenes de SEM y análisis elemental por XAS de células crecidas sobre el $\mu\text{ChipVP6-Au}$ .....	104
<b>Figura 31.</b> Implantación del PAcVA y el $\mu\text{ChipVP6-Au}$ en corteza cerebral de ratón y tinción de hematoxilina-eosina de los cortes histológicos asociados.....	107
<b>Figura 32.</b> Pruebas de comportamiento de ratones Parkinsonianos (MPTP) tratados con $120 \text{ mg kg}^{-1}$ de L-DOPA administrada vía intraperitoneal (L-DOPA <sub>i</sub> ) o intracraneal (L-DOPA) a través del implante PAcVA o el $\mu\text{ChipVP6-Au}$ .....	109

## Lista de abreviaturas

aFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos ácido  
AFM: Microscopía de fuerza atómica  
ANOVA: Análisis de varianza  
AuNPS: Nanopartículas de oro  
bacVP6: Baculovirus que expresa la proteína VP6  
B.C: Condiciones de frontera  
bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico  
BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro  
BSA: Albúmina de suero bovino  
Ca<sub>i</sub><sup>2+</sup>: Calcio intracelular  
CHO: Ovario de hámster chino  
CNT: Nanotubos de carbono  
CNTF: Factor neurotrófico ciliar  
COMT: Catecol-o-metil transferasa  
CV: Voltametría cíclica  
DBSA: Dodecilbensensulfonato  
DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco  
DMSO: Dimetil sulfóxido  
DP: Diámetro del pilar  
Ds: Grados de hinchamiento  
EP: Enfermedad de Parkinson  
FA: Formaldehído  
FDA: Administración de alimentos y fármacos  
FGF-2: Factor de crecimiento de fibroblastos 2  
FTIR: Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier  
GA: Glutaraldehído  
GFAP: Proteína acídica glial fibrilar  
GlcC<sub>5</sub>SH: 5-mercaptopentil β-D-glucopiranosido  
GDNF: Factor neurotrófico derivado de células gliares  
HA: Ácido hialurónico

hNSC: Células troncales neuronales humanas

I. C: Condición inicial

IMDM: Medio de Iscove modificado de Dulbecco

LDH: Lactato deshidrogenasa

LIF: Factor de inhibición de leucemia

MAO: Monoaminooxidasa

MDI: Multiplicidad de infección

MEA: Arreglo multielectrónico

MPS: 3-mercapto-1-propansulfonato de sodio

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

MTS: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

MWCNT: Nanotubos de carbono de pared múltiple

NGF: Factor de crecimiento neuronal

nntVP6: Nanotubos de la proteína VP6

nnVP6-Au: Nanotubos de la proteína VP6 funcionalizados con oro

NT-3:Neurotrofina 3

PAAm: Poliacrilamida

PAcVA: Acetato de poli(vinil alcohol co-vinilo)

PANi: Polianilina

PBS: Amortiguador de fosfatos

PDMS: Poli(dimetil siloxano)

PEDOT: Poli-3,4-etilendioxitiofeno

PEG: Poli(etilen glicol)

PHEMA: Poli(2-hidroxietil metacrilato)

PLC: Poli- $\epsilon$ -caprolactona

PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicolítico)

PLLA: Ácido poli-L-láctico

PMMA: Poli(metil metacrilato)

Pn: Pico número "n"

Ppy: Polipirrol

PS: Poliestireno

PVA: Alcohol polivinílico

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SCF: Factor de células madre

SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SP: Separación del pilar

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

XAS: Espectroscopía de dispersión por rayos X

# CAPÍTULO I. PRESENTACIÓN

## Resumen

Los materiales para la ingeniería de tejido neuronal deben ser biocompatibles, inocuos, biodegradables, con propiedades mecánicas compatibles con el tejido diana, permitir la proliferación celular, e idealmente, liberar sustancias de manera controlada y ser conductores eléctricos para favorecer la comunicación eléctrica neuronal. En el presente trabajo se realizó la construcción *de novo* de un microchip ( $\mu$ ChipVP6-Au) implantable en corteza cerebral de ratón conformado por tres componentes principales: 1) *Base polimérica*: película del hidrogel biocompatible de acetato de poli(vinil alcohol co-vinilo) (PAcVA) que libera fármacos de manera controlada. 2) *Recubrimiento conductor*: circuitos de nanotubos de la proteína VP6 de rotavirus funcionalizados con nanopartículas de oro (nntVP6-Au). 3) *Cultivo celular modelo*: células de mamífero de carcinoma de pulmón humano A-549 y células de hipotálamo de embrión de ratón mHypoE-N1 crecidas en la superficie del  $\mu$ ChipVP6-Au. Los componentes individuales y en conjunto del  $\mu$ ChipVP6-Au se caracterizaron detalladamente.

1) *Base polimérica*: Se sintetizaron 48 hidrogeles entre los que se realizó un escrutinio seleccionando, por sus propiedades mecánicas, los productos de polimerización del alcohol polivinílico (PVA) entrecruzado con aldehídos tales como el formaldehído (FA) y el glutaraldehído (GA) para obtener el poli(vinil formal) (PFA) y el PAcVA, respectivamente. Ambos polímeros se sintetizaron y caracterizaron a distintos grados de entrecruzamiento. Pese a que el PFA resultó en un material no apto para el cultivo celular, mostró una alta retención de metales pesados por lo que con él se fabricaron membranas para la purificación de aguas contaminadas provenientes del río Atoyac. Este trabajo derivó en un artículo científico y una solicitud de patente como trabajos colaterales de la principal investigación. Por su lado, el PAcVA resultó en un hidrogel biocompatible cuya obtención se llevó a cabo por primera vez a 37 °C, en ausencia de catalizador ácido y utilizando agua como solvente. Estas condiciones suaves de reacción permitieron la inmovilización de sustancias lábiles como heparina, gentamicina y fluoresceína. El grado de entrecruzamiento se moduló variando el contenido de GA y se estudió mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Se demostró por primera vez que el PAcVA es un polímero pH-responsivo que exhibe un hinchamiento máximo a pH 5.8 y cuya dinámica de hinchamiento depende del grado de entrecruzamiento. Asimismo, que es posible modular las propiedades mecánicas, difusivas y estructurales del PAcVA, variando el contenido de GA. A mayor contenido de GA, PAcVA mostró

una menor fuerza de fractura, esfuerzo de cedencia, elasticidad y módulo de Young. PAcVA a 10% GA, exhibió un módulo de Young comparable con el de los tejidos blandos, convirtiéndolo en un material candidato para la ingeniería de tejidos. Imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) arrojaron que PAcVA a 10% GA exhibe microporos de 0.8 - 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, lo que podría favorecer la comunicación intercelular. El contenido de GA también impactó en la estructura microscópica del material, observándose por microscopía electrónica de barrido (SEM) una red más abierta a menor grado de entrecruzamiento. Mediante voltametría cíclica (CV) se determinó que el PAcVA es un material electro-responsivo, cuya difusión iónica es proporcional a su hidratación e inversamente proporcional al grado de entrecruzamiento. Para estudiar el potencial del PAcVA para la administración de fármacos, se caracterizó la liberación de fluoresceína como molécula modelo. Se encontró que la velocidad de liberación y difusividad efectiva fue proporcional a la temperatura e inversamente proporcional al contenido de GA. Los datos de la cinética de liberación se ajustaron al modelo de Korsmeyer-Peppas, con lo que se demostró que la difusión a 5% y 10% de GA fue Fickiana, mientras que a 20% de GA fue anormal. Finalmente se estudió la funcionabilidad del PAcVA como andamio para el cultivo de células de mamífero utilizando como modelo células A-549 y mHypoE-N1. Para promover la unión celular y neutralizar los grupos aldehídos libres, el PAcVA se recubrió con poli-L-lisina y laminina, lo que permitió el crecimiento y proliferación de las células sin signos de citotoxicidad o estrés oxidante. En conjunto estas propiedades hacen al PAcVA un nuevo material apto para el cultivo celular y con aplicaciones potenciales en ingeniería de tejidos.

2) *Recubrimiento conductor*: La segunda capa del dispositivo consistió en un recubrimiento de la superficie de PAcVA formado por circuitos en serie y paralelo de nntVP6-Au obtenidos a partir de la proteína VP6 de rotavirus, funcionalizada con nanopartículas de oro (AuNPs). La reacción de funcionalización se optimizó para reducir la agregación y evitar el uso de agentes dispersantes, lo que abarató los costos de producción. De manera colateral, se aportó información relevante respecto a la capacidad de funcionalización de los nntVP6 ensamblados por un nuevo método de ensamblaje químico *in vitro* que derivó en un trabajo de colaboración adicional. Se demostró que los nntVP6-Au son inocuos hacia las células mHypoE-N1 y A-549 a una concentración de 31.5  $\mu\text{g cm}^{-2}$  y además no alteran la morfología y esparcimiento de las células en comparación con el control en ausencia de nanocomplejos. A diferencia de los nanotubos de carbono (CNT), los nntVP6 y nntVP6-Au no inducen estrés oxidante o liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). No se observaron diferencias entre la proliferación celular sobre placas de cultivo comerciales o sobre nntVP6 o nntVP6-Au, así como en el consumo de glucosa y glutamina o producción de lactato y glutamato. Por tanto, el presente trabajo propone el uso de los nntVP6-Au como alternativa a los CNT para la construcción de andamios para el cultivo celular, y dada su conductividad eléctrica, como materiales potenciales



para la estimulación eléctrica celular. Una vez demostrada la inocuidad de los nntVP6-Au, se depositó  $1 \text{ mg cm}^{-2}$  de nntVP6-Au sobre películas de PAcVA y se estudiaron las propiedades conjuntas del composito. Mediante microscopía de fuerza (AFM) se observó que la adición de nntVP6-Au genera relieves sobre el polímero de aproximadamente  $4 \text{ }\mu\text{m}$ . Se registró una conductividad de  $-60 \text{ pA}$  y  $-140 \text{ pA}$ , en aquellas regiones donde existe una acumulación o ausencia de nntVP6-Au, respectivamente. La heterogeneidad en el depósito de nntVP6-Au sobre PAcVA generó cortos circuitos en el dispositivo, lo que resulta desfavorable para un material destinado a la estimulación eléctrica neuronal. Para contender con esta limitante, se imprimieron por microcontacto canales de longitud y área transversal variable de nntVP6-Au sobre películas de PAcVA. Mediante la Ley de Pouillet se determinó que la resistividad de PAcVA hidratado en PBS fue de  $998 \text{ m}^{-1}$ , mientras que al recubrirse con nntVP6-Au la resistividad disminuyó hasta  $5.89 \text{ m}^{-1}$  (170 veces). Posteriormente, se imprimieron patrones en serie y paralelo de nntVP6-Au para formar dos tipos de  $\mu\text{ChipVP6-Au}$ , los cuales presentaron un comportamiento capacitivo. Por otra parte, la impedancia a  $20 \text{ Hz}$  de PAcVA hidratado en PBS fue de  $1.3 \pm 0.6 \times 10^6 \text{ }\Omega$ , mientras que los  $\mu\text{ChipVP6-Au}$  en serie y paralelo mostraron valores de  $4.0 \pm 1.0 \times 10^5 \text{ }\Omega$  y  $2.0 \pm 1.0 \times 10^5 \text{ }\Omega$ , respectivamente. Con nuestras condiciones de microimpresión lo logró una continuidad de corriente por más de  $8 \text{ cm}$  de longitud superando más de 40 mil veces la longitud de los nntVP6-Au ( $1 - 3 \text{ }\mu\text{m}$ ), siendo posible con ello la impresión de biocables conductores sobre películas de PAcVA. Gracias a la realización de este trabajo, se cuenta con dos tipos de  $\mu\text{ChipVP6-Au}$  electrónicos biorganometálicos con comportamientos eléctricos distinguibles entre sí, con respuestas eléctricas de alta reproducibilidad y fabricados con una tecnología de bajo costo.

3) *Cultivo celular modelo*: Se estudió la biocompatibilidad del  $\mu\text{ChipVP6-Au}$  analizando la proliferación celular, liberación de LDH y estrés oxidante de células mHypoE-N1 y A-549 crecidas sobre éste y se comparó con el crecimiento en placas comerciales tratadas con poli-L-lisina y laminina. A las 108 h de cultivo, las células mHypoE-N1 proliferaron de manera comparable al control, mientras que las células A-549 proliferaron incluso más. No se encontró diferencia significativa en la liberación de LDH en cultivos celulares crecidos en el  $\mu\text{ChipVP6-Au}$ , ni aumento en el nivel intracelular de ROS en las células mHypoE-N1. Sin embargo, las células A-549 mostraron un mayor estrés oxidante al crearse sobre el  $\mu\text{ChipVP6-Au}$ . El crecimiento celular sobre el  $\mu\text{ChipVP6-Au}$  se visualizó a los 8 días mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Mediante un análisis elemental por espectroscopía de absorción de rayos X (XAS) se corroboró que los elementos mayoritarios en la muestra eran oro y carbono. En conjunto, el  $\mu\text{ChipVP6-Au}$  posee propiedades únicas para la simultánea administración de fármacos, andamio para terapia celular y, dada su respuesta eléctrica de alta reproducibilidad, podría potencialmente usarse para la estimulación

eléctrica neuronal. Estas propiedades conjuntas lo convierten en un material, en nuestro conocimiento, único en su clase sin un equivalente en la literatura.

Finalmente, como prueba de concepto se evaluó la biocompatibilidad *in vivo* del  $\mu$ ChipVP6-Au, así como su potencial como implante cerebral en un modelo murino. El  $\mu$ ChipVP6-Au se implantó en la corteza cerebral de 10 ratones sanos, con una sobrevivencia del 100% y sin efectos secundarios observables tras dos meses de implantación. Al quinto día post-implantación, se realizaron cortes histológicos seguidos por una tinción de hematoxilina-eosina, donde no se observó apoptosis, necrosis o inflamación patológica asociada a la presencia intracraneal de PAcVA o el  $\mu$ ChipVP6-Au. Posteriormente, se evaluó la liberación controlada de L-DOPA en un modelo murino de Parkinson lográndose el restablecimiento de la coordinación motora gruesa, coordinación motora fina y actividad espontánea a niveles comparables con el control sano tras una semana post-implantación del  $\mu$ ChipVP6-Au. Con el presente trabajo se espera contribuir al estado del arte del diseño de materiales para la ingeniería de tejido neuronal mediante este dispositivo de nueva generación como una alternativa novedosa para el tratamiento de trastornos neurológicos que conjunte terapias de remplazo celular, administración controlada y localizada de fármacos y estimulación eléctrica neuronal.

Las contribuciones al acervo científico del presente trabajo se han plasmado en un artículo científico publicado, un artículo de revisión sometido, tres artículos científicos adicionales en preparación (dos escritos y uno en proceso) y dos solicitudes de patente (una escrita y otra en proceso). Además, este trabajo permitió la representación de nuestro grupo en tres congresos internacionales. Asimismo, este trabajo sirvió de directriz para la realización de diferentes estancias de investigación de cinco estudiantes de educación superior, cuyos resultados se reportaron en una tesis de licenciatura, dos reportes de estancias de verano de investigación, un reporte de estancia de práctica profesional y un reporte de servicio social que, en conjunto, enriquecieron y aportaron multidisciplinariedad a la presente investigación.

## Introducción

Los trastornos neurológicos ocupan el primer lugar entre las enfermedades más incapacitantes y, con el envejecimiento poblacional, se pronostica incrementen su incidencia en los próximos años [1, 2]. Uno de los principales paradigmas en el tratamiento de las enfermedades neurológicas es la baja tasa de reparación del sistema nervioso central. Los tratamientos actuales están limitados a mitigar los síntomas pero no revertir la enfermedad [3]. Los tratamientos convencionales se basan, por un lado, en cirugías costosas, altamente invasivas y no siempre efectivas [4]. Por otro lado, la administración de fármacos está limitada por las características fisicoquímicas de las droga que pueden impedirles atravesar la barrera hematoencefálica [5].

Para contender con estas limitantes, la ingeniería de tejidos se ha propuesto como una alternativa capaz de integrar elementos biológicos con materiales inanimados, que se espera puedan eventualmente reemplazar o reparar los tejidos dañados [6-10]. El principal reto es el diseño de materiales biocompatibles que permitan la sobrevivencia, proliferación y migración neuronal, favorezcan la comunicación electroquímica interneuronal, sean mecánicamente similares al tejido diana, e idealmente, liberen sustancias de manera controlada [11-12].

Los materiales más estudiados para estos fines han sido los hidrogeles, los cuales dado su alto contenido de agua mimetizan los tejidos blandos. Por ejemplo, el ácido hialurónico (HA) incrementa la tasa de sobrevivencia de neuronas dopaminérgicas y células madre trasplantadas en ensayos preclínicos, por lo que se ha propuesto como un promisorio material para el tratamiento de Parkinson y otras terapias de remplazo celular [13-16]. Actualmente, un gran número de hidrogeles naturales y sintéticos se encuentran en estudios preclínicos, para la regeneración de los nervios periféricos. Entre ellos, a la fecha sólo el colágeno se ha probado con éxito en ensayos clínicos [17-20]. Algunos de estos hidrogeles tienen además la capacidad de liberar factores de crecimiento contenidos en su matriz lo cual potencia su aplicabilidad [13, 21].

Una limitante del uso de hidrogeles son sus pobres propiedades mecánicas, baja rugosidad, y generalmente alta impedancia. Esto es relevante en el caso del cultivo de neuronas, que son muy sensibles a la topografía y a las características fisicoquímicas del sustrato. En particular los hidrogeles naturales han mostrado ser altamente inmunogénicos [22-23]. Recientemente se ha propuesto el uso de nanotubos de carbono (CNT) y grafeno para mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles y además se han estudiado como andamios para el crecimiento y excitación neuronal [24-25]. Sin

embargo, los derivados de carbono poseen una alta toxicidad al inducir inflamación, fibrosis, cáncer de pulmón, malformaciones fetales, estrés oxidante, daño al DNA, entre otros [26-27].

En este trabajo proponemos la construcción de un prototipo de implante neuronal basado en un compuesto de un hidrogel sintético que libere sustancias de manera controlada recubierto de nntVP6-Au para proveerle de conductividad. Los principales retos tecnológicos del proyecto son los siguientes: 1) La síntesis y caracterización de un material polimérico que cumpla con las propiedades físicoquímicas para considerarse un nuevo candidato para la ingeniería de tejido neuronal. 2) Explorar la toxicidad de los nntVP6-Au y la posibilidad de emplearlos como andamio para el crecimiento celular. 3) Conjuntar ambos materiales en una configuración tal que permita el crecimiento, proliferación, liberación controlada de fármacos y una respuesta eléctrica reproducible que permita la excitación neural similar a un arreglo de multielectrodos (MEA). 4) Una prueba de concepto que demuestre la funcionabilidad *in vivo* del dispositivo.

Con el presente trabajo se espera contribuir al estado del arte del diseño de andamios conductores para la ingeniería de tejido neural y proponer una alternativa para el tratamiento integral de trastornos neurológicos que conjunte terapias de replazo celular, administración *in situ* de fármacos y estimulación eléctrica neuronal.

## **CAPÍTULO II. ANTECEDENTES**

### **Diseño de andamios para la ingeniería de tejido neural**

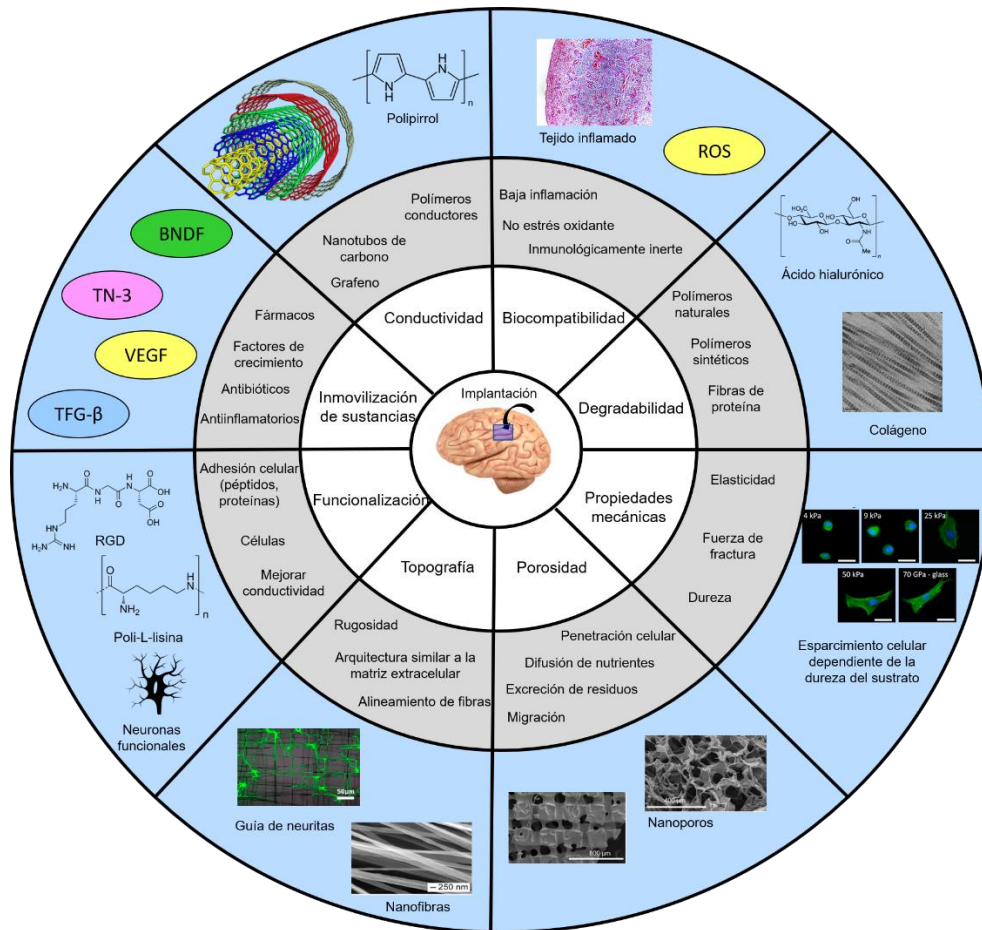
En comparación con otros órganos, el cerebro es un sistema muy complejo donde la restauración tisular es uno de los mayores retos para la ingeniería de tejidos contemporánea. La dificultad estriba por un lado, en que la regeneración neuronal en el cerebro humano adulto es insuficiente para recuperar la población neuronal dañada, y por otro, la falta de los factores neurotrópicos apropiados y las señales guía que dificultan el establecimiento de nuevas conexiones neurales [28]. Una alternativa para la restauración tisular es el diseño de andamios (típicamente hidrogeles, péptidos autoensamblados y nanofibras de proteína) que proporcionen el entorno adecuado para el crecimiento de células de mamífero, y el eventual reemplazo o reparación del tejido dañado [3]. Los andamios pueden tener diversas configuraciones y elementos que en conjunto actúen como una plantilla donde las células puedan proliferar; o bien, servir como estimuladores (químicos o físicos) celulares [29].

En el diseño de los andamios destinados a la ingeniería de tejido neuronal se deben considerar no sólo las propiedades fisicoquímicas del material, sino además su interacción con las células pues el fenotipo celular está fuertemente influenciado por el nano y microambiente [30-34]. Además, los materiales deben poseer una alta reproducibilidad en su fabricación de manera que se permita extraer información biológica confiable.

A continuación, se describirán aquellos requerimientos que consideramos deberían cumplir los andamios destinados a la ingeniería de tejidos, con énfasis en el tejido cerebral.

### **Requerimientos básicos de los andamios para ingeniería de tejido cerebral**

Los andamios para la ingeniería de tejido se han fabricado con una amplia variedad de materiales y técnicas dependiendo de los fines específicos para los que se hayan destinado. Sin embargo, como rasgos comunes destaca que es necesario que los materiales sean biocompatibles *in vitro* e *in vivo*, biodegradables, tengan las propiedades mecánicas y topográficas adecuadas; permitan la funcionalización y/o inmovilización de sustancias coadyuvantes; y que posean conductividad eléctrica. En la Fig. 1 se resumen los principales parámetros a considerar en el diseño de materiales para la ingeniería de tejido cerebral y las estrategias que se han abordado.



**Figura 1.** *Parámetros y estrategias en el diseño de materiales para la ingeniería de tejido neuronal.* En el círculo blanco se señalan los principales parámetros a considerar en su diseño. En el círculo gris, las principales estrategias experimentales seguidas, y en el círculo azul, algunos ejemplos de aplicación.

A continuación, se describirán los parámetros que consideramos necesarios deben tener los materiales destinados a la ingeniería de tejido neuronal.

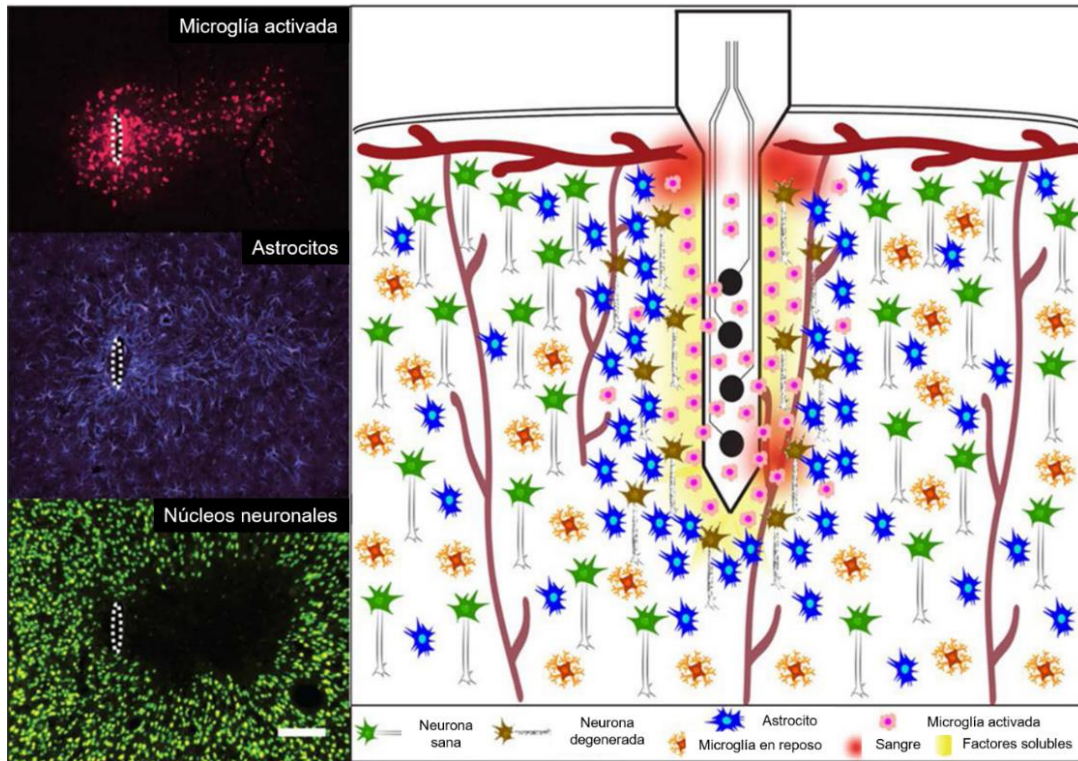
### *Biocompatibilidad*

La característica más importante que debe tener cualquier andamio para la ingeniería de tejidos es que tanto éste, como sus productos de degradación sean inocuos *in vitro* e *in vivo*. A nivel celular, el andamio debe permitir que las células puedan adherirse, migrar y proliferar en él a fin de poder establecer una nueva matriz. A nivel tisular, el material debe ser inmunológicamente inerte o

bien, provoque una reacción inmune mínima que no ocasione el rechazo del cuerpo o que el tejido funcional se transforme en tejido fibrótico no funcional [35].

El diseño de materiales para la ingeniería de tejido neuronal debe considerar las características propias del sistema nervioso central. A diferencia del resto del organismo, el cerebro está protegido por la barrera hematoencefálica selectivamente permeable que lo protege de sustancias tóxicas del torrente sanguíneo. Asimismo, carece de vasos linfáticos y de las células presentadoras de antígeno. En el cerebro, el reconocimiento de cuerpos extraños sucede con la activación de la microglía. La microglía activada tiene dos estados: M1 (proinflamatorio) que infiltra los leucocitos periféricos en el tejido para combatir y eliminar la infección o lesión; y el estado M2 (antiinflamatorio), donde se secretan citoquinas antiinflamatorias que facilitan la fagocitosis de los restos celulares y se promueve la reconstrucción de la matriz extracelular y la reparación tisular [36].

Recientemente se ha estudiado la respuesta inmune cerebral ante la implantación de dispositivos intracraneales. Tras la implantación, se activa inmediatamente la microglía (aproximadamente a 130  $\mu\text{m}$  del dispositivo), extendiendo sus procesos hacia la superficie del implante. Luego de 24 h post-implantación, el dispositivo queda rodeado por cuerpos microgliales activados, que forman una vaina celular delgada que encapsula el dispositivo, lo que puede limitar el intercambio iónico y desfavorecer la comunicación neuronal. Durante la primera semana, los astrocitos se activan al máximo y dos o tres semanas después forman una vaina compacta alrededor de la microglía. Las células gliales forman uniones estrechas entre sí que forman una barrera de difusión, lo que limita el intercambio de iones y neurotransmisores, dando lugar a la muerte neuronal y la degeneración de las neuritas en un radio de 150  $\mu\text{m}$  alrededor del dispositivo a las 4 semanas post-implantación [37-39]. En la Fig. 2 se muestra una respuesta típica a la implantación de dispositivos en el cerebro y el mecanismo de formación de la cicatriz glial.

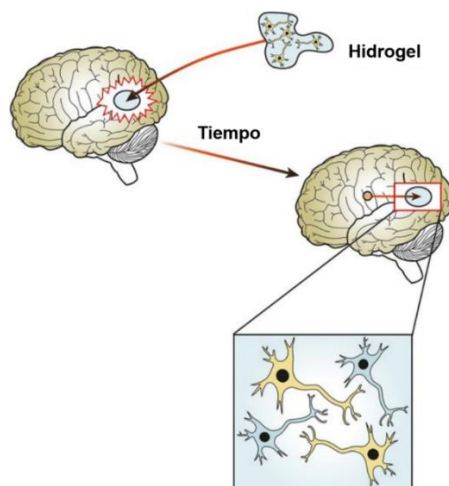


**Figura 2.** Respuesta clásica a la implantación de un dispositivo tipo en el cerebro. Tras la implantación, la microglía activada se adhiere a la superficie del dispositivo y libera localmente factores proinflamatorios. Posteriormente los astrocitos se encapsulan a lo largo de todo el eje del dispositivo, formando la cicatriz glial. Se ha demostrado que estos eventos, así como la hemorragia localizada, se correlacionan con la neurodegeneración en la interfaz. Las imágenes representativas de inmunohistoquímica de los tipos de células dominantes se muestran a la izquierda. Barra de escala = 100  $\mu$ m. Modificado de [40].

### *Biodegradabilidad*

Típicamente los andamios están pensados como implantes temporales, de modo que con el tiempo las propias células del cuerpo reemplacen eventualmente el implante al biodegradarse [12]. Los materiales biodegradables más estudiados son los hidrogeles naturales de los que se hablará en detalle más adelante [20]. El concepto general consiste en la implantación de un hidrogel biodegradable que sirva como plataforma para el cultivo de células exógenas que, al degradarse sirva como plantilla de crecimiento para las células exógenas y del huésped (Fig. 3).





**Figura 3.** Esquema simplificado de un hidrogel implantado que establece nuevas conexiones funcionales entre las células sembradas y las neuronas del huésped. Al degradarse el hidrogel permanece una zona de tejido neuronal reparado, sirviendo como plantilla para el crecimiento y regeneración celular. Modificado de [20].

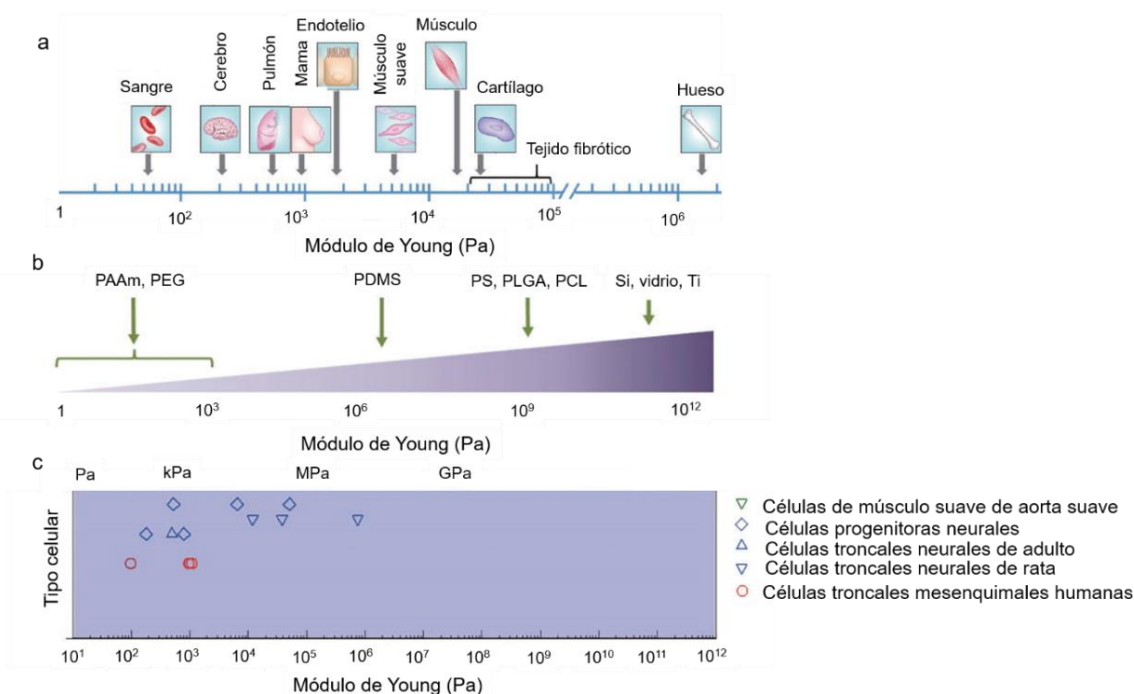
### *Propiedades mecánicas*

Las propiedades mecánicas “adecuadas” que han de seleccionarse en un material destinado a la ingeniería de tejidos dependen del sitio diana de aplicación y éstas deben ser consistentes tanto a nivel celular como tisular. A nivel celular, las células adherentes aplican fuerzas contráctiles al material sobre el que se adhieren y son capaces de percibir la resistencia del material a la deformación. Las propiedades mecánicas del material influyen el fenotipo celular en su morfología, esparcimiento, proliferación, regulación genética, crecimiento axonal y diferenciación celular. A nivel tisular, las propiedades mecánicas de los andamios deben ser similares con el sitio anatómico de implantación para minimizar la fricción, pero al mismo tiempo ser lo suficientemente resistente para permitir su manipulación quirúrgica [41-44].

El cerebro es el órgano más blando del organismo lo que supone un reto adicional en el diseño de implantes. En la Fig. 4. se compara la rigidez del cerebro con respecto a otros tejidos y sustratos para el crecimiento neuronal. El cerebro posee una rigidez de apenas 0.1 - 0.3 kPa, por debajo de tejido pulmonar, mamario, endotelial y músculo suave (Fig. 4a). [45]. Hidrogeles como la poliacrilamida (PAAm), poli (etilen glicol) (PEG), poli(dimetilsiloxano) (PDMS), poliestireno (PS), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), poli  $\epsilon$ -caprolactona (PLC), que asemejan las propiedades mecánicas de los tejidos blandos (Fig 4b), se han empleado como andamios para el cultivo de células

neurales, células troncales neurales de adulto, células troncales neurales de rata, células troncales mesenquimales humanas, entre otras (Fig. 4c) [46].

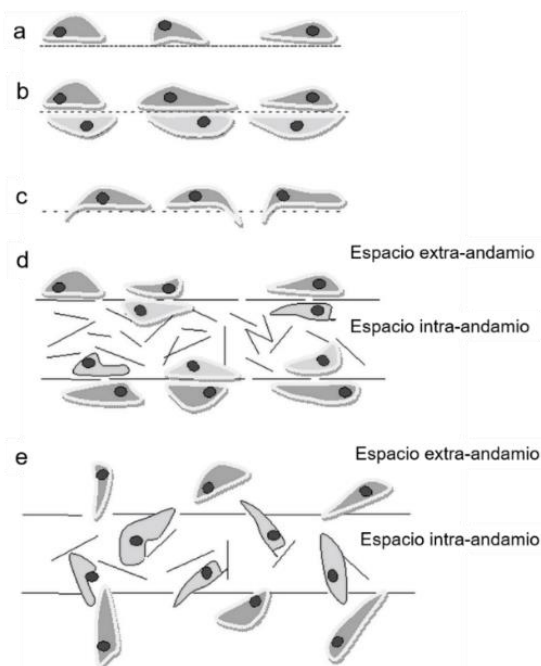
Las neuronas migran, proliferan, extienden sus neuritas y polimerizan los filamentos de actina tanto en sustratos blandos (0.1 kPa) como duros (GPa). Los astrocitos, por otra parte, proliferan en sustratos duros. Se ha observado en cocultivos de neuronas y astrocitos crecidos en sustratos blandos que las neuronas proliferan significativamente más que los astrocitos, lo cual podría ser una ventaja en un implante basado en un hidrogel, al promover por un lado la regeneración neuronal y por otro, suprimir el desarrollo de la cicatriz glial post-implantación. Esta hipótesis no aún no se ha demostrado, dado que los mecanismos involucrados en el reconocimiento celular de las propiedades mecánicas de los sustratos no se han esclarecido [31, 47].



**Figura 4.** Propiedades mecánicas del cerebro y diferentes materiales para la ingeniería de tejido neuronal. Comparación del módulo de Young del a) cerebro con respecto a otros tejidos y b) diversos materiales que se han empleado para la ingeniería de tejido neuronal. c) Rango de módulos de Young aptos para el cultivo de diversos tipos neuronales. PAAm: poli(acrilamida), PEG: poli(etilen glicol), PDMS: poli(dimetilsiloxano), PS: poliestireno, PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico), PLC: poli ε-caprolactona, Si: silicio, Ti: Titanio. Modificado de [46].

## Porosidad

La arquitectura interna, específicamente el tamaño de poro de los andamios, es de gran relevancia biológica dado que las células requieren de canales intercomunicados para el transporte de metabolitos y de desechos [48]. Las células interactúan principalmente con los andamios a través de ligandos en la superficie del material que favorecen la adhesión celular conocidas como adhesiones focales. La densidad del ligando está influenciada por la superficie del material disponible dentro de un poro al que pueden adherirse las células. Como se muestra en la Fig. 5, los poros del material deben ser lo suficientemente grandes (aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  de diámetro) para permitir que las células migren, interactúen entre ellas, se unan a los ligandos dentro del andamio y al mismo tiempo, lo suficientemente pequeños para poder soportar un cultivo celular. El tamaño de poro ideal varía para cada tipo de célula. En el caso de las neuronas, el tamaño de poro óptimo ronda los 100  $\mu\text{m}$  de acuerdo a varios autores [49-51].



**Figura 5.** Esquema de cómo los tamaños de poros en los andamios regulan la unión celular, la interacción y la migración. a) Andamios 2D con tamaño de poro  $< 1 \mu\text{m}$  favorecen la unión celular. b) Andamios 2D con poros de  $1-3 \mu\text{m}$  favorecen la interacción célula-célula dependiente de anclaje. c) Andamios 2D con poros de  $3-12 \mu\text{m}$  favorecen los contactos directos célula a célula, migración y/o invasión. d) Andamio 3D con poros de  $1-3 \mu\text{m}$  favorecen la interacción indirecta célula-célula o célula-matriz extracelular. e) Migración celular dentro y fuera de un andamio 3D a través de poros de  $100-800 \mu\text{m}$ . Modificado de [51].

## *Topografía*

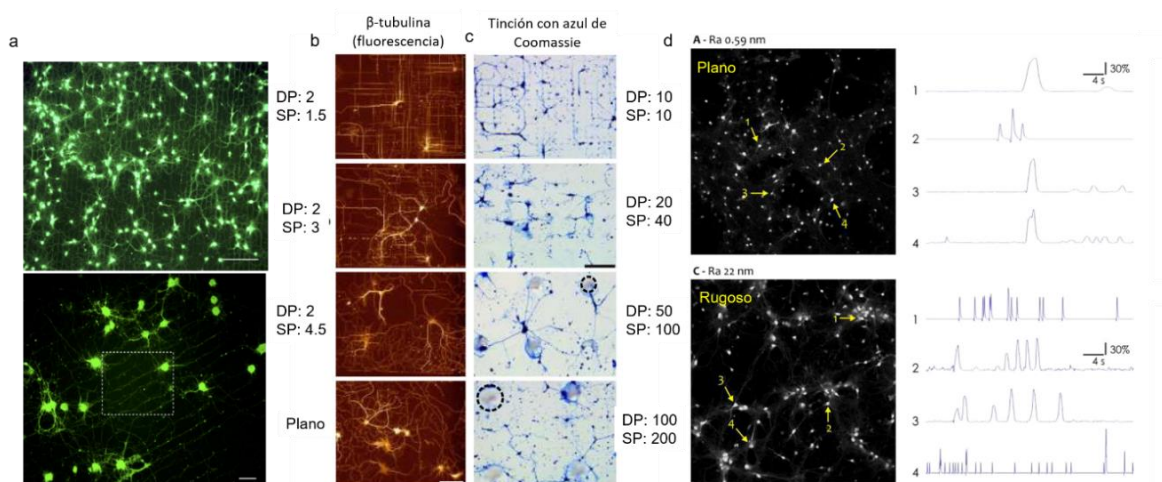
Las neuronas son muy sensibles a la topografía del entorno. Las topografías nanoestructuradas que imitan la arquitectura de los componentes de la matriz extracelular favorecen la diseminación, proliferación, transmisión de señales eléctricas, adhesión, guía y extensión de neuritas, migración celular e incluso modulan la diferenciación como se muestra en la Fig. 6 [16, 52-54].

El actual diseño de andamios para la ingeniería de tejidos busca mimetizar la topografía del entorno en que las células naturalmente se desarrollan. Se han empleado diversas técnicas para moldear a voluntad relieves a alta resolución para estudios sistemáticos y cuantitativos de la respuesta celular a la nanotopografía [55]. Particularmente, la estructuración en nanofibras y patrones de CNT alineados que mimetizan la matriz extracelular favorecen la biocompatibilidad, la extensión, ramificación y dirección de neuritas (Fig. 6a), así como la migración y alineación de las células gliales [56-63]. En el caso de las células troncales neurales, éstas pueden crecer sobre fibras de ácido (poli L-láctico) (PLLA) alineadas independientemente de su diámetro. Interesantemente, las nanofibras de PLLA (250 nm de diámetro) promueven la diferenciación celular, a diferencia de las microfibras de PLLA (1.25  $\mu\text{m}$  de diámetro). Se desconocen los mecanismos moleculares involucrados [64].

Por otra parte, se han cultivado neuronas sobre topografías isotrópicas en forma de pilares y orificios a escala nano y micrométrica. Los resultados demuestran que el diámetro de las nano y estructuras afecta la morfología celular. Por ejemplo, las células que crecieron sobre pilares de diámetro  $<5 \mu\text{m}$  mostraron un cuerpo celular pequeño, redondeado y con un citoesqueleto menos organizado, en comparación con células que se crecen sobre sustratos planos. Esta observación fue independiente del tipo celular evaluado. Además, las neuronas responden a topografías repetitivas y alineadas que toman como guías en ubicaciones discretas, logrando la alineación máxima sobre sustratos de pilares de diámetros (DP) pequeños (2  $\mu\text{m}$ ) y poco separados (SP) (1.5  $\mu\text{m}$ ) (Figs. 6b-c) [65-66]. Por ello, los enfoques actuales para la reparación y regeneración del tejido neural deben considerar la topografía de los andamios, con el fin de proporcionar orientación a las neuronas y neuroglia, controlar su diferenciación, así como favorecer el desarrollo neuronal para reestablecer las brechas entre el tejido neural dañado y el tejido neural regenerado [67]. Recientemente se observó que la implantación de células de la neuroglia cultivadas un andamio alineado de fibras de PLC mejora la regeneración del nervio ciático en rata [68].

Se ha propuesto que existen interacciones energéticas en la interfaz célula-nanomaterial que favorecen una sinergia entre la topografía del sustrato y las señales bioquímicas que permite orientar

las dendritas e incluso acelerar el desarrollo neuronal [69-70]. Estudios de simulación y análisis de la señalización de calcio con marcadores fluorescentes demostraron que células de neuroblastoma de ratón (Neuro2A) crecidas en un sustrato nanoestructurado de silicón conducen información de 3 a 4 veces más eficientemente que las redes aleatorias en superficies planas a los 11 días después de la siembra [69] (Fig. 6c). Estos resultados muestran que el impacto de la topografía en el desarrollo neural está pobremente entendido y que, en conjunto con la señalización bioquímica, la topografía deberá considerarse para el diseño racional de materiales para una eficiente ingeniería de tejido neuronal.



**Figura 6.** Impacto de la topografía en el fenotipo de cultivos neuronales *in vitro*. a) Crecimiento y alineación de neuritas sobre CNT. b) Micrografías de cultivos neuronales marcados con fluorescencia de  $\beta$ -tubulina y c) Micrografías ópticas de campo claro de neuronas teñidas con azul de Coomassie, ambas crecidas sobre pilares de distintos diámetros (DP) y separación entre ellos (SP). Los valores están expresados en  $\mu\text{m}$ . d) Micrografías de fluorescencia de neuronas marcadas con un indicador fluorescente de calcio intracelular y el perfil de actividad espontánea de neuronas cultivadas en un sustrato plano (superior) y rugoso (inferior). Figs. a-c, modificadas de [62, 65 y 69], respectivamente.

### *Funcionalización e inmovilización de sustancias activas*

Una estrategia para mejorar la integración del tejido del huésped con los andamios es funcionalizar los implantes con biomoléculas o bien, inmovilizar en su matriz sustancias activas que mejoren la biocompatibilidad y/o funcionabilidad del material [71]. Dada la baja tensión interfacial de los hidrogeles, frecuentemente estos requieren de una funcionalización que favorezca la adhesión celular. Los biomateriales, tales como el colágeno o HA, no requieren una funcionalización adicional dado que poseen naturalmente ligandos peptídicos de unión tipo RGD. Sin embargo, los andamios sintéticos típicamente se recubren con poli-L-lisina, fibronectina, gelatina, laminina, colágeno,

secuencias peptídicas de unión como el RGD, GRGDS, mi- GDPGYIGSR, mi-GQASSIKVA, entre otros [72-75].

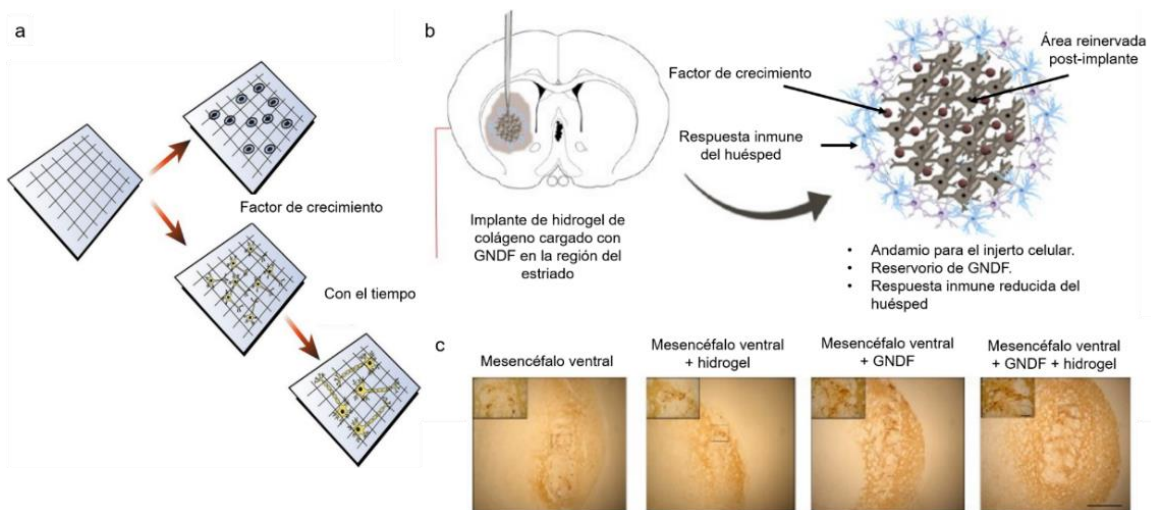
Otra modificación frecuentemente empleada es la inmovilización de factores de crecimiento en hidrogeles [76]. Los factores de crecimiento realizan funciones esenciales en los procesos de reparación y regeneración de los tejidos y han sido inmovilizados en hidrogeles con diversos fines. En la Fig. 7a se muestra la caricatura de un hidrogel con factores de crecimiento inmovilizados para la regeneración neuronal y un ejemplo de cómo la inmovilización del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) puede contribuir al tratamiento de enfermedades neurológicas como Parkinson (Fig. 7b-c). A continuación, se enlistan otras aplicaciones para las que ha resultado exitosa la inmovilización de factores de crecimiento en hidrogeles para la ingeniería de tejido neuronal.

- a) *Para mejorar la vascularización:* el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ha sido inmovilizado en diversos hidrogeles como propuesta para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares. En este campo, los resultados obtenidos han sido bastante prometedores observándose la generación *de novo* de redes neuronales funcionales vascularizadas [72, 77-78].
- b) *Para favorecer la extensión, infiltración y guía de neuritas:* Ha resultado exitosa la inmovilización del factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), entre otros [79-80].
- c) *Para modular la diferenciación celular:* Para mantener el estado no diferenciado de las células troncales injertadas en un hidrogel, se ha empleado la inmovilización del factor inhibidor de leucemia (LIF) y factor de células madre (SCF), con los cuales se reporta el mantenimiento del estado pluripotencial hasta por 2 semanas [81]. Por otra parte, la inmovilización del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en un hidrogel implantable, se empleó con éxito para la diferenciación de células pluripotenciales en linajes específicos como neuronas u oligodendrocitos y mejora en la comunicación sináptica [82].
- d) *Para promover la regeneración neural:* Se ha probado la inmovilización de numerosos factores de crecimiento, entre los que destacan las neurotrofinas, como el NGF que desempeña un papel crucial en la supervivencia y el mantenimiento de las neuronas simpáticas y sensoriales. La neurotrofina-3 (NT-3) desempeña un papel importante en la neurogénesis, al promover la diferenciación de nuevas neuronas y promueve la formación del tracto corticoespinal durante el desarrollo. La neurotrofina-4/5 y el BDNF, además de preservar la plasticidad neuronal, ayudan también a dirigir el desarrollo y poseen propiedades neuroprotectoras similares a NGF y NT-3 [71, 83]. Otros factores de crecimiento que se han

inmovilizado en matrices poliméricas por su capacidad para promover la regeneración nerviosa incluyen el factor neurotrófico ciliar (CNTF), los factores de crecimiento de fibroblastos (ácido y básico, aFGF y bFGF), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que reduce la proliferación de astrocitos *in vitro* y ha demostrado ser útil para cubrir implantes neurales reduciendo la cicatriz glial *in vivo* [84].

- e) *Para el tratamiento de los trastornos neurológicos:* En este tema resalta el uso del GDNF, que además de su actividad neuroprotectora, también tiene un efecto trófico en las neuronas dopaminérgicas. Por ello, para el tratamiento para enfermedades neurodegenerativas se ha propuesto la implantación de colágeno cargado con GDNF y con neuronas dopaminérgicas crecidas en él con resultados exitosos en ratas Parkinsonianas (Fig. 7b-c) [76, 85]. Asimismo se demostró que un hidrogel de oligo[poli(etilen glicol)fumarato] cargado con GDNF implantado en lesiones de médula espinal de ratas, promovió la regeneración axonal, la remielinización y mejoró la funcionalidad motora [86].

Las posibles combinaciones de materiales y factores de crecimiento son muy amplias y seguirán expandiéndose conforme a los avances tanto en ciencia de materiales como neurofisiología, proveyendo un catálogo cada vez más mayor de implantes personalizados. Ello ofrece un panorama alentador para la ingeniería de tejido neuronal en los próximos años.



**Figura 7.** Modelo de hidrogel con factores de crecimiento inmovilizados y ejemplo de aplicación para la restauración del tejido cerebral. a) El hidrogel ofrece soporte mecánico a las células exógenas y sirve además como reservorio de factores de crecimiento para favorecer la restauración de la función celular. b) Ejemplo de aplicación de implantes de colágeno cargados con GDNF en la región del estriados y mesencéfalo ventral. c) Micrografías de cortes de cerebro de rata inmuno-teñidas con tirosina hidroxilasa que muestran mayor cantidad de neuronas dopaminérgicas en las muestras con GDNF + hidrogel. La barra de escala representa 1 mm. Figs. a-c, modificadas de [20, 76 y 97], respectivamente.

## *Conductividad*

Los materiales conductores se han propuesto como parte de una nueva generación de andamios con el potencial de servir como estimuladores eléctricos neurales. Los efectos de la estimulación eléctrica en tejido nervioso se han documentado ampliamente. La estimulación eléctrica promueve la velocidad y regeneración axonal motora y sensorial, así como la liberación de catecolaminas [87-93]. La electroestimulación neuronal es un procedimiento actualmente aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, EUA) para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP), trastorno obsesivo-compulsivo, depresión, y recientemente se ha propuesto para la reparación del sistema nervioso periférico [94-96].

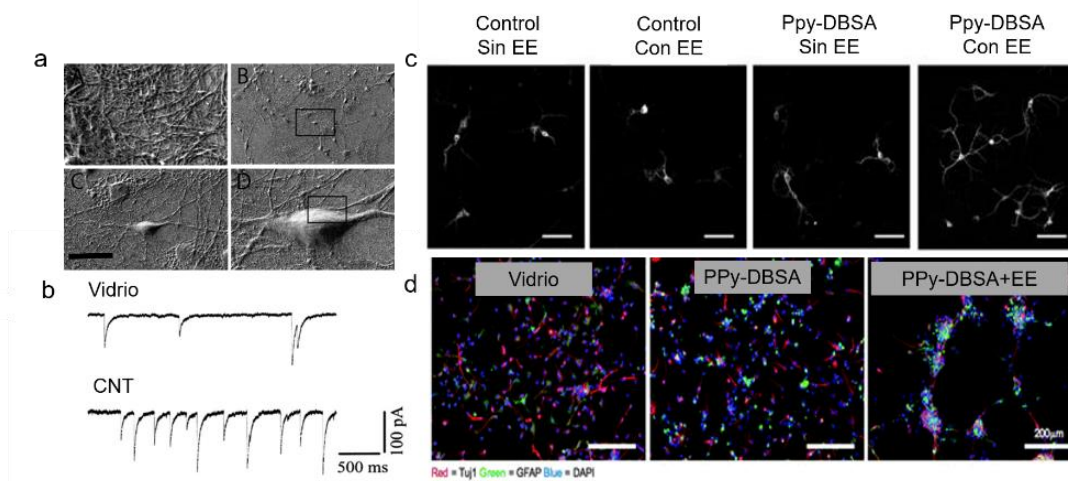
Los avances tecnológicos en el registro eléctrico y estimulación localizada han permitido el control de la activación de neuronas individuales *in vivo* contribuyendo a la comprensión de las redes neuronales [98]. A diferencia de las décadas pasadas, hoy se cuenta con la tecnología para realizar una estimulación eléctrica con mayor resolución espacial mejorando la especificidad [99].

Entre los nuevos materiales que se han propuesto para el diseño de electrodos para estos fines, se encuentran los derivados de carbono [61, 100] y polímeros conductores [22, 101] tales como el polipirrol (Ppy) [102-104], la polianilina (PANi) [105-106] y derivados de politiofeno [107-108]. En la Fig. 8. se presentan algunos ejemplos de cómo el uso de estos sustratos conductores puede aprovecharse para alterar la fisiología neuronal, entre los que destaca la diferenciación neural y desarrollo de neuritas. No obstante, ninguno de estos materiales ha logrado llegar a etapa clínica debido a la toxicidad que presentan.

Los CNT y el grafeno se han usado como sustrato para el crecimiento neuronal. Dadas sus propiedades conductoras ( $<0.3 \text{ S cm}^{-1}$ ), los derivados de carbono mejoran la comunicación eléctrica al formar contactos estrechos entre los compartimentos proximales y distales de las neuronas además de mejorar crecimiento neuronal y alargamiento las dendritas [109] (Fig. 8a). Además, neuronas cultivadas sobre CNT incrementan su frecuencia sináptica (actividad espontánea) en comparación de cuando éstas se crecen sobre vidrio (Fig. 8b) [110-114]. No obstante, al igual que los polímeros conductores, diversos autores han reportado una elevada citotoxicidad asociada al estrés oxidante en células crecidas en sustratos base derivados de carbono, lo que ha limitado su aplicación [115-117]. En ensayos *in vivo* también se ha reportado que los CNT inducen inflamación, fibrosis, cáncer de pulmón, malformaciones fetales, estrés oxidante, daño al DNA, entre otros [26-27].



Respecto al uso de polímeros conductores para la estimulación neural, el más popular ha sido el Ppy. El Ppy ha mostrado ser biocompatible tanto *in vitro* como *in vivo*, ayudar en la reconexión, neuroprotección y liberación de factores de crecimiento servir como electro-estimulador favoreciendo el crecimiento de dendritas (Fig. 8c) y la diferenciación de células troncales neuronales (Fig. 8d) [95, 118-122]. Sin embargo el Ppy presenta una gran dificultad para procesarse y solubilizarse una vez sintetizado, además de ser mecánicamente rígido y frágil que lo vuelven impráctico en los procesos quirúrgicos [123]. PANi por su parte, es un material económico, químicamente estable, con la capacidad de cambiar de un estado conductor a uno resistivo, además de ser biocompatible con cultivos neuronales [105, 124-126]. No obstante, PANi no es biodegradable, y en ratas induce inflamación crónica y fibrosis [124, 127-129]. Por su parte, los derivados de politiofeno, como el poli-3,4-etilendioxitiofeno (PEDOT), también se han estudiado como andamios para el cultivo neuronal, entrega de factores de crecimiento y estimulación eléctrica con una baja respuesta inmune cuando se implanta en la corteza cortical de rata [130-133]. Sin embargo, las células neuronales incrustadas en PEDOT muestran una pérdida de las fibras de estrés F-actina y luego de una semana éstas comienzan a morir por apoptosis [134-135]. Estos ejemplos, por un lado, resaltan algunos de los retos a superar en el diseño de materiales para la ingeniería de tejido neural y por otro, enfatizan la necesidad de diseñar un material conductor que sirva simultáneamente como un andamio para el crecimiento y electroestimulación neural y que además posea las propiedades mecánicas para poderse implantar.



**Figura 8.** Efectos de dos sustratos conductores sobre la fisiología neuronal. a) Micrografías de SEM de neuronas de hipocampo de ratón tras 10 días de cultivo formando contactos estrechos con un sustrato de CNT de pared simple. La barra de escala representa: superior izquierda: 1  $\mu\text{m}$ , superior derecha 200  $\mu\text{m}$ , inferior izquierda 25  $\mu\text{m}$  e inferior derecha 10  $\mu\text{m}$ . b) Las neuronas de hipocampo crecidas sobre el sustrato conductor de CNT de pared simple incrementan la actividad sináptica

espontánea en comparación con el sustrato de vidrio. c) Efecto de la estimulación eléctrica en el desarrollo de neuritas de neuronas corticales prefrontales de ratón a través del sustrato conductor de Ppy-Dodecilbensulfonato (DBSA). La estimulación eléctrica a través del sustrato de Ppy-DBSA incrementa el número y longitud de neuritas en mayor grado que la simple estimulación eléctrica. La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ . d) Efecto de la estimulación eléctrica del sustrato Ppy-DBSA en la diferenciación de células troncales neuronales humanas (hNSC). La imagen muestra la inmunocitoquímica de células que expresan Tuj1 (rojo), un marcador neuronal y la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) (verde) como marcador de astrocitos después de la diferenciación de hNSCs en vidrio, Ppy-DBSA y Ppy-DBSA estimulado eléctricamente. En azul se muestran los ácidos nucleicos teñidos con DAPI. Cuando se hizo pasar un flujo de corriente a través de Ppy-DBSA se observó la mayor diferenciación neural. Figs. a-d, modificadas de [136, 22, 121 y 122], respectivamente.

## Diseño del $\mu\text{ChipVP6-Au}$

El éxito de los andamios biológicamente activos para la ingeniería de tejidos recae en el diseño de las características fisicoquímicas óptimas de cada uno de sus componentes, así como de su comportamiento en conjunto [30, 137-138]. El andamio que se propone está conformado por las siguientes capas, de arriba hacia abajo:

- a) *Capa superficial*: monocapa de células neuronales.
- b) *Capa intermedia*: recubrimiento de nntVP6-Au.
- c) *Capa inferior*: película polimérica capaz de liberar sustancias de manera controlada.

A continuación, se presenta un breve marco teórico de cada uno de los componentes para facilitar el entendimiento del  $\mu\text{ChipVP6-Au}$ .

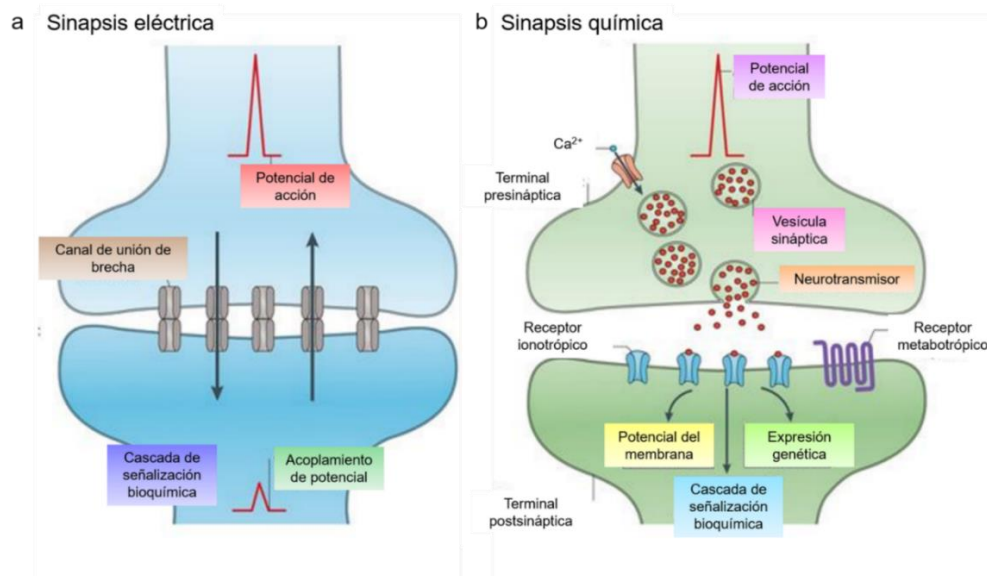
### *Capa superficial: Células neuronales como modelo biológico electro-responsivo*

Para validar el  $\mu\text{ChipVP6-Au}$  como material electroactivo, se eligieron las neuronas como modelo de estudio dado que las neuronas son capaces de transportar señales químicas y eléctricas durante la sinapsis. En la Fig. 9 se muestra un esquema simplificado de este proceso. En la sinapsis eléctrica (Fig. 9a), las neuronas generan diferencias de potencial de aproximadamente 100 mV a través de la membrana plasmática, y de aproximadamente 1 ms de duración, denominadas potencial de acción. Una neurona típica en reposo posee un potencial de reposo de aproximadamente -70 mV (la carga neta al exterior se define arbitrariamente como cero). El potencial de reposo está determinado por los gradientes de concentración de iones a través de la membrana y la permeabilidad

de la membrana para cada tipo de ion. La diferencia de potencial se debe a que la distribución desigual de cargas entre el interior y el exterior de la membrana y asemeja a un capacitor eléctrico (aproximadamente  $1 \mu\text{F cm}^{-2}$ ). Una bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  mantiene en el interior de la célula concentraciones bajas de  $\text{Na}^+$  (10 veces menor que en el exterior) y altas de  $\text{K}^+$  (20 veces mayor que en el exterior) [139].

Durante la sinapsis química (Fig. 9b), los neurotransmisores se liberan en la región presináptica tras un aumento transitorio del calcio intracelular ( $\text{Ca}_i^{2+}$ ) en el sitio de liberación. Principalmente, este aumento se logra por la activación de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que da lugar a un ingreso de iones de  $\text{Ca}_i^{2+}$  en el citosol de la célula presináptica, que desencadena la fusión de las vesículas sinápticas y la liberación del neurotransmisor [139]. Cuando los neurotransmisores difunden al exterior de la terminal presináptica, se unen a receptores específicos en la neurona postsináptica y lo que altera la conductancia y potencial eléctrico de los canales iónicos de la célula postsináptica [140].

En términos eléctricos, las neuronas se comportan como un capacitor, lo cual resulta atractivo para evaluar el  $\mu\text{ChipVP6-Au}$  como un material potencial para la electroestimulación neuronal.



**Figura 9.** Esquema simplificado de la sinapsis química y eléctrica. a) Sinapsis eléctrica. La transmisión eléctrica está mediada por grupos de canales de unión que conectan el interior de dos células adyacentes, permitiendo el paso bidireccional de corrientes iónicas representadas por las flechas, así como mensajeros intracelulares y metabolitos pequeños (no ilustrados). b) Sinapsis química. Se requiere un potencial de acción para activar los canales de calcio dependientes de voltaje. Los receptores ionotrópicos y metabotrópicos detectan y traducen el mensaje presináptico (neurotransmisores) en varios eventos postsinápticos, que van desde cambios en el potencial de membrana en reposo hasta la expresión génica. Modificado de [141].

### *Capa intermedia: región conductora de nntVP6-Au*

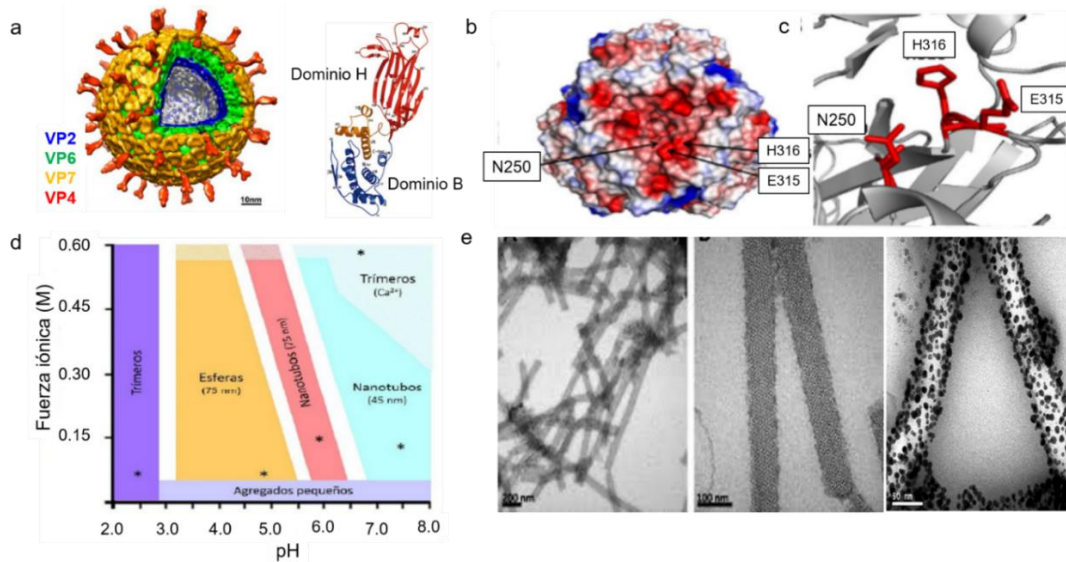
La región que estará en contacto directo con las neuronas debe poseer cualidades topográficas que se asemejen a la matriz extracelular, así como propiedades conductoras que permitan la electroestimulación [22-23]. Los nanobiomateriales son excelentes candidatos que mimetizan la arquitectura de la matriz extracelular y, a diferencia de los nanomateriales convencionales inorgánicos, tienen la capacidad de autoensamblarse, son biodegradables, poseen un amplio potencial de funcionalización, y versatilidad que puede manipularse biotecnológicamente [26, 142].

En nuestro grupo de trabajo, se han funcionalizado los nntVP6 con diferentes metales, incluyendo oro para formar los nntVP6-Au [27, 143]. En la Fig. 10 se muestra la estructura de VP6, las condiciones de su autoensamblaje, así como micrografías de los nntVP6-Au. La proteína VP6 conforma la capa intermedia de rotavirus y consta de dos dominios estructurales, el dominio H y el dominio B (Fig. 10a). El dominio H está formado por hojas  $\beta$ . El dominio B está constituido en su mayoría por hélices  $\alpha$ . Los contactos entre ambos dominios hacen que los monómeros de VP6 interactúen formando trímeros (Fig. 10b), que es la unidad básica en el ensamblaje de los nntVP6. Computacionalmente se han reconocido varios sitios potenciales de unión de metales en la proteína VP6 [144-145]. La proteína ensamblada expone los residuos N250, E315 e H316 (Fig. 10c), donde se cree que sucede la nucleación de las nanopartículas de Au (AuNPs) durante la funcionalización de los nntVP6-Au, obteniendo los nntVP6-Au, un material biorganometálico con una conductancia de  $1.74 \times 10^{-3} \Omega^{-1} \text{m}^{-1}$  [143].

En su forma trimérica, VP6 posee la capacidad de autoensamblarse en icosaedros o nanotubos dependiendo del pH y fuerza iónica del medio, así como de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y de la concentración de monómero (Fig. 10d) [143, Rodríguez-González et al. (artículo en preparación) [187]. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , el pH es el parámetro principal en el control de la estructura de los ensamblados de VP6. A pH menores que 3, VP6 se encuentra en forma de trímeros. A pH de 3.5 a 5.5 se ensamblan las partículas icosaédricas, mientras que los nanotubos con diámetros de 75 nm se ensamblan a pH 5.5 a 7. A pH mayores de 7 se forman tubos con diámetro de 45 nm. Esto sugiere que el estado de protonación de la proteína define la forma de su ensamble [144, 146-147]. En la Fig. 10e se muestran tres micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de los nntVP6, de izquierda a derecha, las dos primeras de nntVP6 sin funcionalizar y la tercera, nntVP6 funcionalizados con AuNPs para formar los nntVP6-Au.

Los nntVP6-Au poseen ventajas interesantes respecto a sus análogos de carbono, pues al estar formados de proteína son biodegradables y las nanopartículas de oro (AuNPs), que permanecerán en

el sitio de implante, pueden usarse para electroestimulación a largo plazo, como MEAs intracraneales [139, 148]. Por otra parte, dada su topografía rugosa y conductividad, hipotetizamos que los nntVP6-Au podrían ayudar a la adherencia y regeneración neuronal, como se ha visto ocurre con sus análogos de carbono [16, 23, 88-89, 110]. Por tanto, uno de los principales retos del presente trabajo será demostrar que los nntVP6-Au son inocuos para las células de mamífero, particularmente neuronas, y además que pueden servir como plataforma para el crecimiento y excitación eléctrica neuronal.



**Figura 10.** Esquema de la formación y estructura de los nntVP6-Au. a) VP6 es la proteína intermedia de la cápside de rotavirus y presenta dos dominios estructurales, el dominio H y el dominio B. b) VP6 se autoensambla en trímeros, los cuales exponen los aminoácidos N250, H316 y E315, que poseen afinidad por metales y son los sitios putativos de funcionalización con AuNPs. c) Diagrama de fases, pH vs fuerza iónica, donde se esquematizan las condiciones de ensamblaje de VP6 en trímeros, nanoesferas, nanotubos de 75 nm y 45 nm de diámetro y agregados pequeños. d) Imágenes de TEM de los nntVP6 sin funcionalizar (las dos primeras micrografías) y funcionalizados con AuNPs (tercera micrografía). Las barras de escalas se muestran en la figura. Figs. a y c modificadas de [146]. Figs. b y d modificadas de [26] y [149], respectivamente.

### *Capa inferior: Hidrogel estimulo-responsivo*

Como soporte de los nntVP6-Au, se optó por un hidrogel que libere fármacos de manera controlada y con propiedades mecánicas similares a los tejidos blandos, de manera que se minimice la irritación mecánica y de fricción en la implantación [35, 88-89]. Los hidrogeles con la capacidad de liberar sustancias de manera controlada son materiales compuestos de polielectrolitos que, ante

diferentes estímulos externos (cambios de temperatura, pH, ultrasonido, concentraciones de glucosa o urea, o bien diferencias de potencial), liberan sustancias previamente inmovilizadas en su matriz a una velocidad controlada [150]. Estos materiales permiten la personalización de los implantes de acuerdo a las necesidades de cada paciente, además de incrementar la biodisponibilidad y estabilidad del fármaco puesto que lo libera en el lugar, tiempo y dosis requeridas [5].

En la literatura se ha reportado un amplio número de hidrogeles para la ingeniería de tejidos; sin embargo, en el caso particular del cerebro, el número se reduce significativamente dado lo complicado de obtener un material biocompatible con el tejido cerebral [151]. En la tabla I, se presenta una lista de los polímeros que se han estudiado para la ingeniería de tejido cerebral. La principal limitante de los polímeros enlistados en la tabla I, son sus propiedades mecánicas no compatibles con los tejidos blandos [152]. Por tanto, uno de los principales retos del presente trabajo fue sintetizar y caracterizar un hidrogel biocompatible, que funcione como un nuevo andamio para la proliferación neuronal, que pueda unir los nntVP6-Au, tenga las propiedades mecánicas similares al cerebro, y sea posible inmovilizar y liberar de manera controlada diversas sustancias de su matriz.

Con base en lo anterior, se presenta en el capítulo III la hipótesis del trabajo.

**Tabla I. Polímeros propuestos para ingeniería de tejido cerebral.**

Material	Origen	Características	Aplicación	Referencia
Alginato	Natural	Hidrogel, andamio biodegradable.	Regeneración axonal.	[153]
Celulosa	Natural	Hidrogel	Reparación de tejido, terapia de células troncales, liberación de fármacos, anti inflamación.	[154]
Quitosán	Natural	Hidrogel, andamio biodegradable.	Restablecimiento de la función celular, regeneración axonal, liberación de fármacos, liberación de fármacos y factores neurotróficos.	[155-157]
Colágeno	Natural	Hidrogel, andamio biodegradable.	Sobrevivencia y proliferación celular, reparación de tejidos, restablecimiento de la función celular, liberación de factores de crecimiento, regeneración axonal, terapia de células troncales. Único material al momento en ensayos clínicos para ingeniería de tejido neural.	[158-161]
Fibrina	Natural	Hidrogel, andamio biodegradable.	Sobrevivencia celular, reparación de tejidos, restablecimiento de la función celular, anti-inflamación, terapia de células troncales.	[162-163]
Gelatina	Natural	Hidrogel, andamio biodegradable.	Sobrevivencia y proliferación celular, reparación de tejidos, anti-inflamación, terapia de células troncales.	[164-167]
HA	Natural	Hidrogel	Sobrevivencia celular, regeneración axonal, liberación de factores de crecimiento, terapia de células troncales, vascularización.	[77, 168]
Xiloglucano	Natural	Hidrogel	Regeneración axonal, reparación de tejido, supervivencia de células troncales.	[169]
PLC	Sintético	Hidrogel, andamio biodegradable.	Regeneración axonal, supervivencia celular, restablecimiento de la función celular, liberación de factores neurotróficos, terapia de células troncales.	[170-171]
PEG	Sintético	Hidrogel, andamio biodegradable.	Regeneración axonal, anti-inflamación, supervivencia celular, liberación de factores neurotróficos.	[172-173]
Poli(hidroxietil metacrilato) (PHEMA)	Sintético	Hidrogel, andamio.	Sobrevivencia celular, inmovilización de factores de crecimiento, regeneración axonal.	[174-175]
Poli(hidroxipropil metacrilato)	Sintético	Hidrogel	Regeneración axonal, anti-inflamación.	[176]
PLGA	Sintético	Andamio biodegradable	Regeneración axonal, vascularización, reparación de tejidos.	[177]
Poliuretano	Sintético	Hidrogel, andamio biodegradable.	Sobrevivencia celular, regeneración axonal, restablecimiento de la función celular, terapia de células troncales.	[178-179]
PuraMatrix®	Sintético	Hidrogel biodegradable.	Terapia de células troncales.	[180]
Ppy	Sintético	Andamio conductor	Regeneración axonal, proliferación celular, liberación de fármacos, estimulación eléctrica.	[121, 181]
PANi	Sintético	Andamio conductor	Regeneración axonal, proliferación celular, estimulación eléctrica.	[182]
PEDOT	Sintético	Andamio conductor	Regeneración axonal, proliferación celular, estimulación eléctrica.	[107, 134]

## CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE ESTUDIO

### Hipótesis

Las propiedades conjuntas tanto de los hidrogeles como de los nntVP6-Au pueden aprovecharse para la construcción de un  $\mu$ Chip biorganometálico que funcione simultáneamente como andamio para el crecimiento neuronal, liberación controlada de fármacos y como un potencial estimulador eléctrico neuronal.

### Objetivo general

Desarrollar y caracterizar un  $\mu$ Chip con base en nntVP6-Au que funcione simultáneamente como soporte para un cultivo neuronal, entrega controlada de fármacos y un potencial estimulador eléctrico neuronal.

### Objetivos particulares

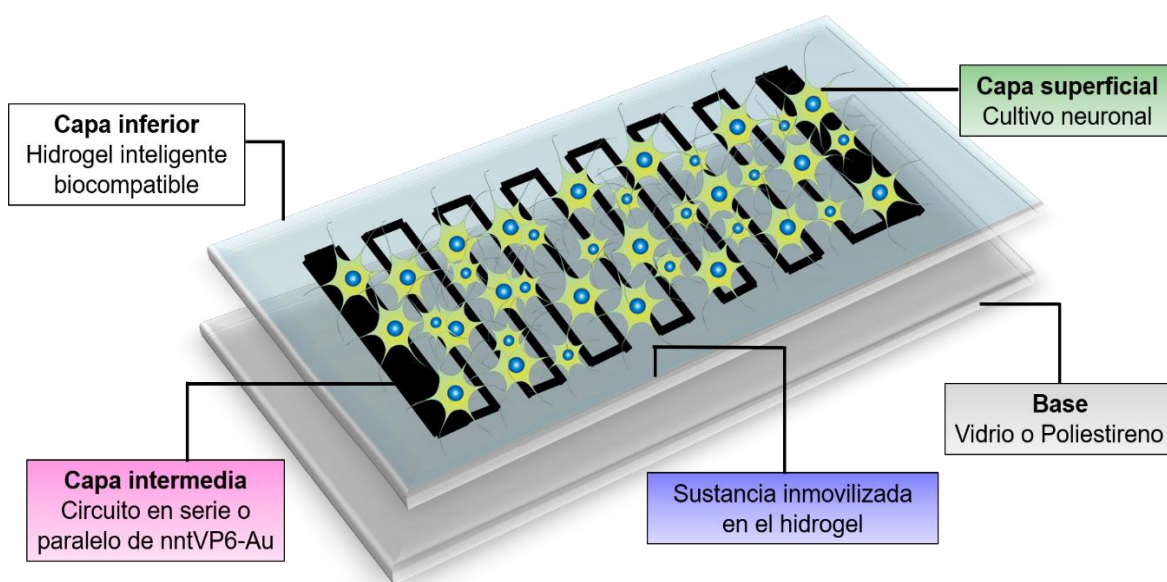
1. Obtener un hidrogel apto para el cultivo neuronal.
2. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas del hidrogel, así como su capacidad para la liberación controlada de una molécula modelo inmovilizada en su matriz.
3. Evaluar la capacidad de los nntVP6-Au como sustrato para el crecimiento neuronal.
4. Construir el  $\mu$ ChipVP6-Au (hidrogel-nntVP6-Au) y evaluar su funcionalidad *in vitro* como andamio para el crecimiento celular.
5. Realizar una prueba de concepto del  $\mu$ ChipVP6-Au como un potencial implante cerebral para la liberación de fármacos en un modelo murino de Parkinson.



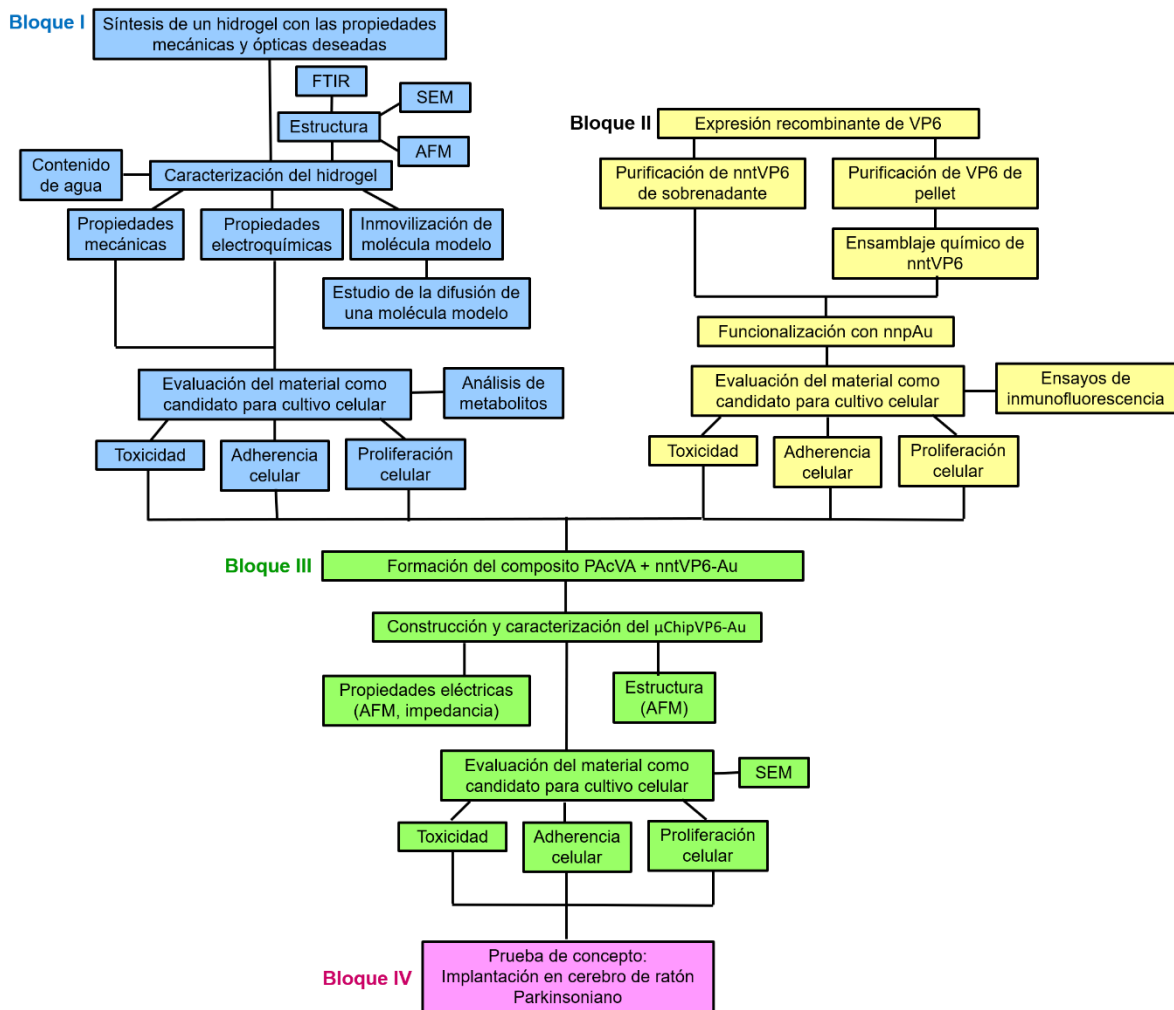
# CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA

## Materiales y métodos

En la Fig. 1 se muestra un esquema del diseño del  $\mu$ ChipVP6-Au. En la Fig. 2 se muestra un diagrama de flujo que resume la estrategia experimental seguida en el presente trabajo.



**Figura 1.** Esquema de la propuesta experimental para la construcción del  $\mu$ ChipVP6-Au. En el diagrama se señalan cada uno de los componentes. El dibujo no se encuentra a escala. Las dimensiones del  $\mu$ ChipVP6-Au pueden variar dependiendo del experimento.



**Figura 2.** Diagrama de flujo de la estrategia experimental. Bloque I. Síntesis y caracterización de PAcVA. Bloque II. Producción de nntVP6-Au y estudios de biocompatibilidad. Bloque III. Construcción y caracterización del  $\mu$ ChipVP6-Au. Bloque IV. Prueba de concepto del  $\mu$ ChipVP6-Au como implante cerebral en un modelo murino de Parkinson.

## Bloque I. Síntesis y caracterización del acetato de poli(vinil alcohol co-vinilo) (PAcVA)

### Síntesis de PAcVA

Se disolvió alcohol polivinílico (PVA) (Aldrich, 11773 Mowiol® 20-98, Mw 125,000), al 10% peso/volumen (w/v) en agua doblemente destilada en un baño de agua a 80° C con agitación

magnética. Esta solución se mezcló con diferentes cantidades de glutaraldehído (GA) (Sigma, G7651) en ausencia de catalizador ácido. La mezcla se incubó a 37° C durante 72 h.

## *Caracterización estructural de PAcVA*

### *Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)*

Se analizaron películas de PAcVA por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) como describen Mansur et al. [183]. Las películas de PAcVA se sintetizaron en placas de 24 pozos planos (Costar®, 2548). Se añadieron proporciones variables de PVA al 10% w/v y GA (37% w/v) a cada pozo hasta tener un volumen de reacción final de 0.1 mL. Esta mezcla se diluyó con 0.1 mL de agua desionizada para disminuir la viscosidad y permitir una mejor dispersión en la placa. La mezcla se incubó a 37° C durante 72 h. Posteriormente las películas se secaron en un desecador en presencia de MgSO<sub>4</sub> (Merck, 106067) durante 7 días o hasta que el peso seco permaneció constante.

Los espectros de FTIR se obtuvieron en el rango de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, utilizando un espectrómetro Thermo Nicolet Nexus 670 en modo de transmitancia. Se utilizaron las absorciones a 3300 cm<sup>-1</sup> (A<sub>3300</sub>), 1460 cm<sup>-1</sup> (A<sub>1460</sub>), 1650 cm<sup>-1</sup> (A<sub>1650</sub>) y 1710 cm<sup>-1</sup> (A<sub>1710</sub>) para calcular el contenido relativo de los grupos hidroxilo y puentes de acetal, como se describe en Mansur et al. [183] y en las ecuaciones 1 (Ec. 1) y 2 (Ec. 2).

$$\text{Grupos hidroxilo} = \frac{A_{3300\text{cm}^{-1}}}{A_{1450\text{cm}^{-1}} * A_{1650\text{cm}^{-1}}} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{Puentes de acetal} = \frac{A_{1710\text{cm}^{-1}}}{A_{1450\text{cm}^{-1}}} \quad (\text{Ec. 2})$$

### *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

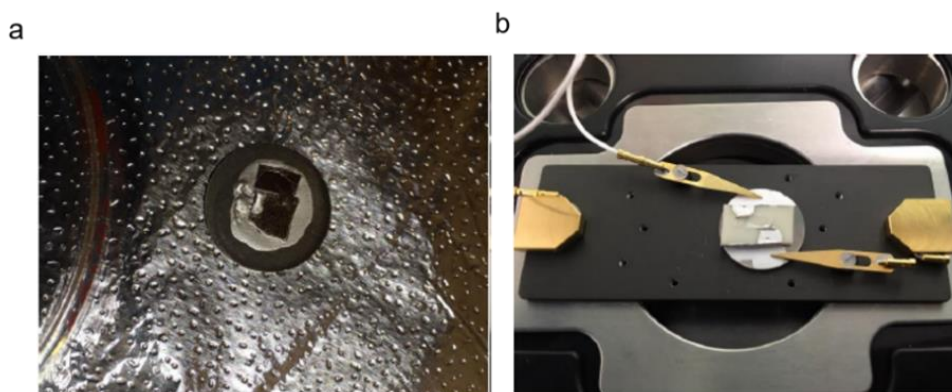
Las películas de PAcVA se deshidrataron en un desecador en presencia de MgSO<sub>4</sub> (Merck, 106067) hasta que el peso seco permaneció constante. Las películas secas se llevaron a una cámara de secado crítico (Aname, K850) y se recubrieron con carbono. Las imágenes SEM se obtuvieron con un microscopio JSM 5600-LV.

### Microscopía de fuerza atómica (AFM): Análisis topográfico de alta resolución

Las imágenes de AFM se obtuvieron en un microscopio ASYLUM RESEARCH Oxford modelo MFP-3D Origin. Para el análisis topográfico de alta resolución se cortaron 4 mm<sup>2</sup> de películas de PAcVA y se colocaron sobre un soporte de vidrio. Cada muestra se analizó en modo AC air con una sonda de alta resolución modelo SSS-NCH (NANOSENSORS™).

### Microscopía de fuerza atómica (AFM): Análisis de conductividad

Un esquema experimental del montaje de las muestras se esquematiza en la Fig. 3. La muestra se montó en discos de aluminio y se puso tintura de plata (Leitsilber 200 Silver Paint, TED PELLA, INC.) a un costado de la muestra (Fig 3a). La muestra se montó en un soporte de electrocontacto (Fig. 3b) para permitir la operación de modo eléctrico con el módulo ORCA. Se empleó una sonda ASYLEC, marca ASYLUM para el análisis de la conductividad.



**Figura 3.** Esquema experimental del montaje para análisis de conductividad por AFM. a) La muestra se colocó en discos de aluminio con tintura de plata y b) posteriormente se montó en un soporte de electrocontacto para permitir el barrido de la muestra y obtener el mapa de conductividad.

## *Análisis de las propiedades mecánicas de PAcVA*

### Compresión uniaxial

La fuerza de fractura, el módulo de Young, el esfuerzo de cedencia y la deformación elástica se determinaron mediante compresión uniaxial a 24 °C y 65% de humedad relativa, como se esquematiza en la Fig. 4. Se sintetizaron cilindros de PAcVA de 10 cm de largo y 2.5 cm de diámetro

con diferente grado de entrecruzamiento y se comprimieron en una máquina para pruebas mecánicas (MTS, modelo Sintech 1/S, EE. UU.) (Fig. 4a), midiéndose la deformación del material hasta su fractura (Fig. 4b). Se utilizó una punta plana cilíndrica (25 mm de diámetro) a una velocidad constante de  $100 \text{ mm min}^{-1}$  con una carga nominal de celda de 500 N (353.45 N de carga efectiva).

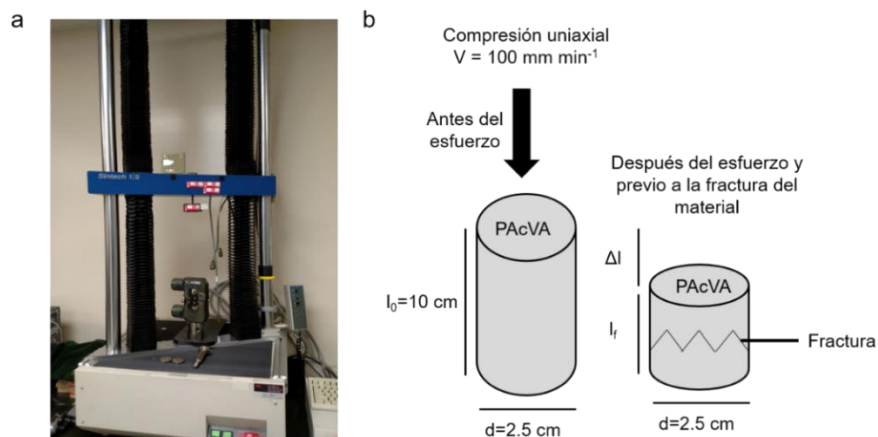
La fuerza de fractura se calculó a partir de los máximos de los gráficos de fuerza respecto al tiempo. El módulo de Young se calculó a partir de las pendientes de los gráficos de esfuerzo ( $\sigma$ ) respecto a la deformación ( $\epsilon$ ), como se indica en las Ec. 3 y Ec. 4:

$$\text{Módulo de Young} = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\epsilon} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\Delta\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde  $\Delta\epsilon$  es la relación entre el cambio de longitud ( $\Delta l$ ) sobre la longitud inicial,  $l_0$ .

El esfuerzo de cedencia se calculó a partir del máximo en los gráficos de  $\sigma$  respecto a  $\epsilon$ . La deformación elástica se estimó a partir del valor de deformación en la deformación de máximo rendimiento.



**Figura 4.** Esquema experimental del procedimiento para la caracterización mecánica de PAcVA por compresión uniaxial. a) Máquina para pruebas mecánicas (MTS, modelo Sintech 1/S, EE. UU. b) Diagrama de la compresión uniaxial de cilindros de PAcVA y su deformación antes y después del esfuerzo aplicado. Donde  $l$  = longitud,  $l_0$  = longitud inicial,  $l_f$  = longitud final,  $\Delta l$  = variación de longitud,  $d$  = diámetro,  $V$  = velocidad.

### Contenido de agua

Discos de PAcVA completamente deshidratados como se indicó anteriormente se pesaron y luego se colocaron en agua doblemente desionizada hasta que el peso del polímero hidratado permaneció constante. Los valores presentados son el promedio de 3 muestras independientes. El contenido de agua en el equilibrio se estimó utilizando la Ec. 5 según se reporta en [184]:

$$\text{Contenido de agua (\%)} = \frac{W}{W_h} * 100 \quad \text{Ec. 5}$$

Donde  $W$  es el peso de agua en el polímero seco y  $W_h$  es el peso del polímero hidratado.

### Hinchamiento

Discos de PAcVA se deshidrataron como se indicó anteriormente hasta que el peso seco permaneció constante. Los discos se pesaron y luego se colocaron en un amortiguador de  $K_2HPO_4$  (JT Baker, 3252-01) y  $KH_2PO_4$  (JT Baker, 3246-01) (1 M), se mezclaron varias razones de volumen para obtener diferentes valores de pH: 5.8, 7.0 y 8.0, pero manteniendo la fuerza iónica constante. A diferentes intervalos de tiempo, los discos del hidrogel se sacaron del fluido, se les retiró el exceso de líquido con un papel filtro y se pesaron. Los valores que se presentan son el promedio de 3 muestras independientes. Los grados de hinchamiento ( $D_s$ ) (%) se calcularon utilizando la Ec. 6, según lo reportado por [185].

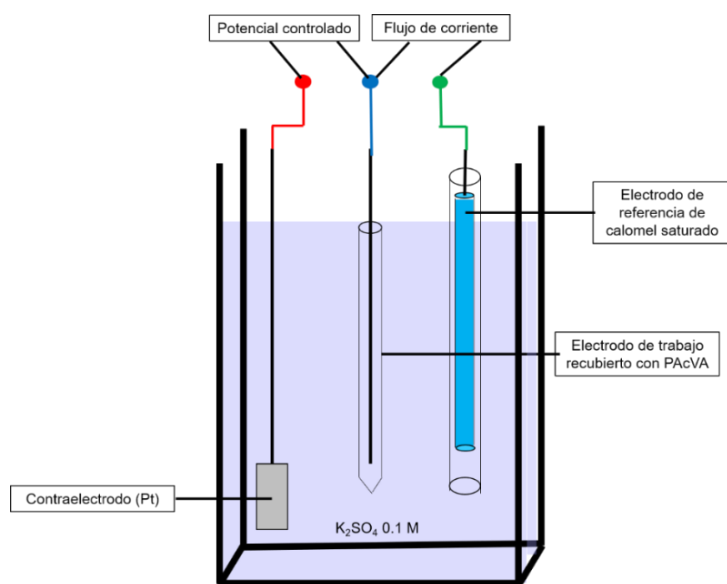
$$D_s (\%) = \left( \frac{W_h - W_d}{W_d} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

donde  $W_h$  y  $W_d$  son los pesos de los hidrogeles hidratados y deshidratados, respectivamente.

### *Caracterización electroquímica por voltametría cíclica (CV)*

El sistema experimental fue una celda electroquímica con tres electrodos conectados a un potenciostato PGZ301 (VoltaLab®) para la aplicación de diferencias de potencial, como se esquematiza en la Fig. 5. El electrodo de trabajo consistió en un alambre de platino (Sigma Aldrich, 267201) cubierto con una capa de 0.1 mm de PAcVA. El contraelectrodo fue una malla de platino de área superior a la del electrodo de trabajo. El electrodo de referencia fue un electrodo de calomel

saturado (SCE,  $E_0 = 0.24$  V). El electrolito fue  $K_2SO_4$  0.1 M (Sigma, 203726) disuelto en agua ultrapura MilliQ™. Todos los potenciales reportados en este trabajo se corrigieron con respecto al electrodo normal de hidrógeno. La adquisición de datos se realizó con el software Voltmaster 4. Se estudiaron los intervalos de potencial donde PAcVA hidratado se oxida y reduce mediante CV. El potencial se varió a partir del potencial en reposo ( $E_0 = -560$  mV vs SCE) en la dirección negativa en intervalos de 10 mV hasta alcanzar el potencial límite negativo,  $E - \lambda = -1.0$  V vs SCE, a una velocidad de  $50$  mV  $s^{-1}$  durante al menos 5 ciclos.



**Figura 5.** Esquema experimental de la celda de tres pozos que se empleó para la caracterización electroquímica de PAcVA por CV.

### *Análisis de las propiedades difusivas*

#### Inmovilización de fluoresceína como molécula modelo

Se sintetizaron películas de PAcVA mediante la adición de  $100$   $\mu$ L de la mezcla de reacción en placas de 96 pozos (Corning Costar, 3591), variando la cantidad de GA para obtener hidrogeles con diferente grado de entrecruzamiento. La mezcla se incubó a  $37^\circ$  C durante 36 h, luego se agregaron a cada pozo  $100$   $\mu$ L de una solución de fluoresceína (Sigma, F2456) a diversas concentraciones. La mezcla se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente para permitir la dispersión de fluoresceína en la matriz del hidrogel. Después de la incubación, las placas se calentaron a  $37^\circ$  C durante 36 h.

### Cinética de liberación de fluoresceína

Se inmovilizaron  $156 \mu\text{g cm}^{-2}$  de fluoresceína en discos de PAcVA. Posteriormente, los discos se lavaron tres veces con agua desionizada para desechar la fluoresceína no adsorbida. Luego, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y se siguió la cinética de liberación de fluoresceína midiendo la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech, EE. UU.). Se evaluaron diferentes grados de entrecruzamiento y diferentes temperaturas.

La distribución de la fluoresceína en la matriz de PAcVA se determinó mediante imágenes de fluorescencia adquiridas con un microscopio BX61WI vertical confocal 2P de Olympus FV1000 ( $\lambda_{\text{exc}}$  514 nm y  $\lambda_{\text{em}}$  488 nm) y un objetivo 60X S/1.3.

### Determinación de la difusividad efectiva de liberación de fluoresceína

Se consideró la geometría de PAcVA para determinar la difusividad efectiva de la fluoresceína a través de las películas de PAcVA en función del entrecruzamiento, para la cual se desarrolló y empleó la Ec. 7. El procedimiento y consideraciones para su obtención se describe y discute en el capítulo V.

$$\bar{x}(t) = x_e + \frac{8(x_0 - x_e)}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^2} e^{-\frac{(2n-1)^2 \pi^2 t D_{eff}}{4L^2}} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde  $\bar{x}(t)$  es la concentración de fluoresceína en el polímero en el tiempo  $t$ ,  $x_0$  es la concentración de fluoresceína en el tiempo cero,  $x_e$  la concentración de fluoresceína en el hidrogel en el equilibrio,  $D_{eff}$  es difusividad efectiva y  $L$  es el espesor del material. Los datos se ajustaron mediante un procedimiento de mínimos cuadrados no lineal que emplea con el solucionador de problemas de Excel (Excel para Windows 2016; Microsoft Inc.).

## *Evaluación de PAcVA como potencial andamio para cultivo celular*

### Cultivo celular

Películas delgadas de PAcVA se sintetizaron en placas de 24 pozos (Costar, 2548), como se describió anteriormente. Para eliminar el GA remanente de la reacción y neutralizar el pH, las películas se lavaron exhaustivamente con amortiguador de fosfatos (PBS) ( $\text{NaCl } 0.9 \text{ g L}^{-1}$  Baker



Analyzed, 3624-01; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.038 g L<sup>-1</sup> Sigma, 71636; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.021 g L<sup>-1</sup> Sigma, 1551139) pH 7.2, hasta equilibrar el pH y la fuerza iónica. Las películas lavadas se secaron parcialmente por 3 h bajo flujo laminar, se esterilizaron con luz UV durante 60 minutos y se secaron totalmente a temperatura ambiente durante la noche bajo flujo laminar.

Se evaluaron distintos recubrimientos del polímero: a) Adición de gelatina al 2% (Sigma, G9391). b) Adición de heparina (0.5 M) (Sigma, H3393). c) Poli ornitina al 0.01% (Sigma, P4957). d) Poli-L-lisina (Sigma, P4707). En cada caso se atendieron a las instrucciones del fabricante. e) Combinación de poli-L-lisina y laminina como se describe a continuación. Los hidrogeles se recubrieron con 0.5 mL de poli-L-lisina (Sigma, P4707) por pozo. Las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y luego se lavaron dos veces con agua desionizada estéril. A este tratamiento le siguió un recubrimiento con laminina (50 µg mL<sup>-1</sup> disuelto en PBS, 1 mL por cada 25 cm<sup>2</sup>) (Sigma, L2020) con una incubación durante 2 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las películas de PAcVA finalmente se lavaron dos veces con medio de cultivo. Las películas permanecieron cubiertas con medio de cultivo durante la noche, como prueba de esterilidad y para saturar de nutrientes las películas de PAcVA. Los controles fueron los pozos de la placa con el mismo tratamiento de poli-L-lisina y laminina, en ausencia de PAcVA.

Después de la incubación, se agregó 1 mL de una suspensión de células mHypoE-N1 de hipotálamo de embrión de ratón, o células de neuroblastoma de embrión de ratón (Neuro2A) amablemente donadas por la Dra. Leonor Pérez Martínez; o bien, células A-549 de carcinoma de pulmón humano (50 x 10<sup>3</sup> células mL<sup>-1</sup>). Las líneas neuronales se crecieron en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) (Sigma, I7633). Las células de carcinoma pulmonar en medio Eagle modificado de Dulbecco) DMEM (Sigma, D7777). Ambos medios se complementaron con suero bovino fetal al 10% (Thermo Fisher Scientific, 12657029). Las células se incubaron a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### Citotoxicidad

La medición de citotoxicidad se llevó a cabo midiendo la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) como un biomarcador de citólisis, utilizando el kit de ensayo de citotoxicidad Pierce™ LDH (Thermo Fisher Scientific, 88953), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Estrés oxidante

El estrés oxidante se midió con el kit de detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) Green Image-It™ LIVE (Thermo Fisher Scientific, I36007), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Adherencia celular

Para evaluar la adherencia celular, se tomaron micrografías ópticas de campo claro periódicamente con una cámara Nikon DS-Qi1Mc acoplada a un microscopio Nikon Eclipse TE300.

### Proliferación celular

La proliferación celular se midió utilizando el kit de ensayo de proliferación celular CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, G3581) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Análisis de metabolitos

La cuantificación de metabolitos se llevó a cabo tomando una muestra de 200 µL de cada cultivo, la cual se centrifugó 10 min a 10,000 rpm a 4° C en una microcentrífuga Minispin® 5452, Eppendorf 5452 con un rotor F-45-12-11. Los sobrenadantes se guardaron a -20° C hasta su análisis. La cuantificación de glucosa, lactato, glutamina y glutamato se efectuó en un analizador bioquímico YSI 2700.

## **Bloque II. Producción de nntVP6-Au y estudio de biocompatibilidad**

### *Producción y purificación de nntVP6*

La producción y purificación de los nntVP6 de sobrenadante y pellet se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos por [26, 147] y [186], respectivamente.

### Ensamblaje químico de la proteína VP6 en nntVP6

El ensamblaje químico de VP6 purificada de pellet en nanotubos de acuerdo con Rodríguez-González et al. (artículo en preparación) [187] como se describe a continuación. La proteína VP6 se

desensambló con  $\text{CaCl}_2$  (Sigma, 449709) 300 mM durante una noche en incubación a 4° C y en condiciones de oscuridad durante 12 h. Posteriormente se añadieron 10 volúmenes de  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma, S5761) 100 mM, pH 8.3. La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad para permitir la precipitación del  $\text{CaCO}_3$ . Luego la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Finalmente, el sobrenadante se concentró en una unidad de ultrafiltración (Amicon Millipore USA) con una membrana de celulosa regenerada de corte de 30 kDa (Millipore, USA). Previo a su funcionalización con oro, los nntVP6 se dializaron en agua desionizada a 4° C y oscuridad por 7 días en membranas Spectra/Por® 1 MWCO 6000-8000 (Spectrum® Laboratories).

### *Funcionalización de los nntVP6 con AuNPs*

La funcionalización de los nntVP6 se llevó a cabo con base en la metodología modificada previamente reportada por [26]. Las modificaciones se detallan a continuación. A una solución de nntVP6 ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) disueltos en agua desionizada se le añadieron 2 mM de  $\text{HAuCl}_4$  (Sigma Aldrich 254169). La reacción protegida de la luz con papel aluminio se incubó por 3 h a 27 °C y agitación de 50 rpm. Transcurrido ese tiempo se realizó una reducción con una cantidad equimolar de citrato de sodio tribásico (Sigma Aldrich, C-7254) o borohidruro de sodio (Sigma Aldrich, 452882), según se indica en cada caso. La reacción se detuvo a los 75 min, cuando la absorbancia a 540 nm y 520 nm fuera máxima para la reducción con citrato de sodio o borohidruro de sodio, respectivamente. El monitoreo de la absorbancia se llevó a cabo en un lector de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech, EE. UU.). Los nanocomplejos se centrifugaron a 10,000 rpm a 4 °C en un centrífuga (Eppendorf, 5804R) por 30 min. El sobrenadante se descartó por decantación. Finalmente, para eliminar las trazas de agente reductor, se llevó a cabo una diálisis en agua desionizada a 4 °C y oscuridad por 7 días en membranas Spectra/Por® 1 MWCO 6000-8000 (Spectrum® Laboratories).

### *Microscopía electrónica de transmisión (TEM)*

Las muestras de nntVP6 y nntVP6-Au se prepararon sobre rejillas de formvar-carbón (Electron Microscopy Sciences, F-200-Cu) colocando 10  $\mu\text{g}$  de la proteína durante 5 min. Posteriormente el exceso de agua se removió por capilaridad sin tocar la rejilla con un trozo de papel filtro. Posteriormente se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de un colorante de tinción negativa de acetato de uranilo (Agar Scientific, R1260A) al 2% y se incubó por 3 min. Se removió el exceso de líquido por

capilaridad y después se lavó la rejilla con 10  $\mu\text{L}$  de agua desionizada durante 1 min. En el caso de los nntVP6-Au, el procedimiento es idéntico exceptuando la tinción negativa. Todas las soluciones empleadas en este protocolo fueron previamente filtradas a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Merck, SLGS033SB).

## *Análisis de biocompatibilidad de los nntVP6-Au*

### *Proliferación y citotoxicidad de células crecidas sobre nntVP6-Au*

Para evaluar la biocompatibilidad *in vitro* de los complejos de nntVP6Au, las células de mamífero mHypoE-N1 y A-549 se expusieron a 31.5  $\mu\text{g cm}^{-2}$  de nntVP6-Au. Como controles negativos se compararon con cultivos expuestos a 31.5  $\mu\text{g cm}^{-2}$  de albúmina de suero bovino (BSA) como proteína irrelevante (BioRad, PHP149) y nntVP6. Como blanco y criterio de normalización se consideraron cultivos celulares que se crecieron sobre placas de 96 pozos comerciales sin tratamiento en ausencia de nanocomplejos (Corning Costar, 3595). Se evaluó la proliferación celular, citotoxicidad, estrés oxidante y producción y consumo de metabolitos como se describió anteriormente.

### *Ensayos de inmunofluorescencia*

Las células se cultivaron durante 72 h en *Chamber Slides*<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, 154534), previamente recubiertas con 31.5  $\mu\text{g cm}^{-2}$  de nntVP6-Au. Las células se lavaron una vez con PBS pH 7.2 y se fijaron con 200  $\mu\text{L}$  de formaldehído (FA) (Sigma, 252549) diluido al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. La solución se retiró por aspersion y las células nuevamente se lavaron con PBS. Las células se permeabilizaron con 200  $\mu\text{L}$  de una solución de deoxicolato de sodio (Sigma, D6750) al 0.2% w/v y 2% w/v de BSA (BioRad, PHP149) en PBS durante 15 min. La solución de permeado se retiró por aspersion y las células se lavaron nuevamente con PBS. En condiciones de oscuridad, las células se incubaron durante 1 h a 37° C con el anticuerpo primario anti-ratón 255/60 producido y amablemente donado por la Dra. Susana Castro diluido 1:100 en leche descremada (Svelty) al 2% en PBS. Posteriormente, se retiró la solución y las células se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con los anticuerpos secundarios anti-ratón Alexa 594 diluido 1:1000 y faloidina Alexa 588 diluido 1:500. Ambos anticuerpos se diluyeron en leche descremada al 2% (Svelty) en PBS. La tinción de los ácidos

nucleicos se llevó a cabo con Hoechst (Sigma, H6024) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se observaron en un microscopio confocal invertido Olympus FV1000 multi-fotónico con un objetivo de 40X/0.75 (Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada).

### **Bloque III. Construcción y caracterización del $\mu$ ChipVP6-Au**

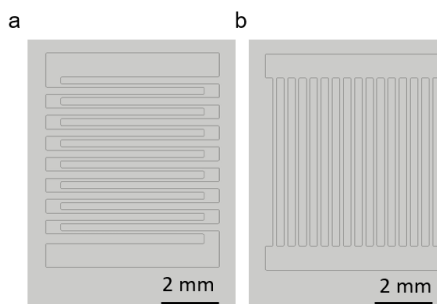
#### *Construcción y caracterización del composito PAcVA-nntVP6-Au*

La construcción del composito PAcVA-nntVP6-Au se llevó a cabo utilizando PAcVA entrecruzado con 10% de GA (Sigma, G7651). Se adicionaron  $31.5 \mu\text{g cm}^{-2}$  de nntVP6Au dispersos en agua desionizada a películas de PAcVA de 0.5 mm de espesor depositadas en un sustrato de vidrio y se dejó secar en flujo laminar por 12 h en oscuridad. Posteriormente se irradió con luz UV durante 60 min para su esterilización. El composito se recubrió con poli-L-lisina (Sigma, P4707) y laminina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), como se describió anteriormente. Asimismo, se caracterizó por AFM la topografía y conductividad del composito PAcVA-nntVP6-Au, como se describió previamente.

#### *Construcción del $\mu$ ChipVP6-Au*

Para la construcción del  $\mu$ ChipVP6-Au, se diseñaron los circuitos electrónicos en serie y paralelo con el software de diseño mecánico Autodesk Inventor® que se muestran en la Fig. 6 y se grabaron en moldes de poli(metil meta acrilato) (PMMA) de 1 mm de espesor con una máquina de corte y grabado láser (Minitch®, FP0R4) con un controlador Nakanishi E3000. Con los moldes de PMMA, se realizó la correspondiente réplica de 1 mm de espesor en Poli(dimetil siloxano) (PDMS) (Sigma, Sylgard®184). La polimerización del PDMS se llevó a cabo usando una proporción 10:1 de base (Sylgard®, 3097366-1004) y agente curante (Sylgard®, 3097358-1004). La mezcla se homogeneizó 5 min con un taladro manual Dremel® a 150 rpm y se desgasificó al vacío por 12 min.

La polimerización se realizó durante 1 h a 60 °C en un horno Luzeren® PCDE-3000. Los sellos se desmoldaron y se incubaron 3 h a 150 °C. Posteriormente los sellos se cortaron con navaja para ajustarlos al tamaño de los hidrogeles.



**Figura 6.** Diseño realizado para el grabado con láser en moldes de PMMA del  $\mu$ ChipVP6-Au en a) serie y b) paralelo.

La estandarización de las condiciones de impresión por microcontacto sobre películas de PAcVA a 10% GA, se realizó imprimiendo patrones lineales de gelatina conjugada a fluoresceína (BioVision, M1303), amablemente donada por el Dr. Mathieu Hautefeuille, a una concentración de  $770 \mu\text{g mL}^{-1}$  variando la fuerza de 0.2 a 1.8 N en una máquina de microcontacto fabricada por el Fis. Félix Cerón-Vera. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio BX61WI vertical confocal 2P Olympus FV1000 ( $\lambda_{\text{exc}}$  514 nm y  $\lambda_{\text{em}}$  488 nm) con un objetivo 60X S/1.3.

La impresión de los patrones de nntVP6-Au se realizó partiendo de una concentración inicial de  $2.1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Los sellos de PDMS se recubrieron con 80  $\mu\text{L}$  de la dispersión de nntVP6-Au y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 min. El exceso de muestra se retiró con micropipeta y se aplicó aire comprimido Silimex Aerojet 360® durante 5 s. Posteriormente, el sello se colocó sobre una película de PAcVA de  $1 \text{ cm}^2$  y 0.5 mm de espesor y aplicando una fuerza constante de 1.0 N durante 5 min. Para el caso de las impresiones de circuitos de nntVP6-Au en vidrio, se usaron cubreobjetos (FischerScientific, 12-545-83) previamente limpiados con etanol al 70% (Merck, 107017) y toallas limpiadoras de baja pelusa (Kimwipe, S-8115). Posteriormente los cubreobjetos se ionizaron en una cámara de UV-ozono (MTI Corporation, PCE-44-LD) por 15 min. El procedimiento de impresión es idéntico al previamente descrito para PAcVA exceptuando que la fuerza aplicada fue de 15 N. Las micrografías del  $\mu$ ChipVP6-Au se tomaron con una cámara Nikon DS-Qi1Mc acoplada a un microscopio Nikon Eclipse TE300.

### Caracterización eléctrica del $\mu$ ChipVP6-Au

La caracterización eléctrica de las impresiones se realizó en un medidor de impedancias Agilent LCR meter E4980A operado a 50 mV. Todas las mediciones se llevaron a cabo con muestras de PAcVA hidratadas en PBS pH 7.2. El cálculo de la resistividad de las impresiones de nntVP6-Au sobre PAcVA se calcularon mediante la Ley de Pouillet (Ec. 8) en patrones de nntVP6-Au lineales de longitud y área transversal variable.

$$R = \rho \frac{l}{a} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde la resistencia (R) es proporcional a la longitud del material ( $l$ ), e inversamente proporcional al área transversal ( $a$ ) y la pendiente determina la resistividad del material ( $\rho$ ).

### *Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de dispersión por rayos X (XAS)*

Se cultivaron 100,000 cel mL<sup>-1</sup> de mHypoE-N1 o A-549 sobre el  $\mu$ ChipVP6-Au durante 8 días con el protocolo descrito anteriormente y se lavó tres veces con solución de Hank (Thermo Fisher Scientific, 14025076) a temperatura ambiente. Las células se fijaron con una solución de GA (Sigma, G7651) al 2.5% filtrada por membranas de 0.22  $\mu$ m (Merck, SLGS033SB) a 4 °C durante 2 h.

Posteriormente la muestra se lavó 3 veces con agua desionizada. Las muestras se deshidrataron con etanol (Merck, 107017) en diluciones seriadas a temperatura ambiente: 10% 2 h, 20% 2 h, 30%, 1 h, 40% 1 h, 50% 1 h, 60% 1 h, 70% 1 h, 80% 1 h, 90% 1 h, 95% 1 h, 97.5% 1 h, 99% 1 h y finalmente 100% 1 h (3 veces) cuidando de no exponer las células al contacto con aire para evitar la formación de aductos en la membrana por el cambio de tensión superficial. Las muestras se analizaron por SEM como se describió anteriormente.

## **Bloque IV. Implantación intracraneal del $\mu$ ChipVP6-Au en un modelo murino de Parkinson**

### *Mantenimiento de los animales*

Todos los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM con autorización de su Comité de Bioética. Para los experimentos se

usaron ratones C57/6BL adultos (8 semanas) de género masculino con un peso aproximado de 25-30 g alojados en grupos de 5 individuos por jaula de piso sólido y lecho de aserrín, con ciclos de foto estimulación de 12 h, con apagado de luces 19:00 h-7:00 h, agua y alimento *ad libitum* (Envigo Teklad 2018S) y restricción de estímulos acústicos intensos como se dispone en la NOM-062-ZOO-1999.

### *Inducción del fenotipo Parkinsoniano en un modelo murino*

Con base en el protocolo descrito por [188], se administraron 4 dosis de 30 mg kg<sup>-1</sup> con intervalos de 2 h entre cada una de la neurotoxina hidrocloreuro de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Sigma Aldrich, M0896) a grupos de al menos 8 ratones. Con la dosis empleada de MPTP, se espera una muerte superior al 90% de neuronas dopaminérgicas tras la administración.

### *Pruebas de comportamiento*

La comprobación del fenotipo Parkinsoniano se realizó midiendo la actividad espontánea, así como la coordinación motora gruesa y fina en el tiempo entre los diferentes grupos de 8 individuos cada uno, con base en lo reportado por [188, 189] y como se describe a continuación.

#### *Actividad espontánea*

Se caracterizó midiendo el número de veces en que los ratones se levantaban o sentaban sobre sus patas traseras cada 3 min en un cilindro de vidrio. Abajo del cilindro se colocó un espejo en un ángulo de 45° para una mejor observación de los individuos (Fig. 7a). Entre cada prueba el cilindro se limpió con etanol al 70% (Merck, 107017) para evitar que el olor del ratón anterior interfiriera con el comportamiento.

#### *Coordinación motora gruesa*

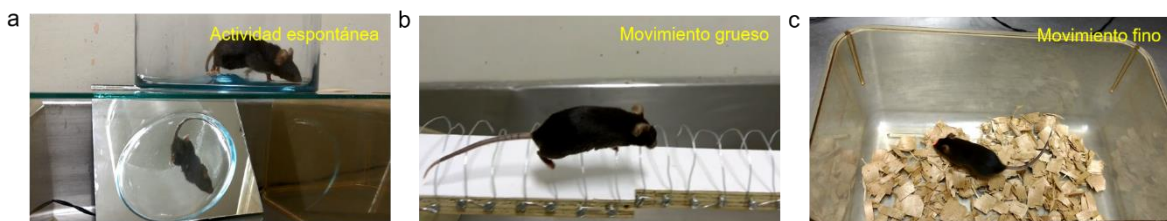
Se cuantificó el número de errores que los ratones cometían al pasar por una pista de madera con obstáculos de alambre en superficie. La pista tenía 1 m de longitud y constaba de 4 segmentos



(1-4) de anchura variable de 12, 8, 4 y 2 cm (Fig. 7b). Cada error se definió como un falso en la colocación de la pata del ratón en los alambres de la pista, o caída de ésta. Antes de cada experimento los ratones se entrenaron 3 veces para atravesar la pista, y entre cada individuo la pista se sanitizó con etanol (Merck, 107017) al 70% para evitar que el olor del ratón anterior interfiriera con el comportamiento como se sugiere en [189].

### Coordinación motora fina

Se determinó con el tiempo en que tardaba el ratón en retirarse una etiqueta pegada a su hocico (Fig. 7c).



**Figura 7.** Pruebas de comportamiento para evaluar la función sensoriomotora en un modelo murino de Parkinson. Evaluación de a) actividad espontánea mediante la prueba del cilindro, b) movimiento grueso, mediante el paso de con obstáculos de una pista de anchura progresivamente reducida y c) movimiento fino, mediante el tiempo en que tarda un ratón en retirarse una etiqueta del hocico.

### *Implantación del $\mu$ ChipVP6-Au en cerebros de ratón*

Catorce días posteriores a la administración de MPTP, se administró pentobarbital (Pisa®) en una dosis de 20 mg kg<sup>-1</sup> intramuscular como anestesia general. Las cabezas de los ratones se rasuraron y limpiaron con una solución de yodo al 10% (GERMISIN®). Los ratones se colocaron en un aparato estereotáxico para rata y ratón (Stoelting Co.), ajustando los fijadores de canal auditivo y la mandíbula.

Se incidió sobre la galea aponeurótica del ratón con una hoja de bisturí No. 10 (Carl Martin, 871B/10) de manera longitudinal. Se disectó por planos, retirando el periostio hasta hacer visible el bregma. Posteriormente se trepanó el cráneo con taladro (Mototool Mini, D 80) hasta la corteza encefálica. Se implantaron en corteza parietal derecha el  $\mu$ ChipVP6-Au o PAcVA de 2 mm<sup>2</sup>

manualmente. En los ratones del grupo control se realizó el mismo procedimiento de trepanación, pero sin implante. Se realizó la osteosíntesis del cráneo con acrílico dental (QUARZ), cubriendo el orificio de trepanación, y se suturaron los tegumentos con hilo de Nylon 6-0 (Atramat®). Tras el procedimiento quirúrgico, los animales se mantuvieron de manera individual en una caja con una lámpara radiante que les proporcionase calor.

### *Análisis tisular mediante tinción de hematoxilina-eosina*

A los cinco días post-operación, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y se realizaron cortes histológicos del sitio donde fue implantado el material. Para ello, se extrajeron los cerebros de los cadáveres, se colocaron en cajas de 12 pozos (Costar®, CLS3513-50EA) y se recubrieron con 4 mL de PBS estéril. Para fijar el tejido se retiró el PBS y se adicionaron 4 mL de formaldehído al 10% (Sigma Aldrich, 252549) y se incubó a temperatura ambiente por 24 h en oscuridad. Se realizaron deshidrataciones sucesivas adicionando etanol (Merck, 107017) al 70% por 1 h, al 80% por 1 h, al 95% por 1 h, y al 100% por 1.5 h en cantidad suficiente para cubrir el tejido. Se descartó el etanol y tres veces se adicionó xileno (Sigma Aldrich, 214736), incubando cada vez durante 1.5 h. Se colocaron los cerebros en un molde de cartón de 3 cm<sup>3</sup>, se embebieron en parafina calentada en baño María a 58-60° C y se dejaron secar por 2 h a temperatura ambiente. Los bloques se cortaron en láminas de 5 µm de espesor con un microtomo (Abatec, KD-3368AM) y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio (Fisherbrand™). Las laminillas se secaron al aire durante 30 min protegidas del polvo y se incubaron a 45° C por 12 h en un horno Luzeren® PCDE-3000.

Para remover la parafina, las laminillas se lavaron tres veces durante 10 min con xileno (Sigma Aldrich, 214736). Para rehidratar las laminillas, se adicionaron 2 veces por 3 min cada una, etanol (Merck, 107017) al 100%, al 95%, al 80% en cantidad suficiente para cubrir por completo las laminillas. Se realizaron tres lavados con agua destilada. La tinción de los tejidos se llevó a cabo adicionando hematoxilina (Sigma, H3136) por 10 min en cantidad suficiente para cubrir por completo la laminilla. Posteriormente las laminillas se lavaron 3 veces con agua de la llave, cada uno de 5 min, para que las sales del agua favorezcan el cambio de color de la hematoxilina de violeta a púrpura. Las laminillas se sumergieron rápidamente en una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 0.5% (Merck, 320331) diluido en etanol absoluto (Merck, 107017) 3 veces, para eliminar el exceso de coloración en la muestra. La muestra se neutralizó con agua destilada, mediante tres lavados de 10 min cada uno. Luego se lavaron en agua destilada 2 veces por 15 min. Posteriormente las laminillas se sumergieron en eosina al 0.2% (Merck, HT110116) por 1 min. Las laminillas se lavaron con agua destilada

nuevamente 3 veces por 15 min cada uno, se deshidrataron como se mencionó anteriormente con etanol y se trataron con xileno. Las muestras se colocaron en portaobjetos de vidrio (Corning, 12-553-464) y se les añadió medio de montaje de glicerol al 50% (Sigma, G2025). Se colocó un cubreobjetos encima (Corning, S17525B) cuidando de no dejar burbujas, las orillas se sellaron con esmalte de uñas transparente (Maybelline, Super Stay 7d). Las laminillas se dejaron secar en campana de flujo laminar y se almacenaron hasta su observación. Finalmente se tomaron micrografías con una cámara Nikon DS-Qi1Mc acoplada a un microscopio Nikon Eclipse TE300.

### *Ensayos de liberación intracraneal de L-DOPA mediante el $\mu$ ChipVP6-Au en ratones Parkinsonianos*

Grupos de 8 ratones Parkinsonianos se intervinieron quirúrgicamente para la implantación de un  $\mu$ ChipVP6-Au o PAcVA (2 mm<sup>2</sup>). Los materiales se cargaron con una única dosis de 120 mg kg<sup>-1</sup> (del peso del ratón) de L-DOPA/Carbidopa (Cloisone® Psicofarma® 250 mg/25 mg). Como control positivo se analizaron ratones a los cuales se les administró la misma dosis de fármaco vía intraperitoneal (30 mg kg<sup>-1</sup> cada dos días durante 8 días, hasta administrarse un total de 120 mg kg<sup>-1</sup>). Como blancos se consideraron tanto ratones Parkinsonianos, como ratones sanos, sin intervención quirúrgica. Como control negativo, se implantaron los materiales ( $\mu$ ChipVP6-Au o PAcVA) sin fármaco en ratones Parkinsonianos. En cada grupo se evaluó la actividad espontánea, movimiento grueso y movimiento fino, como se mencionó anteriormente.

## **Análisis de resultados**

### *Análisis de imágenes*

El análisis de imágenes se llevó a cabo con el programa ImageJ.

### *Análisis estadístico*

Todas las mediciones presentadas se expresan como el promedio  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. Los valores de significancia estadística se calcularon mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey.

## CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se sintetizaron 48 polímeros distintos entre los que destacan los derivados de ácido metacrílico, gelatina, poliacrilamida, entre otros (resultados no mostrados). En particular por su inocuidad y biodegradabilidad nos interesaron los derivados de alcohol polivinílico (PVA) el cual es un polímero sintético, biodegradable, aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para aplicaciones en la industria alimenticia y médica [191]. No obstante los hidrogeles de PVA poseen una pobre estabilidad en agua, lo que puede afectar su desempeño como material implantable [192]. Además, la alta hidrofiliidad del PVA impide la adsorción de las proteínas involucradas en la adhesión celular, por lo que las células no se adhieren. Estas características limitan el uso del PVA como andamios para la ingeniería de tejidos [193]. Para contender con estas limitaciones, el PVA se ha entrecruzado mediante diferentes metodologías físicas o químicas. A diferencia del entrecruzamiento físico, como los ciclos de congelamiento/descongelamiento, el entrecruzamiento químico permite una mayor estabilidad y flexibilidad para manipular sus propiedades [194-197]. En particular, nos interesó evaluar los productos químicamente entrecruzados de PVA con aldehídos, debido a la capacidad de éstos para unir proteínas mediante un enlace con sus grupos amino, lo que podría servir para el anclaje de la proteína VP6, como se ha visto con algunas enzimas [198-202].

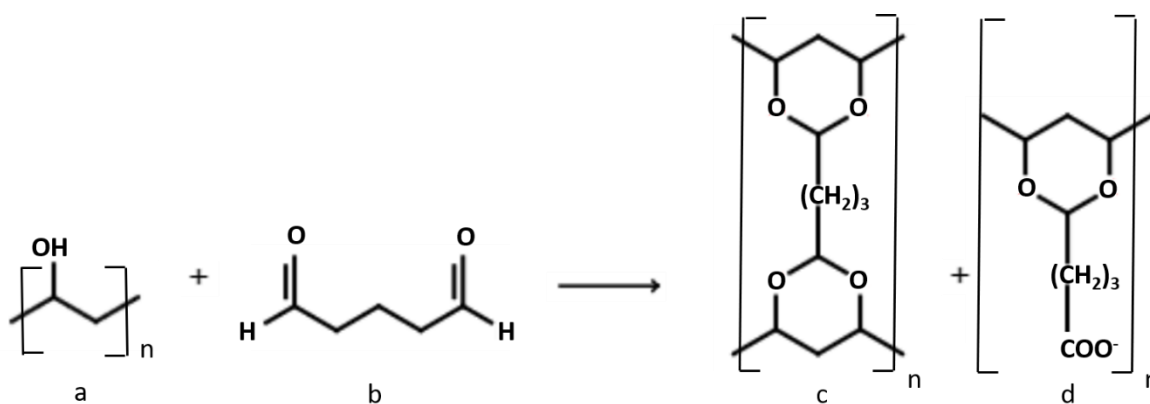
Los aldehídos que se evaluaron como agentes entrecruzantes del PVA fueron formaldehído (FA) y glutaraldehído (GA) para obtener los productos de polimerización polivinil formal (PFA) y el acetato de poli(vinil alcohol co-vinilo) (PacVA). Ambos polímeros se sintetizaron y caracterizaron en función de su grado de entrecruzamiento. El PFA resultó en un polímero blanco opaco, cuya síntesis requiere de ácido como catalizador y no permitió la proliferación celular. Por tanto, se descartó como andamio para el crecimiento celular. No obstante, el PFA resultó en un material con buenas propiedades difusivas y fue capaz de absorber metales pesados de muestras de agua contaminada del río Atoyac. Los resultados obtenidos resultaron en un artículo científico y una solicitud de patente y adjuntos en los anexos 3 y 4, respectivamente.

Por otra parte, el producto de entrecruzamiento de PVA con GA (PacVA) es un gel incoloro, transparente, suave y elástico. En la siguiente sección se describen los resultados respecto a la obtención y caracterización del PacVA.

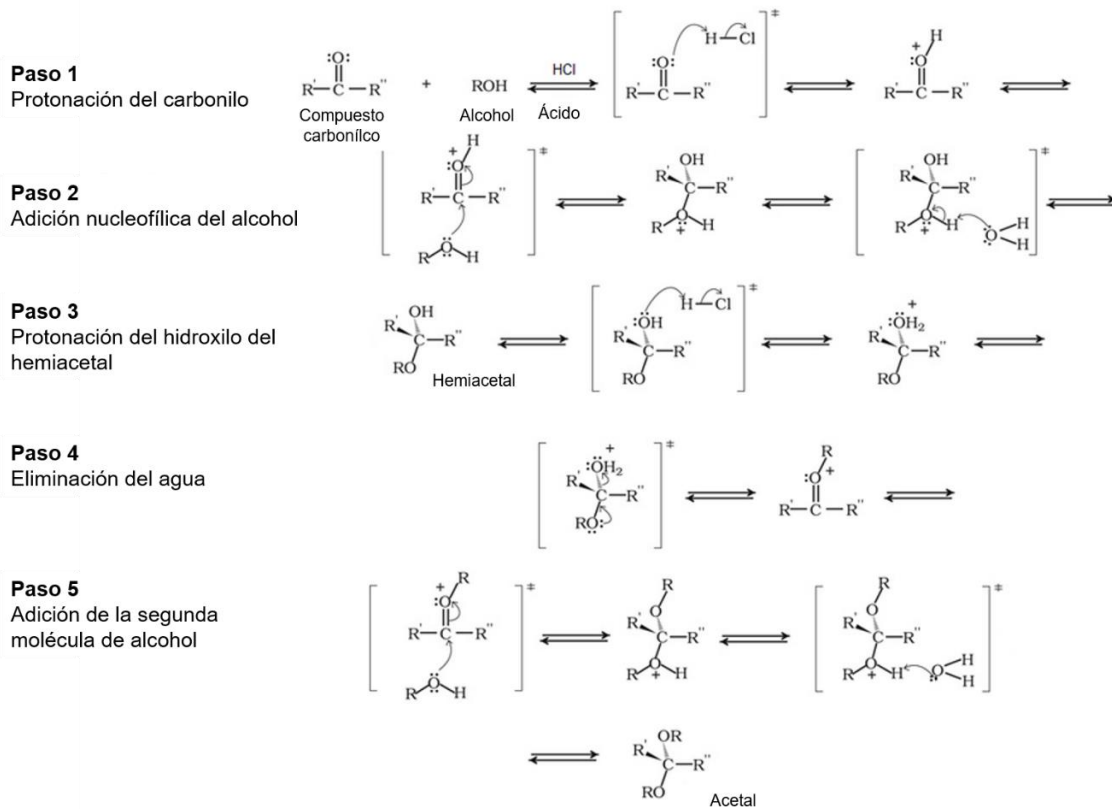
## Bloque I. Síntesis y caracterización del acetato de poli(vinil alcohol co-vinilo) (PAcVA)

La manera tradicional para entrecruzar PVA con aldehídos involucra la adición de ácidos minerales como catalizador y altas temperaturas, condiciones no compatibles para la inmovilización de sustancias lábiles. Se ha reportado que PAcVA puede sintetizarse a 55° C en ausencia de catalizador ácido [192].

En el presente trabajo se sintetizó PAcVA por primera vez en ausencia de catalizador ácido, con diferentes grados de entrecruzamiento, determinados por la cantidad de GA añadido, a una temperatura de 37° C compatible con los sistemas biológicos. La mezcla de reacción tiene un pH entre 5 y 6, por lo que el hidrogel resultante se neutralizó después de su síntesis. La reacción de entrecruzamiento del PVA con GA para obtener el PAcVA se muestra en la Fig. 1. El mecanismo de reacción descrito por Kim et al [203], consiste en la protonación del carbono aldehídico, seguido de la adición nucleofílica del alcohol para la formación del hemiacetal, y la eliminación de una molécula de agua. Posteriormente se adiciona una segunda molécula de alcohol, resultando en un acetal como producto final. El mecanismo de acción se muestra en la Fig. 2.



**Figura 1.** Síntesis de PAcVA. La figura muestra la reacción química entre alcohol polivinílico (a) y glutaraldehído (b) para formar acetato de poli(vinil alcohol co-vinilo) cuando la polimerización es completa (c) o incompleta (d).



**Figura 2.** Mecanismo de reacci\u00f3n para la s\u00edntesis de acetales como producto de reacci\u00f3n de un aldeh\u00eddo con un alcohol en medio \u00e1cido.

## Caracterizaci\u00f3n estructural del PACVA

### FTIR

Para corroborar la estructura esperada, tanto los reactantes como el producto de reacci\u00f3n se analizaron por FTIR (Fig. 3) como se describe en [183]. En la Fig 3a se comparan los espectros de PVA, GA y el producto obtenido. Dado que el espectro del material sintetizado es diferente al de los reactantes, se asume que hubo reacci\u00f3n qu\u00edmica al formarse nuevos grupos funcionales. Pueden notarse, por ejemplo, una banda a  $1710\text{ cm}^{-1}$  y otra a  $1087\text{ cm}^{-1}$  que representa el pico vibracional del carbonilo (C=O) y el acetal (-C-O-C), respectivamente. La banda debida al estiramiento del -C-O-C se desplaza a frecuencias m\u00e1s altas en el pol\u00edmero, lo que indica la formaci\u00f3n de grupos acetales y \u00e9ter (R-O-R). El espectro obtenido fue similar al reportado por [183], indicando que la s\u00edntesis fue exitosa bajo nuestras condiciones experimentales. En la Fig. 3b se comparan los espectros de PACVA sintetizados con distintas cantidades de GA donde se distinguen cuatro bandas principales. La

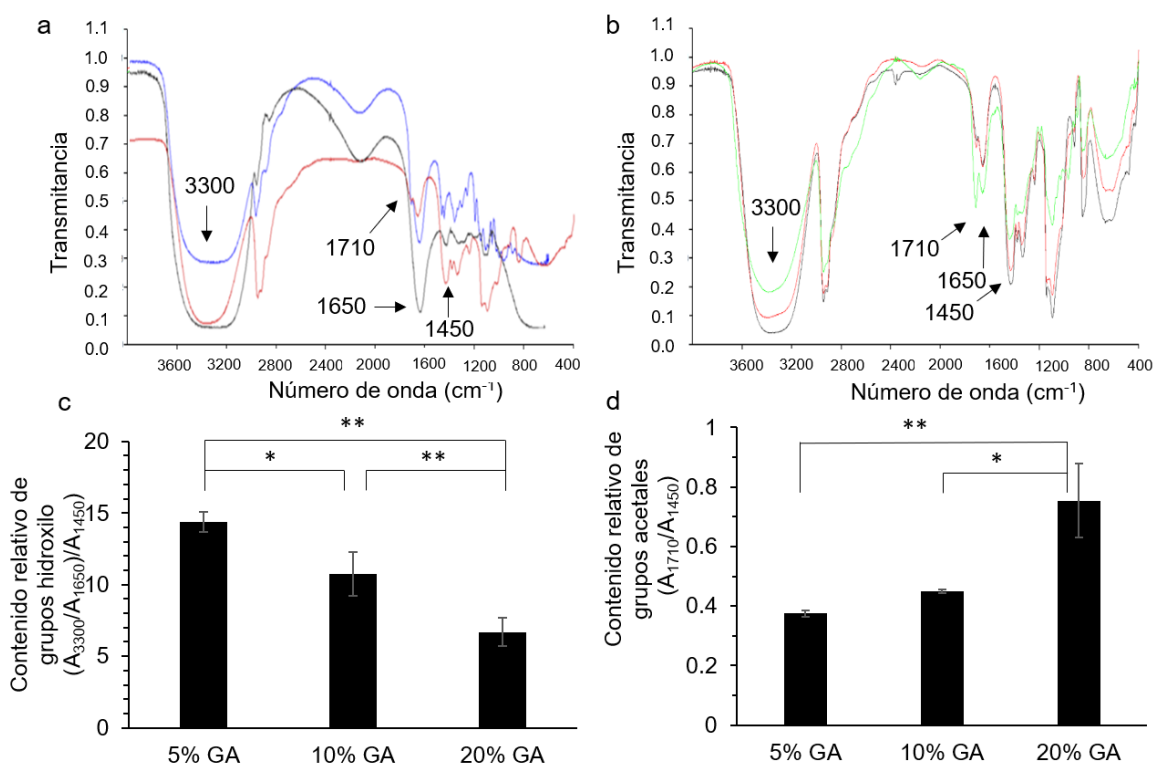
primera, a  $3300\text{ cm}^{-1}$ , corresponde a la vibración de los grupos hidroxilo ( $-\text{OH}$ ). La segunda, a  $1710\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al estiramiento de grupo carbonilo ( $-\text{C}=\text{O}$ ). La tercera a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , se atribuye a la vibración tipo tijera del  $-\text{OH}$  del agua [203-204]. Y la cuarta, a  $1450\text{ cm}^{-1}$ , se asocia a los grupos metileno ( $-\text{CH}_2$ ) que se ha reportado permanecen constantes a varios grados de entrecruzamiento [183].

Las Ec. 1 y Ec. 2 se usaron para determinar el grado de entrecruzamiento de PAcVA dado por el diferente contenido de GA, esperando una reducción del contenido de grupos hidroxilo del PVA y un incremento de los puentes de acetal cuando ocurre el entrecruzamiento. Los resultados se muestran en las Figs. 3c y 3d. Notar que el cálculo de la abundancia relativa de los grupos hidroxilo fue diferente al empleado por [183], quienes usaron la razón entre  $A_{3300}/A_{1450}$ , que corresponde a los grupos hidroxilo y metileno, respectivamente. Se decidió no usar esta razón porque los hidroxilos del alcohol y los del agua son indistinguibles a  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Por lo tanto, para cuantificar solo los hidroxilos del alcohol, la banda del hidroxilo se normalizó con la banda del agua a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , y luego con la banda a  $1450\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a los grupos metileno que permanecen constantes. De esta manera se estimó la concentración relativa de los grupos hidroxilo del PVA que no reaccionan con el GA. Se observó un incremento en la abundancia relativa de los puentes acetales y un decremento de los grupos hidroxilo conforme se incrementaba la cantidad de GA añadido, lo que indica que el entrecruzamiento aumenta con la concentración de GA. Estos resultados demuestran que es posible modular el grado de entrecruzamiento variando la cantidad de GA, siempre que éste se mantenga como reactivo limitante. Asimismo, se demuestra que PAcVA puede sintetizarse a  $37^\circ\text{ C}$  en ausencia de catalizador ácido, condiciones que son compatibles con los sistemas biológicos.

### Microscopía (SEM y AFM)

Para caracterizar la estructura microscópica del material sintetizado se utilizó AFM y SEM (Fig. 4). Interesantemente, se observó que la cantidad de GA añadido cambia la estructura microscópica de PAcVA (Fig. 4). A 5% GA, se observaron espacios vacíos entre la estructura amorfa de PAcVA (Fig. 4a), mientras que a 10% GA se observaron nanofibras altamente ordenadas (Fig. 4b). En contraste, PAcVA con el más alto contenido de GA (20%) resultó en una fase polimérica homogénea (Fig. 4c) Las imágenes de AFM de alta resolución mostraron la presencia de poros de entre  $0.8$  y  $1.5\text{ }\mu\text{m}$  de diámetro en la superficie de PAcVA deshidratado (10% GA) (Fig. 3d y 3e). Las importantes diferencias en la estructura de los hidrogeles sintetizados con varios contenidos de GA

se deben probablemente a las diferentes densidades de entrecruzamiento como previamente fue observado por [206].



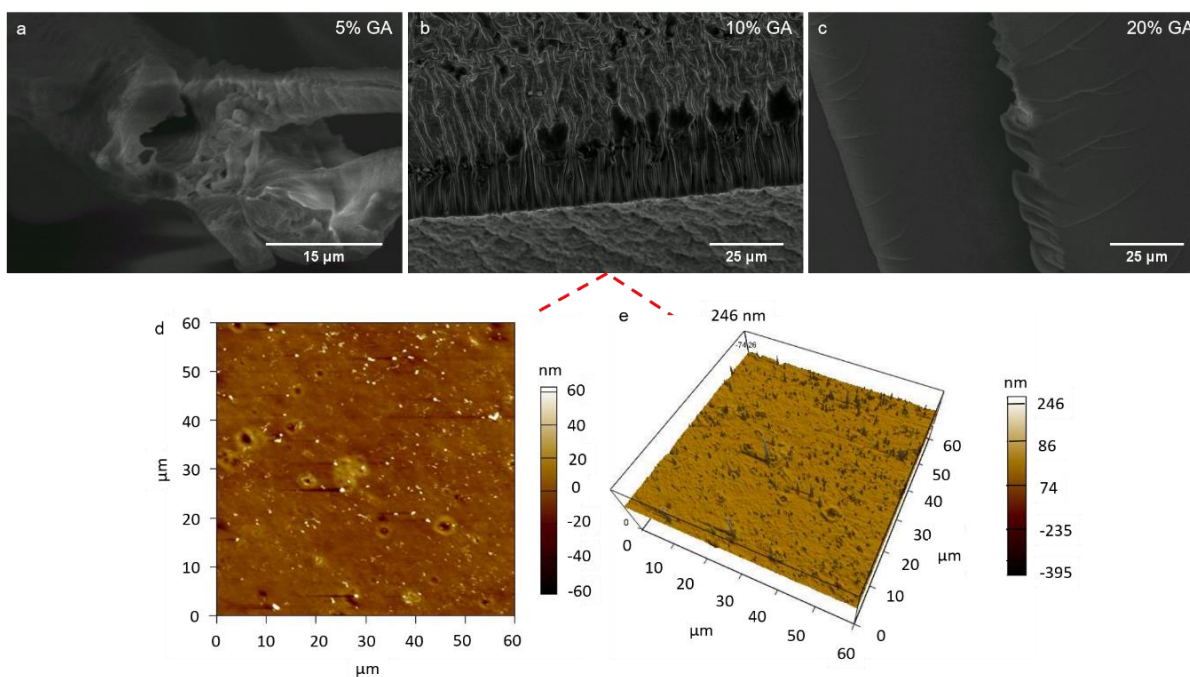
### *Propiedades mecánicas del PACVA*

#### Compresión uniaxial

Una de las principales limitantes del uso de hidrogeles en la ingeniería de tejidos son sus pobres propiedades mecánicas [207]. Los materiales implantables están sujetos a múltiples deformaciones en el organismo. Las propiedades mecánicas “adecuadas” de los materiales deberían mimetizar las del tejido diana para facilitar su integración y serán un factor determinante para su



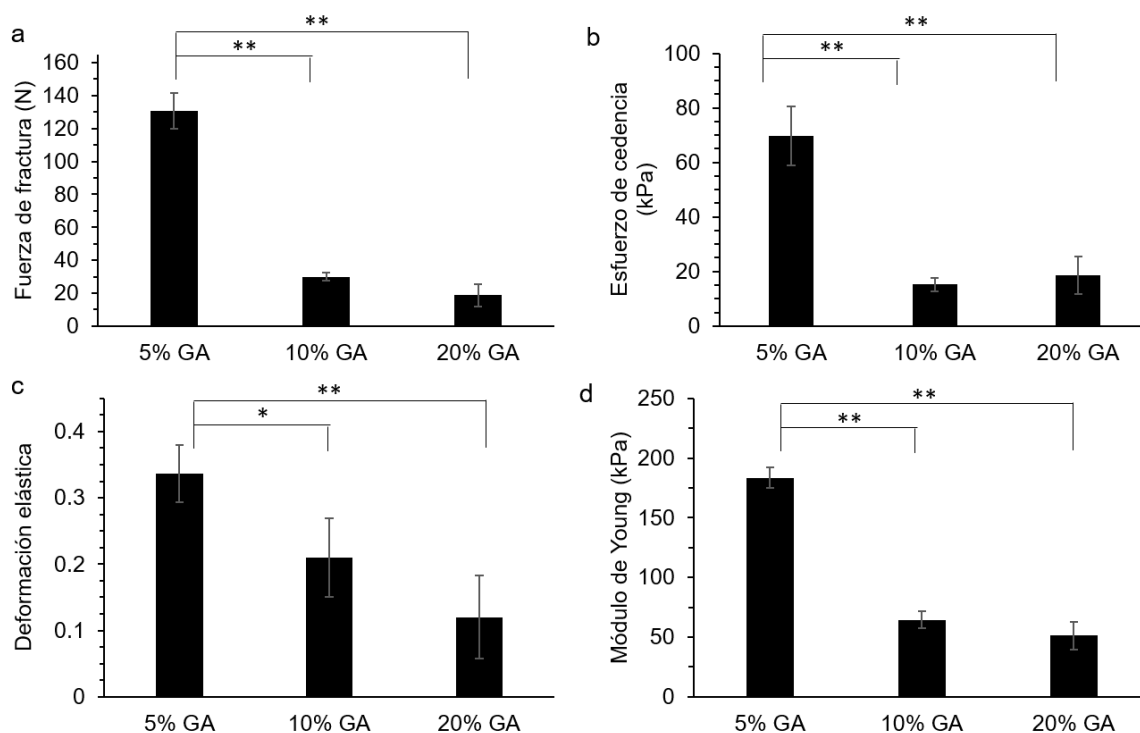
funcionabilidad [208]. Por tanto, un diseño racional de materiales para la ingeniería de tejidos debería considerar propiedades tales como la fuerza de fractura, que indica la fuerza que el material resiste antes de romperse y el esfuerzo de cedencia que determina el esfuerzo que provocaría una deformación permanente en el material; así como la elasticidad y el módulo de Young que determinarán la capacidad de difusión de moléculas a través de la red elástica del hidrogel, lo cual es relevante para la liberación de fármacos [207, 209-210].



**Figura 4.** Imágenes SEM y AFM de películas de PACVA deshidratadas. La figura muestra que la red polimérica de PACVA se vuelve más intrincada a medida que se incrementa el contenido de GA. SEM de secciones transversales de PACVA con diferente grado de entrecruzamiento según el contenido de GA a) 5%, b) 10%, c) 20%. d) y e) Imágenes de AFM de alta resolución de PACVA (10% de GA) que muestran poros distribuidos regularmente en la superficie del hidrogel. La barra con código de color a la derecha indica la profundidad del área analizada.

Se evaluaron las propiedades mecánicas de PACVA a diferentes grados de entrecruzamiento (Fig. 5). Contrario a lo esperado, se observó que un incremento en el contenido de GA en el hidrogel dramáticamente redujo la fuerza de fractura (Fig. 5a), el esfuerzo de cedencia (Fig. 5b), la elasticidad (Fig. 5c) y el módulo de Young (Fig. 5d). Estos resultados pueden atribuirse probablemente a la reducción del número de grupos hidroxilo y consecuentemente a un decremento en los puentes de hidrógeno que frecuentemente se asocian con la dureza de un material [211-212]. Por otra parte, la

menor elasticidad y el módulo de Young a menor contenido de GA probablemente son causados por una restricción en la movilidad de las cadenas de PVA. Estos resultados demuestran que variando el contenido de GA es una manera simple de modular las propiedades mecánicas de PAcVA para obtener materiales con propiedades mecánicas adaptables al tejido diana. Por ejemplo, el módulo de Young de PAcVA con 10% GA y 20% GA están en el mismo orden de magnitud que el módulo de Young de algunos tejidos blandos reportados en la literatura como el tejido, antebrazo dorsal y palma de la mano [211-214].



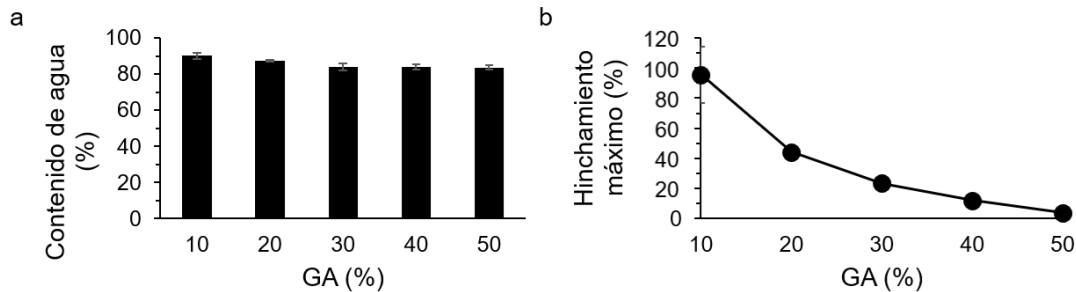
**Figura 5.** Propiedades mecánicas del PAcVA hidratado de tres grados de entrecruzamiento. La dureza y elasticidad del PAcVA disminuyen a medida que se incrementa el contenido de GA. a) Fuerza de fractura. b) Esfuerzo de cedencia. c) Deformación elástica. d) Módulo de Young. (n = 3). Las barras de error representan la desviación estándar (\*) p < 0.05, (\*\*) p < 0.01.

### Contenido de agua y dinámica de hinchamiento

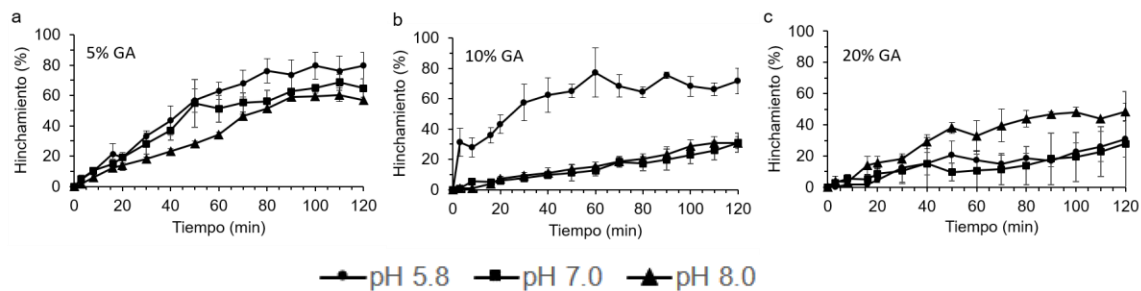
Los hidrogeles son los materiales más empleados en la ingeniería de tejidos. Se definen como redes poliméricas tridimensionales hidrofílicas capaces de absorber grandes cantidades de agua a semejanza de los tejidos biológicos [215]. Con base en ello, se determinó el contenido de agua del PAcVA como función del contenido de GA (Fig. 6). Independientemente del contenido de GA (10%–

50%), PAcVA tuvo un contenido de agua superior al 80% (Fig. 6a) muy semejante al de los tejidos blandos y que es el doble del hidrogel poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA) que contiene entre 38 – 40% de agua completamente hidratado [216-217]. Por otro lado, el hinchamiento del hidrogel medido como la ganancia de agua en el equilibrio es inversamente proporcional al contenido de GA (Fig. 6b). Estos resultados demuestran que los grados de entrecruzamiento no impactan significativamente en el contenido de agua, sin embargo, la movilidad de las cadenas poliméricas si se restringe de manera proporcional al entrecruzamiento

El estudio de las propiedades mecánicas de los polímeros es importante para la predicción y entendimiento de la liberación de fármacos. Por ello, se estudió la dinámica de hinchamiento de PAcVA como función del grado de entrecruzamiento y pH manteniendo la fuerza iónica constante. En la Fig. 7 se muestra el que el grado de hinchamiento de la red polimérica, medido como la cantidad de amortiguador absorbido en función del pH y del grado de entrecruzamiento. La influencia del pH fue mayor para el entrecruzamiento con 10% GA que con el del 5% GA y 20% GA. El mayor hinchamiento de PAcVA se observó a pH 5.8, que coincide con el pH de los tejidos tumorales, resultado de la glicólisis anaerobia [217] por lo que PAcVA podría ser un buen candidato para la liberación de fármacos en terapias anti-cáncer. A pH 8 se observó una notable reducción del grado de hinchamiento para ambas concentraciones de GA. El menor hinchamiento se observó a 20% GA, donde a pH<8 el hinchamiento se redujo aún más. Los cambios en el grado de hinchamiento pueden atribuirse probablemente a la desprotonación de los grupos ácido carboxílico cuando la polimerización no está completa (Fig. 1, molécula d). De esta manera, las cadenas cargadas negativamente se repelen y aumenta el hinchamiento. O bien, el menor hinchamiento a 20% GA puede ser resultado de la estructura de red más compacta observada en SEM (Fig. 4c), lo cual causa un “efecto de ocultamiento” como se reporta en [218], donde los monómeros remanentes de PVA interactúan entre sí reduciendo el hinchamiento. Debe considerarse, no obstante, que las imágenes de SEM se obtuvieron con hidrogeles deshidratados, y la estructura del hidrogel hidratado puede diferir. Estos resultados demuestran que PAcVA se comporta como un hidrogel inteligente, ya que responde a estímulos externos como el pH lo que podría aprovecharse para la liberación controlada de fármacos.



**Figura 6.** Contenido de agua e hinchamiento máximo de películas de PACVA en presencia de agua desionizada con diferente contenido de GA. La figura muestra a independientemente del contenido de GA, PACVA posee más del 80% de agua y que su hinchamiento es inversamente proporcional al contenido de GA. Los experimentos se llevaron a temperatura ambiente y pH 6. (n = 10). Las barras de error representan la desviación estándar. En algunos casos éstas pueden ser menores a la viñeta.

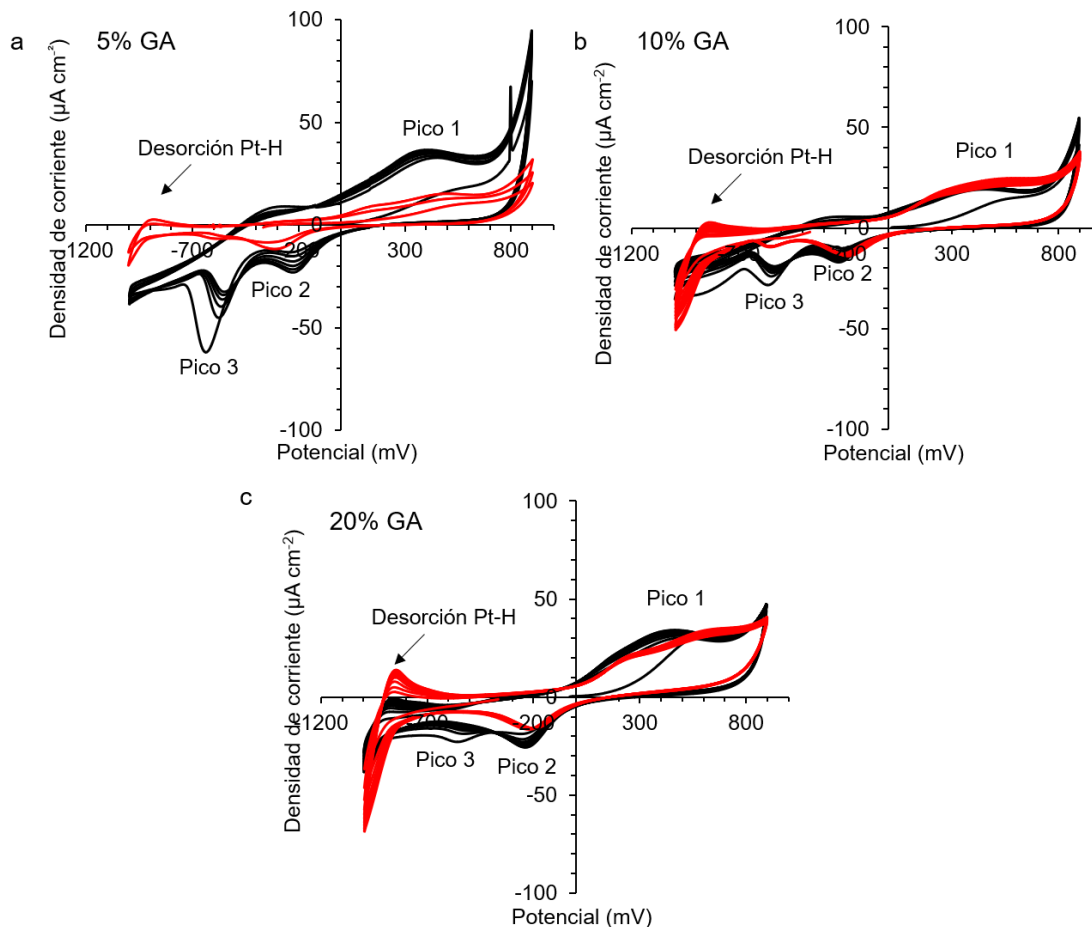


**Figura 7.** Dinámica de hinchamiento de PACVA a diferentes grados de entrecruzamiento a) 5%, b) 10%, c) 20% de GA y diferente pH. La figura muestra que el hidrogel es un material inteligente cuya dinámica de hinchamiento depende tanto de su grado de entrecruzamiento, como del pH del medio. La influencia del pH fue mayor para el entrecruzamiento con 10% GA que con el del 5% GA y 20% GA. El menor hinchamiento se observó a 20% GA. El mayor hinchamiento de PACVA se observa a pH 5.8, mientras que a pH 8 se observa una notable reducción del grado de hinchamiento para ambas concentraciones de GA. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (n = 3). Las barras de error representan la desviación estándar, y en algunos casos éstas pueden ser más pequeñas que la viñeta.

### Voltametría cíclica (CV)

Los polímeros electroactivos son de particular interés para la ingeniería de tejidos debido a que permiten la liberación controlada de fármacos mediante estímulos electroquímicos o estimulación eléctrica celular [12]. La CV provee información acerca de las reacciones redox intrínsecas de un material, al variar de manera cíclica el potencial del electrodo que puede relacionarse con la difusión iónica del material. El voltamograma cíclico es un gráfico de corriente contra un voltaje aplicado al electrodo de trabajo en comparación con el electrodo de referencia [219].

La Fig. 8 muestra la caracterización electroquímica de PAcVA a tres grados de entrecruzamiento (5%, 10% y 20% GA) y a dos estados de hidratación. El primer estado de hidratación se muestra en negro y corresponde al voltamograma obtenido inmediatamente después de que PAcVA se sumergió en la solución electrolítica. El segundo estado se muestra en rojo y corresponde al voltamograma obtenido cuando PAcVA se hidrató completamente tras 6 h de inmersión en la solución electrolítica. Al menos 5 ciclos se efectuaron para cada material. En el estado de hidratación parcial, PAcVA mostró un pico anódico a 400 mV, asociado a un proceso de reducción del hidrogel (pico 1), y dos picos catódicos a -200 mV (pico 2) y -500 mV (pico 3), asociado a dos procesos de oxidación del hidrogel. En contraste cuando PAcVA se hidrató completamente, el pico 3 disminuyó y un nuevo pico apareció a -900 mV. El pico a -900 mV es característico de la desorción Pt-H del electrodo de Pt [220], y su aparición muestra que PAcVA permite la difusión iónica a través de su red al estar hidratado. Asimismo, el comportamiento electroquímico varió en función del grado de entrecruzamiento del hidrogel. La intensidad del pico catódico (pico 1) fue menor a 10% GA que a 5% GA, lo que sugiere que a mayor grado de entrecruzamiento se reduce la difusión iónica. Asimismo, la intensidad del pico 3 (oxidación) disminuye a medida que se incrementa el entrecruzamiento, probablemente debido a un mayor contenido de puentes acetales (Fig. 3d), los cuales tienen una menor respuesta redox. Estos resultados muestran que el PAcVA es un material inteligente electro-responsivo cuya difusión iónica puede modular variando el contenido de GA. Esto es una ventaja práctica para un material candidato para la ingeniería de tejidos, ya que se requiere el movimiento de iones para la comunicación intercelular, además de los efectos de la estimulación eléctrica en la modulación de fenotipo celular [222-223]. Y además que PAcVA posee propiedades que pueden modularse fácilmente para la liberación controlada de sustancias.

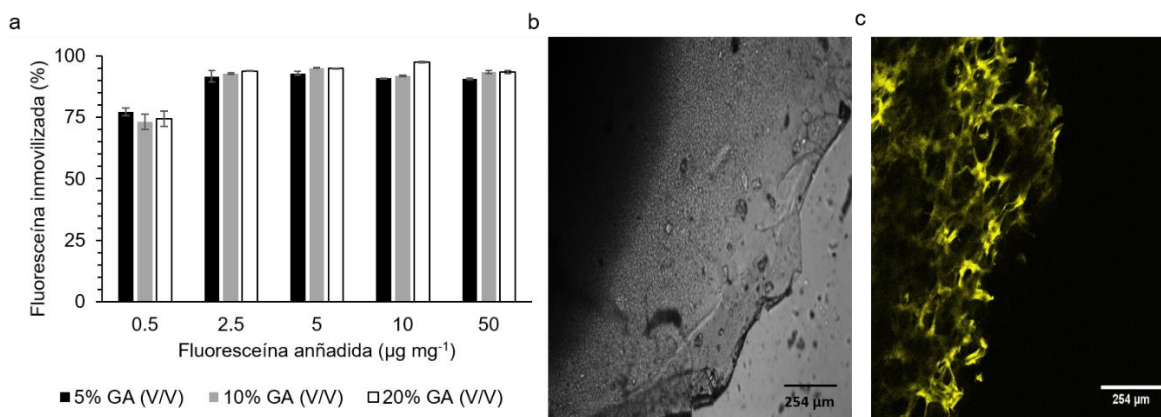


**Figura 8.** Voltamogramas cíclicos del PACVA parcialmente (negro) y completamente (rojo) hidratado con diferentes grados de entrecruzamiento. La figura muestra que PACVA es un material electro-responsivo cuya difusión iónica puede modular variando el contenido de GA. a) 5%, b) 10% y c) 20% de GA. Se realizaron al menos 5 ciclos para cada condición.

### *Liberación de una molécula modelo*

Como molécula modelo se utilizó fluoresceína para caracterizar la absorción y liberación controlada de películas de PACVA. Experimentos similares se realizaron con gentamicina y heparina, obteniendo resultados similares (datos no mostrados). Se observó que la fracción de fluoresceína inmovilizada fue independiente del grado de entrecruzamiento (Fig. 9a), indicando ausencia de sinéresis (líquido expelido del hidrogel) incluso en la condición de mayor entrecruzamiento. La menor cantidad de fluoresceína ( $0.5 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) resultó en una menor eficiencia de inmovilización de la molécula (menos del 80%), mientras que, a mayores concentraciones de fluoresceína, la eficiencia

fue superior al 90%. Las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de PAcVA (Fig. 9b y 9c) mostraron que la fluoresceína se distribuyó homogéneamente en la red de fibras poliméricas de PAcVA previamente observadas por SEM (Fig. 4b).



**Figura 9.** Inmovilización de fluoresceína en películas de PAcVA. La figura muestra que la cantidad de fluoresceína inmovilizada fue independiente del grado de entrecruzamiento y su distribución fue homogénea a lo largo de la red polimérica. a) Fracción relativa de fluoresceína inmovilizada en PAcVA a diferentes grados de entrecruzamiento. (n = 3). Las barras de error indican la desviación estándar entre experimentos. Micrografía de b) de campo claro (60X) y c) confocal de fluorescencia de películas de PAcVA con fluoresceína inmovilizada.

Una característica importante que considerar en el diseño de materiales para la ingeniería de tejidos es su capacidad para controlar la dosis de fármaco liberada en el tiempo con el fin de poder personalizar los materiales de acuerdo con las necesidades específicas de cada paciente. Por ello, se estudió la cinética de liberación de fluoresceína como función del grado de entrecruzamiento (Fig. 10a). Los resultados muestran que la cantidad de fluoresceína liberada fue inversamente proporcional al grado de entrecruzamiento. La liberación máxima de fluoresceína se observó a 5% GA, seguido de 10% y 20% GA, lo cual es consistente con [224], quienes reportan que existe un menor “atrapamiento” físico de un fármaco en las redes poliméricas más abiertas. Además, probablemente un efecto combinado del impedimento estérico en la red y la resistencia de fricción de la matriz PAcVA (Fig. 4) podría explicar por qué una mayor cantidad de fluoresceína permaneció atrapada en PAcVA a 20% GA. Se realizaron experimentos de liberación de fluoresceína variando la temperatura, y se observó que la velocidad de liberación de fluoresceína fue proporcional a la temperatura, como puede predecirse con base en la ecuación de Arrhenius (datos no mostrados).

Para describir la cinética de la liberación de fluoresceína de hidrogeles, se han utilizado varios modelos matemáticos [226-227]. La mayoría de los sistemas de liberación de fármacos pueden

describirse mediante cinéticas de orden cero o de primer orden (tabla II). El modelo de Higuchi y el modelo de Korsmeier-Peppas representan una cinética de primer orden [228-230].

**Tabla II.** Modelos de liberación de fármacos comúnmente usados.

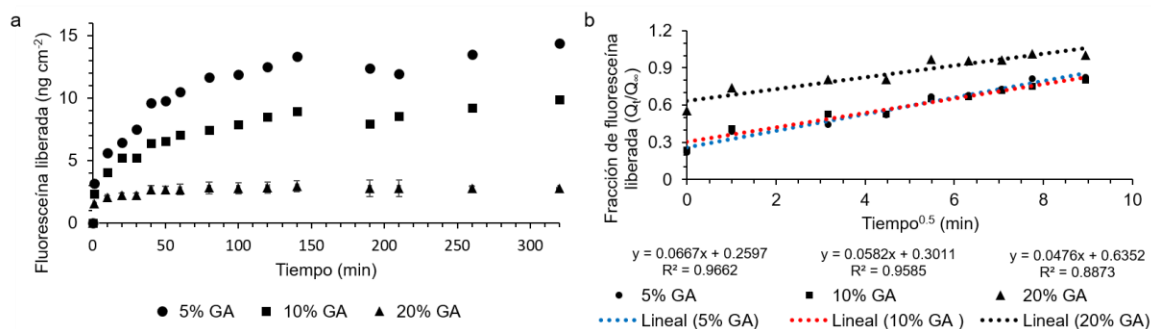
Modelo cinético	Ecuación	Comentarios
Orden cero	$Q_t = Q_0 + K_0 t$	La velocidad de liberación de un fármaco es constante e independiente de la concentración del fármaco.
Primer orden	$\text{Log} Q_t = \text{Log} Q_0 - K_0 t$	La velocidad de liberación de un fármaco es proporcional a la concentración de éste.
Higuchi	$Q_t = K_0 t^{1/2}$	Describe una difusión clásica a tiempos tempranos.
Korsmeier-Peppas	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_0 t^n$	Es útil para para entender el mecanismo de difusión de un fármaco, dependiente de exponente $n$ .

$Q_t$ : cantidad de fármaco liberado al tiempo  $t$ ;  $Q_0$ : cantidad de fármaco liberado al tiempo cero;  $Q_\infty$ : cantidad de fármaco liberado en el equilibrio;  $t$ : tiempo;  $K_0$ : constante cinética;  $n$ : exponente cinético relacionado al mecanismo de difusión del fármaco.

Los datos experimentales obtenidos de la liberación de fluoresceína se evaluaron hasta los 100 min, cuando se alcanzó el equilibrio y se ajustaron a los modelos enlistados en la tabla II. Las constantes cinéticas y se compararon los coeficientes de Pearson. Los resultados se muestran en la tabla III. El ajuste al modelo de Korsmeier-Peppas provee información acerca del mecanismo de liberación de fluoresceína. El valor de  $n$  describe el mecanismo de transporte (tabla III). De acuerdo con [231], el valor de  $n$  depende del mecanismo general de difusión. Un valor de  $n = 0.5$  se obtiene cuando la difusión es Fickiana (correspondiente al modelo de Higuchi),  $0.5 < n < 1$  corresponde a una difusión anómala (difusión no Fickiana), un valor de  $n = 1.0$  se obtiene para un caso de transporte tipo II y un valor de  $n > 1$  se obtiene para un transporte super caso II. Con base en los coeficientes de correlación de Pearson, el mejor ajuste para la liberación de fluoresceína de PAcVA con 5% y 10% GA se obtuvo con el modelo de Higuchi, el cual es equivalente al modelo de Korsmeier-Peppas para  $n = 0.5$  (tabla III, Fig. 10b), lo que indica un mecanismo de difusión tipo Fickiano. Sin embargo,



ninguno de los valores de  $n$  propuestos por Ritger y Peppas [231] se ajustaron para PAcVA con 20% GA. En este caso el mejor ajuste se obtuvo para un valor de  $n$  de 0.33, el cual es un caso no considerado en el modelo.



**Figura 10.** Liberación de fluoresceína del PAcVA como función del grado del entrecruzamiento. La figura muestra que la velocidad de liberación de fluoresceína es inversamente proporcional al contenido de GA y que para el caso de 5% y 10% de GA la difusión es Fickiana. a) Cinética de liberación de fluoresceína liberada de PAcVA a diferentes grados de entrecruzamiento. Las gráficas muestran los promedios de tres experimentos individuales. Las barras de error indican la desviación estándar entre los experimentos y en algunos casos, éstas son menores a las viñetas. b) Promedio normalizados y ajustados al modelo de Korsmeyer-Peppas para  $n = 0.5$ . Se muestran la correlación obtenida y los coeficientes de correlación de Pearson ( $R^2$ ).

La diferencia estructural observada por SEM (Fig. 4a-c) entre PAcVA sintetizado con diferente contenido de GA puede explicar por qué el mecanismo de difusión observado en PAcVA a 20% GA fue diferente. El PAcVA con 20% GA es un polímero homogéneo (Fig. 4c), sin poros visibles. Tal estructura compacta puede ocasionar interacciones con la fluoresceína no consideradas en el modelo de Korsmeyer-Peppas. Es posible que la difusión de fluoresceína a través de PAcVA con 20% GA sea un proceso más complejo, el cual no puede describirse sólo en términos de porosidad y tortuosidad. Cabe resaltar que es la primera vez que la estructura macromolecular de PAcVA se ha reportado como función del contenido de GA y se correlaciona con sus propiedades difusivas. El mecanismo de difusión de esta condición queda por investigar.

En la tabla III se reportan también los valores de la difusividad efectiva de fluoresceína a través de la red polimérica de PAcVA a diferentes grados de entrecruzamiento. La difusividad efectiva se define como el parámetro que cuantifica la transferencia de materia en las reacciones fluido-sólido no catalíticas, englobando todos los procesos difusionales que se producen en el sistema.

La ecuación general de transporte de masa expresada en coordenadas cilíndricas es:

$$D_{eff} \left( \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} r \frac{\partial x}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 x}{\partial \phi^2} + \frac{\partial^2 x}{\partial z^2} \right) = \frac{\partial x}{\partial t} \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde: X = concentración de fluoresceína en el polímero ( $\text{g cm}^{-3}$ ), z = coordenada vertical (cm), r = coordenada radial (cm),  $\phi$  = coordenada angular (rad) y  $D_{eff}$  = difusividad efectiva ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )

Para el desarrollo de una ecuación que describiera la difusividad efectiva en nuestro sistema se hicieron las siguientes consideraciones: 1) No hay momento o transferencia de calor. 2) Sólo hay transferencia de masa por difusión (no hay convección). 3) No hay cambios en el volumen durante la transferencia. 4) No hay reacción química durante la liberación de fluoresceína. 5) El transporte de masa ocurre solo en el eje "z". 6) No hay resistencia interfacial y 7) El polímero tiene una geometría de placa plana.

$$D_{eff} \frac{\partial^2 x}{\partial z^2} = \frac{\partial x}{\partial t} \quad (\text{Ec. 10})$$

Con estas suposiciones, se obtienen las siguientes condiciones de frontera (B.C., por sus siglas en inglés de "Boundary Conditions") y la condición inicial (I.C):

$$z = 0; \quad -D_{eff} A \frac{\partial x}{\partial z} = 0 \quad (\text{B.C. 1}); \quad z = L; \quad x = x_e \quad (\text{B.C. 2})$$

$$t = 0; \quad x = x_0 \quad (\text{I.C})$$

Donde: L = Altura del polímero (cm),  $X_0$  = Concentración de fluoresceína al tiempo cero ( $\text{g cm}^{-3}$ ),  $X_e$  = Concentración de fluoresceína en el equilibrio ( $\text{g cm}^{-3}$ ) y A = Área de transferencia ( $\text{cm}^2$ )

Usando términos adimensionales como:

$$\theta \equiv \frac{x-x_0}{x_e-x_0} \quad \text{and} \quad \varepsilon \equiv \frac{z}{L}, \quad \tau = \frac{t D_{eff}}{L^2}$$

en la Ec. 10 para obtener:

$$\frac{\partial^2 \theta}{\partial \varepsilon^2} = \frac{\partial \theta}{\partial \tau} \quad (\text{Ec. 11})$$

La Ec. 11 es la misma que la Ec. 10, pero con términos adimensionales.

Por lo tanto, las condiciones de frontera adimensionales y la condición inicial:

$$\varepsilon = 0; \quad \frac{\partial \theta}{\partial \varepsilon} = 0 \text{ (B.C. 1); } \varepsilon = 1; \quad \theta = 1 \text{ (B.C. 2)}$$

$$\tau = 0; \quad \theta = 0 \text{ (I.C)}$$

De acuerdo con la siguiente definición para la transformada de Laplace:

$$\theta \xrightarrow{\mathcal{L}} u$$

$$\varepsilon \xrightarrow{\mathcal{L}} \varepsilon$$

$$\tau \xrightarrow{\mathcal{L}} s$$

Donde:  $\mathcal{L} \equiv$  Operador de la transformada de Laplace.

Aplicando la transformada de Laplace en la ecuación adimensional (Ec. 11) y usando la condición inicial, para obtener:

$$\frac{d^2 u}{d \varepsilon^2} - s u = 0 \text{ (Ec. 12)}$$

$$\varepsilon = 0; \quad \frac{\partial u}{\partial \varepsilon} = 0 \text{ (B.C. 1); } \varepsilon = 1; \quad \theta = \frac{1}{s} \text{ (B.C. 2)}$$

Resolviendo la ecuación diferencial ordinaria homogénea utilizando las condiciones de frontera, se obtiene:

$$u(s) = \frac{\cosh(\sqrt{s}\varepsilon)}{s \cosh(\sqrt{s})} \text{ (Ec. 13)}$$

Aplicando la transformada inversa a la Ec. 13 se obtiene el perfil de concentración de la fluoresceína en cada instante y en cada posición.

$$x(z, t) = x_e + \frac{4(x_e - x_0)}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n-1} e^{-\frac{(2n-1)^2 \pi^2 t D_{eff}}{4L^2}} \cos\left(\frac{(2n-1)\pi z}{2L}\right) \text{ (Ec. 14)}$$

Integrando la Ec. 14, para obtener la concentración promedio en el polímero en el tiempo:

$$\bar{x}(t) = x_e + \frac{8(x_0 - x_e)}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^2} e^{-\frac{(2n-1)^2 \pi^2 t D_{eff}}{4L^2}} \text{ (Ec. 7)}$$

Donde:  $\bar{x}(t)$  es la concentración de fluoresceína en el polímero en el tiempo  $t$ ,  $x_0$  es la concentración de fluoresceína en el tiempo cero,  $x_e$  la concentración de fluoresceína en el hidrogel en el equilibrio,  $D_{eff}$  es difusividad efectiva y  $L$  es el espesor del material.

Los valores obtenidos de difusividad efectiva a partir de la Ec. 7 se listan en la tabla III. De acuerdo con nuestros resultados, la menor difusividad efectiva se observó a 10% GA, la cual fue cuatro veces menor que a 5% GA. Se han reportado valores similares de difusividad efectiva de moléculas de tamaño comparable a la fluoresceína obtenidos en condiciones similares, como por ejemplo efedrina-HCl liberada del copolímero hidroxietil metacrilato/ácido metacrílico entrecruzado con dimetacrilato de etilenglicol, que tuvo un coeficiente de difusión de  $1.20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [232]. La difusividad efectiva calculada a 20% GA varió ampliamente, y no fue posible concluir si el entrecruzamiento tuvo un efecto en esta condición.

La difusión “anormal” observada a 20% GA posiblemente se debe a que existen interacciones entre la fluoresceína y la red macromolecular formada a 20% GA (Fig. 4c), no consideradas en la Ec.7. Además, el menor hinchamiento observado en las Fig. 6 y Fig. 7, posiblemente puede atribuirse al “efecto de ocultamiento” que se refiere a que hay una menor difusividad cuando existen residuos monoméricos en una red macromolecular los cuales afectan la cinética de liberación. Se requiere un estudio más detallado para correlacionar la estructura macromolecular de PAcVA en función del contenido de GA y su impacto en la difusión para el diseño racional de sistemas de administración de fármacos precisos y eficaces para aplicaciones clínicas.

**Tabla III.** Parámetros cinéticos de la liberación de fluoresceína de PAcVA a tres diferentes grados de entrecruzamiento. Todos los experimentos se efectuaron a temperatura ambiente y pH 7.0.

Contenido de GA (%)	Difusividad efectiva ( $\times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	Orden cero		Primer orden		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
		K	R <sup>2</sup>	K $\times 10^{-3}$	R <sup>2</sup>	K $\times 10^{-3}$	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>
		(ng mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )		(min <sup>-1</sup> )		(min <sup>0.5</sup> )		n=0.50	n=0.75	n=1.00
5	6.39 ± 0.48	14.6 ± 1.72	0.85 ± 0.03	4.13 ± 0.33	0.72 ± 0.05	184 ± 19	0.95 ± 0.01	0.95 ± 0.01	0.91 ± 0.02	0.86 ± 0.03
10	1.67 ± 0.14	8.93 ± 0.57	0.82 ± 0.06	3.67 ± 0.09	0.71 ± 0.08	113 ± 6	0.95 ± 0.01	0.95 ± 0.01	0.89 ± 0.04	0.82 ± 0.06
20	6.94 ± 5.24	1.83 ± 0.78	0.64 ± 0.13	1.70 ± 0.54	0.59 ± 0.12	24 ± 9	0.83 ± 0.10	0.83 ± 0.10	0.74 ± 0.14	0.66 ± 0.15

K: constante cinética; R<sup>2</sup>: coeficiente de correlación de Pearson; n: exponente cinético relacionado al mecanismo de difusión del fármaco.

## *PAcVA como andamio para el cultivo de células de mamífero*

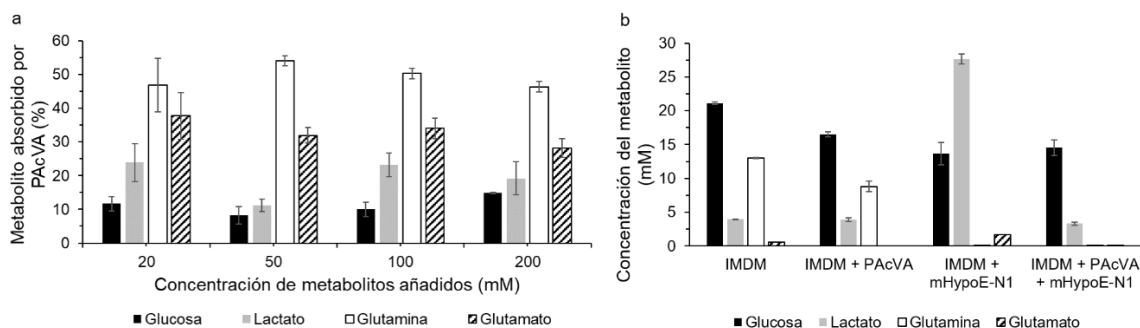
Se ha demostrado que PAcVA es un hidrogel con propiedades atractivas para su uso en la liberación controlada de sustancias. Dado que PAcVA (10% GA) exhibió propiedades mecánicas comparables a los tejidos suaves, se seleccionó esta condición para su ulterior evaluación. A continuación, se evaluó su potencial como andamio para el cultivo de células de mamífero, específicamente la línea neuronal mHypoE-N1 y la línea control de carcinoma de pulmón humano A-549.

Primeramente, dada la capacidad de PAcVA para inmovilizar sustancias, nos preguntamos si el hidrogel podría también absorber nutrientes del medio de cultivo, pudiendo esto comprometer el crecimiento celular. Los resultados se muestran en la Fig. 11. Para ello, películas de hidrogel se sumergieron en presencia de soluciones estándar a concentraciones de 20 – 200 mM de algunos metabolitos comunes en cultivos celulares tales como glucosa, lactato, glutamina y glutamato, cada uno por separado, y se determinó el porcentaje que se había absorbido en el hidrogel a las 24 h a temperatura ambiente. De acuerdo con nuestros resultados, independientemente de la concentración se absorbe 10 - 15% de la glucosa añadida, 10 - 20% del lactato, 45 – 55% de glutamina y 30 – 40% de glutamato (Fig. 11a).

Para un acercamiento más realista, se cuantificó la cantidad de glucosa, lactato, glutamina y glutamato absorbidas del medio IMDM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Para ello se sintetizaron películas de PAcVA en placas de cultivo comercial y se incubaron por 48 h a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> con medio IMDM, en presencia y ausencia de células neuronales mHypoE-N1. Como control se colocó y midió la concentración de metabolitos del medio IMDM incubado bajo las mismas condiciones en placas de cultivo comercial en ausencia de PAcVA y de células (Fig. 11b). A diferencia del experimento anterior, todos los metabolitos están presentes simultáneamente.

Nuestros resultados corroboran la observación anterior de que se absorben la glucosa, y glutamina en el hidrogel. Dado que la acumulación de lactato resulta tóxica para las células de mamífero, nos resultó interesante que las células crecidas en placas comerciales a las 48 h post-cultivo generan aproximadamente 27 mM de lactato, mientras que en presencia de PAcVA existe únicamente 2.5 mM de lactato (más de 10 veces menos), una concentración comparable a la basal del IMDM sin células suplementado con 10% de suero fetal bovino. Estos resultados pueden explicarse ya sea porque existe una absorción preferencial del lactato, o bien, dado que la glucosa y la glutamina también se están absorbiendo en el hidrogel, las células están reducidas en su fuente de carbono para producir más lactato. Que los nutrientes del medio de cultivo se absorban en el hidrogel, podría

comprometer la proliferación celular. Con base en ello se decidió realizar los ulteriores cultivos celulares en PAcVA previamente saturado de medio para evitar que la absorción de nutrimentos comprometa el crecimiento celular.

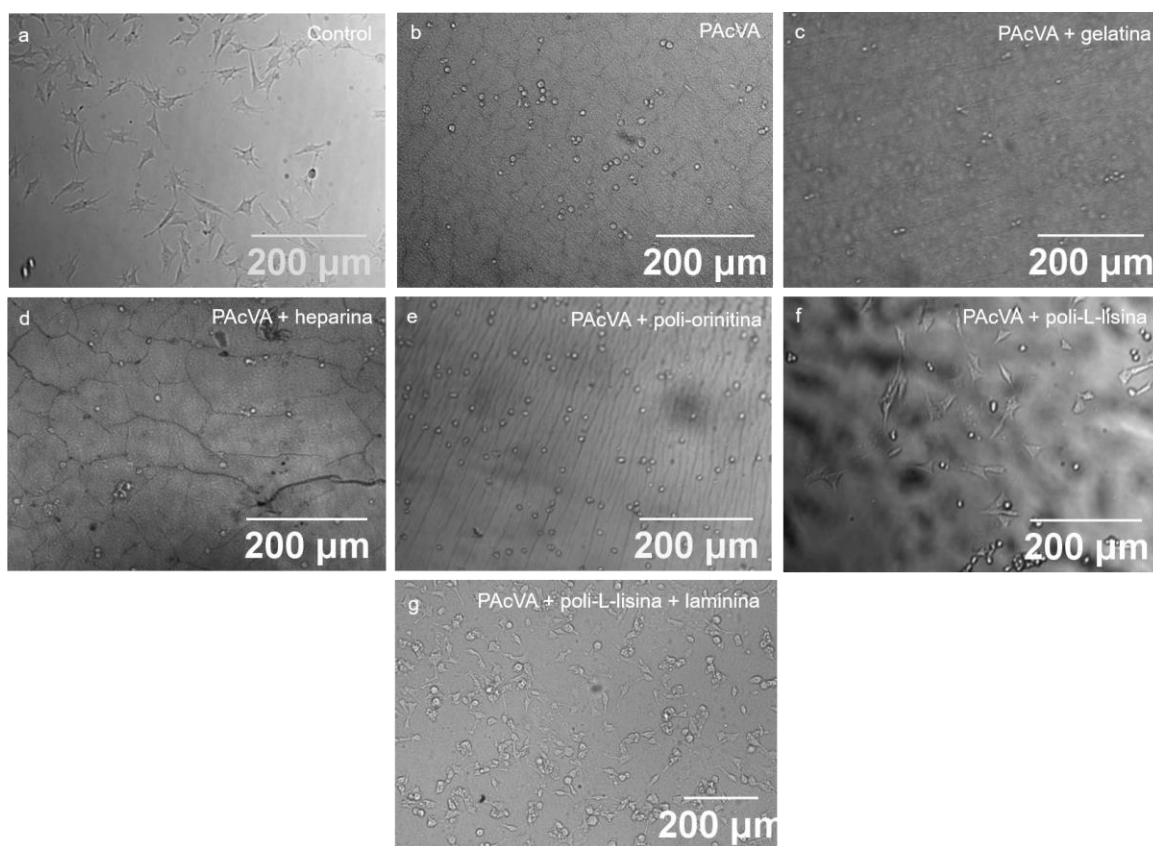


**Figura 11.** Absorción de glucosa, lactato, glutamina y glutamato en el PAcVA. La figura muestra que el hidrogel absorbe metabolitos del medio de cultivo, lo que podría comprometer el crecimiento celular. a) Por ciento de absorción de metabolitos añadidos a la concentración indicada en el gráfico. b) Concentración de metabolitos contenidos en el medio de cultivo IMDM suplementado con 10% de suero fetal bovino en presencia y ausencia de un cultivo modelo de células mHypoE-N1 crecidas por 48 h en PAcVA o en placas de cultivo comercial (n = 4). Las barras de error indican la desviación estándar entre experimentos.

Como se mencionó anteriormente, se eligió al GA como agente entrecruzante por su capacidad para unir proteínas lo cual podría favorecer la adhesión celular. Para probar nuestra hipótesis se utilizó la línea mHypoE-N1 como modelo de estudio. Se comparó la adhesión de las células crecidas sobre una placa de cultivo comercial (Fig. 12a) con respecto a PAcVA con distintos tratamientos. De acuerdo con nuestros resultados, el PAcVA por sí mismo no permite la adhesión celular (Fig. 12b), por ello se probó recubrirlo con otras moléculas que favorecen el anclaje celular, como gelatina (Fig. 12c), heparina (Fig. 12d), poli-ornitina (Fig. 12e), sin éxito. Como se muestra en la Fig. 12b-e, las células no se encuentran adheridas y además muestran estrés. El estrés puede deberse a los residuos de aldehído capaces de formar aductos con nucleófilos fuertes presentes en sistemas biológicos, como las aminos primarias en la lisina [233]. Se sabe que los aldehídos pueden alterar las funciones de las enzimas, el DNA, las proteínas estructurales y otras macromoléculas, lo que podría inhibir de los procesos celulares y causar citotoxicidad [234-236]. Por ello se recubrieron las películas de PAcVA con poli-L-lisina para neutralizar los grupos aldehído libres (ácidos de Lewis) presentes como producto de una polimerización incompleta. El tratamiento con poli-L-lisina (Fig. 12f) resultó

en una adhesión celular parcial que mejoró al complementarlo con un tratamiento con laminina (Fig. 12g).

Con base en estos resultados se determinó que es necesario un pretratamiento del hidrogel antes de iniciar un cultivo celular en lavados para la eliminación de precursores tóxicos de la reacción, seguido por un recubrimiento de poli-L-lisina y laminina para neutralizar los grupos aldehído y favorecer la adhesión celular, así como realizar la saturación del hidrogel con medio de cultivo por al menos 12 h para evitar la absorción indeseada de nutrientes que limite el crecimiento celular.



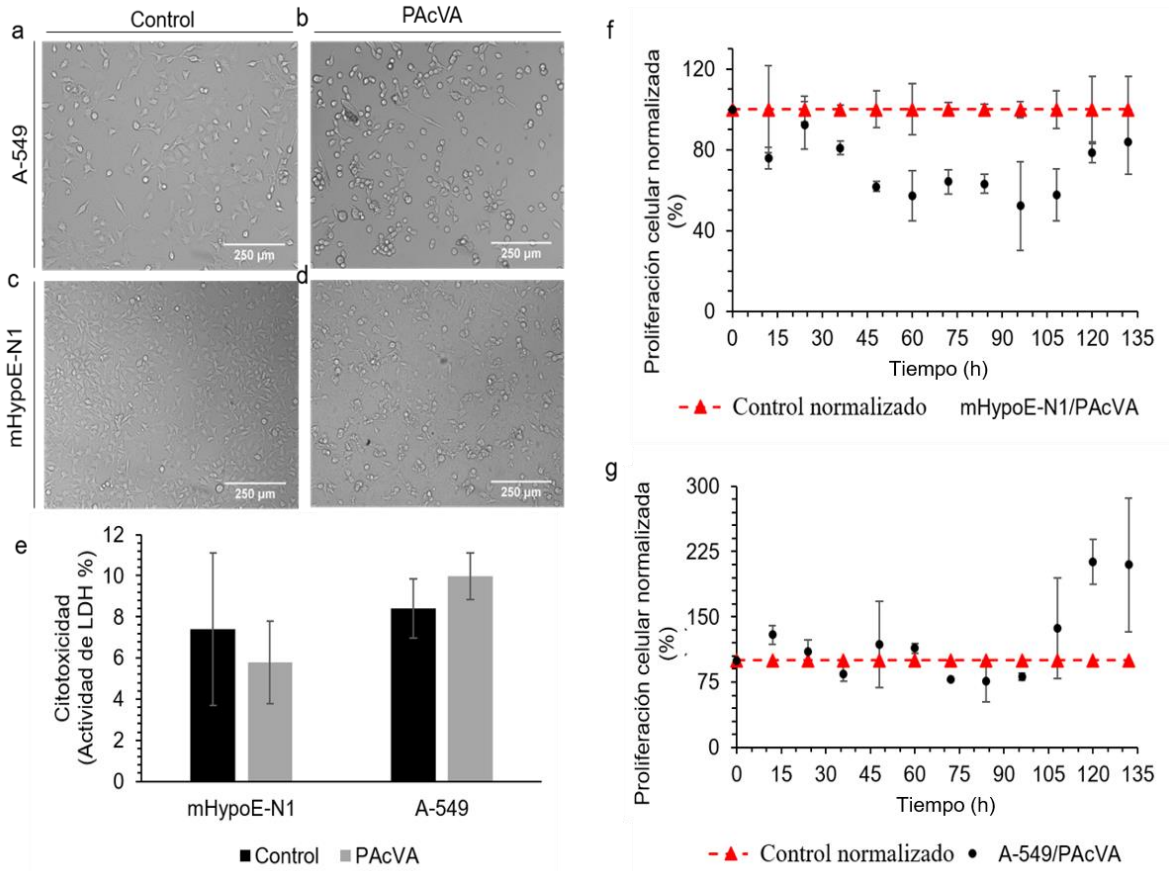
**Figura 12.** Micrografías ópticas de campo claro de células *mHypoE-N1* crecidas sobre diferentes sustratos. La figura muestra que PAcVA *per sé* no permite la adhesión celular, sino que es necesario recubrirlo con poli-L-lisina y laminina. a) Placas de cultivo comercial, b) PAcVA, c) PAcVA más gelatina, d) PAcVA más heparina, e) PAcVA más poli-ornitina, f) PAcVA más poli-L-lisina y g) PAcVA más poli-L-lisina y laminina. Las imágenes fueron tomadas a las 24 h de cultivo.

Una vez establecido el pretratamiento de PAcVA, se cultivaron sobre el hidrogel células de dos linajes distintos, células A-549 y *mHypoE-N1*. Con este tratamiento, se observó que ambas líneas celulares son capaces de adherirse al hidrogel, proliferar y desarrollar las proyecciones típicas de las células adherentes (Fig. 13a-d). Asimismo, se evaluó la cinética de proliferación, medida como la

actividad metabólica normalizada Fig. 13f-g. La proliferación de las células mHypoE-N1 durante las primeras 60 h del cultivo fue menor sobre las películas de PAcVA que en los cultivos control. Entre las 60 y 108 h, el crecimiento fue similar. Después de las 108 h, el crecimiento sobre PAcVA fue más rápido que en los cultivos control, hasta que se alcanzaron concentraciones celulares similares. Es posible que las células se hayan adaptado a crecer en PAcVA, o bien que la concentración de factores autocrinos aumentara con el tiempo favoreciendo la proliferación, dando como resultado un mejor crecimiento en los últimos tiempos del cultivo. En contraste, no se observó diferencia en el crecimiento de las células A-549 en presencia o ausencia de PAcVA hasta las 108 h de cultivo. Posteriormente, las células crecidas en PAcVA alcanzaron concentraciones celulares dos veces más altas que en las placas de cultivo control. No se encontró diferencia significativa en la liberación de LDH, un marcador de muerte celular, en cultivos celulares crecidos con o sin PAcVA a las 72 h (Fig. 13e), lo que indica que el menor crecimiento celular de mHypoE-N1 no fue ocasionado por muerte celular y que PAcVA no es citotóxico. No se observó aumento en el nivel intracelular de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células cultivadas en placas o en películas de PAcVA, lo que indica que las células no estaban bajo estrés oxidante (datos no mostrados) en estas condiciones.

Nuestros resultados contrastan con los de Gough et al. [236], quienes encontraron que una matriz de PVA y colágeno entrecruzada con GA resultó tóxica hacia células de mamífero. Los autores observaron apoptosis en osteoblastos humanos, habiendo descartado previamente que tal toxicidad se atribuyera a GA residual, al eliminarlo mediante lavados. En nuestro caso, además de los lavados, los grupos aldehído remanentes se neutralizaron con poli-L-lisina y laminina, moléculas que además proveen al hidrogel de carga favorable para la adhesión celular y una pre-incubación con medio de cultivo, descartando una posible deficiencia de nutrimentos para las células por una absorción no deseada en el hidrogel. Estas modificaciones, resolvieron las limitaciones observadas por Gough et al. [236] haciendo de PAcVA un material versátil y apto para el cultivo celular con potenciales aplicaciones para la ingeniería de tejidos.





**Figura 13.** Crecimiento celular en películas de PACVA (10% GA). La figura muestra que PACVA funciona como andamio para el crecimiento de células de mamífero. Células mHypoE-N1 crecidas en a) placas de cultivo celular sin PACVA y b) en películas de PACVA a las 48 h de cultivo. Las células A-549 crecieron en c) placas de cultivo celular sin PACVA y d) en películas de PACVA. e) Citotoxicidad medida a través de la actividad de LDH a las 72 h de cultivo (n = 3). Proliferación normalizada de f) mHypoE-N1 y g) A-549. Proliferación celular normalizada (n = 2). Las barras de error representan desviaciones estándar o diferencia entre experimentos.

## Bloque II. Producción de nntVP6-Au y estudio de su biocompatibilidad

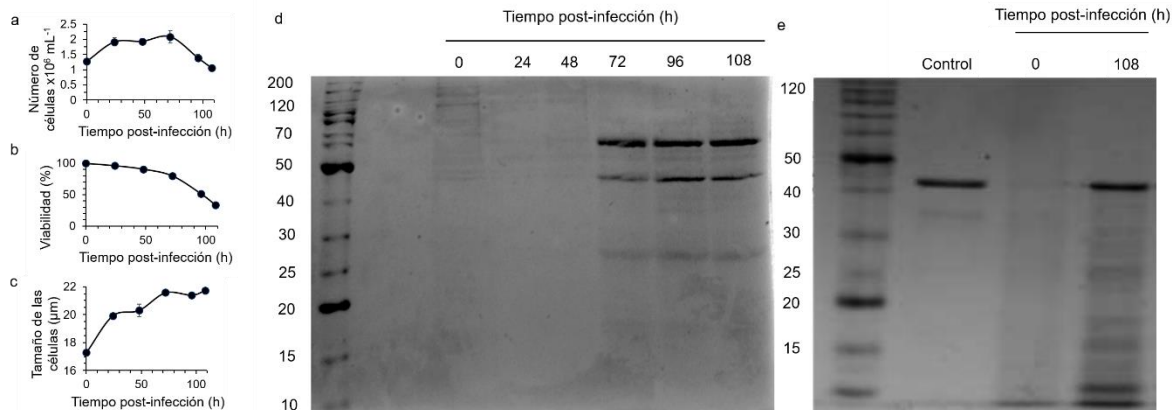
En el capítulo anterior se demostró que PACVA sirve como un andamio para la entrega controlada de sustancias y como andamio para la proliferación celular. Con objeto de obtener un material que mimetice las fibras de la matriz extracelular y que al mismo tiempo provea de conductividad eléctrica al hidrogel, se evaluará en el presente capítulo la capacidad de los nntVP6-Au para servir como andamios para el crecimiento neuronal sin inducir citotoxicidad, a diferencia de los CNT.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la producción de nntVP6 en el sistema célula de insecto-baculovirus y la purificación de éstos a partir de pellet y sobrenadante.

### *Producción y purificación de nntVP6 de sobrenadante*

Se llevó a cabo la amplificación de un baculovirus (*Autographa californica* nucleopolihedrovirus) que expresa la proteína VP6 (SA11) bajo el promotor *polh*, (bacVP6), amablemente donado por la Dra. Susana López, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para ello, se infectaron 40 mL de células Sf9 adaptadas a suspensión en medio Sf900II (ThermoFisher Scientific, 10902187) a una multiplicidad de infección (MDI) de 0.1 ufp cel<sup>-1</sup> y se incubaron por 96 horas. Se observó que a las 96 h post-infección, las células se duplicación en número, disminuyó la viabilidad del 99% hasta el 25%, las células incrementaron su tamaño de 17.5 µm a 19.5 µm de diámetro como se describe en [237]. El título viral obtenido fue de 1.1x10<sup>8</sup> ufp mL<sup>-1</sup>. Con el lote de bacVP6 recién amplificado, se infectó un cultivo de células High Five® con una MDI de 0.5 ufp cel<sup>-1</sup> y se siguió la cinética de expresión de la proteína VP6. Los resultados se muestran en la Fig. 14. En la Fig. 14a se muestra la concentración celular en el tiempo. Se partió de un cultivo a una concentración celular de 1.25x10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> y una viabilidad del 99%, a las 48 h post-infección las células alcanzaron una concentración máxima de 2.00x10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> y a las 72 h comenzó la lisis celular. La proteína VP6 se colectó a las 108 h, cuando la concentración celular era de 0.90 x10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>. Se observó el clásico incremento del diámetro celular en la infección. Mientras que las células no infectadas tuvieron un diámetro promedio de 17.5 µm, a partir de las 72 h se observó el máximo diámetro celular, 21 µm (Fig. 14c). La reducción en el número de células viables y el incremento del diámetro celular post-infección observados son consistentes con lo reportado por [239], quienes demostraron que la infección de células de insecto por baculovirus induce un reordenamiento dramático y la eventual destrucción del citoesqueleto de actina.

Se tomaron muestras del sobrenadante durante el cultivo y se analizaron las proteínas en él en una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Los resultados de las muestras de sobrenadante se muestran en la Fig. 14d y de pellet en la Fig. 14e. El monómero de VP6 tiene un tamaño de 46 kDa según lo reportado por [240-241]. Una banda de aproximadamente ese tamaño molecular se observó a partir de las 72 h post-infección en el sobrenadante, indicando que en este tiempo la proteína se libera al medio debido a la lisis celular. La cosecha se llevó a cabo a las 108 h post-infección, recuperando sobrenadante y pellet para su posterior purificación.

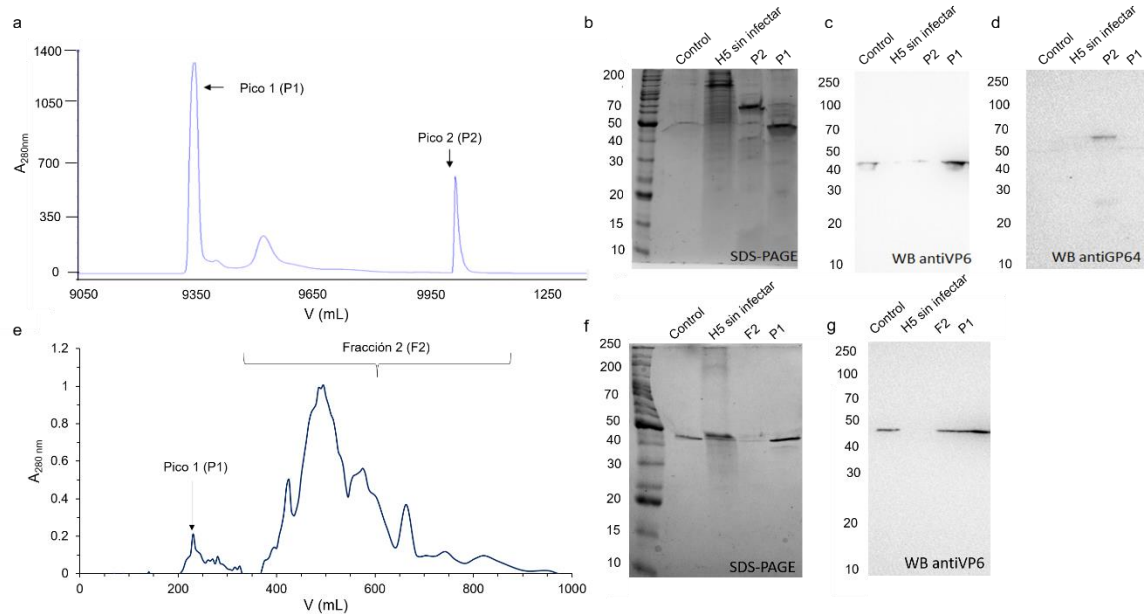


**Figura 14.** Producción de la proteína recombinante VP6. La figura muestra que la máxima producción de VP6 se presenta a las 108 h post-infección. Cinéticas de infección de células de insecto High Five® infectadas con bacVP6 a) Número de células, b) Por ciento de viabilidad, c) Tamaño (diámetro) celular. SDS-PAGE del d) sobrenadante y e) pellet donde se observa la aparición de una banda de aproximadamente 46 kDa que corresponde al tamaño de VP6. (n = 3). Las barras de error representan desviaciones estándar entre experimentos independientes.

El proceso de purificación de VP6 de sobrenadante se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por [26]. Los resultados se resumen en la Fig. 15. El proceso de purificación consiste en dos pasos, el primero una cromatografía de intercambio aniónico a pH 6.16 correspondiente al punto isoeléctrico de VP6, donde se espera que la proteína, al ser eléctricamente neutra no interaccione con la resina de agarosa con carga positiva, y por tanto eluya en la fracción del material no unido, denominada pico 1 (P1) en la Fig. 15a. Al hacer un cambio de fase móvil por un amortiguador de mayor fuerza iónica, las proteínas contaminantes eluyen en el pico 2 (P2), incluyendo bacVP6, cuya proteína mayoritaria de envoltura es GP64 [242]. Luego se llevó a cabo un SDS-PAGE (Fig. 15b) y dos ensayos de inmunodetección por Western blot de la proteína VP6 (Fig. 15c) y GP64 (Fig. 15d) para corroborar su identidad. Como se esperaba, se detectó la presencia de VP6 en el P1 y la proteína GP64 en el P2, lo que demuestra que el intercambio aniónico fue exitoso para remover el bacVP6 entre otras proteínas contaminantes.

En una segunda etapa de purificación, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular para separar las proteínas por tamaño mediante una resina de ácido metacrílico hidroxilado de un tamaño de poro de 5000 kDa. Aquellas proteínas de mayores a 5000 kDa eluirán en el volumen vacío de la columna (P1) y en el resto en la fracción denominada F2 (Fig. 15e). Al término de la cromatografía, se llevó a cabo un SDS-PAGE (Fig. 15f) y un Western blot de la proteína VP6 (Fig.

15g). Tanto en el P1 como en la F2, se observó la presencia de VP6, lo que sugiere que en el P1 se encuentran VP6 ensamblada, presumiblemente en forma de nntVP6, mientras que en la F2 se encuentra VP6 desensamblada. Muestras del P1 se almacenaron a 4° C para su posterior análisis por SEM.

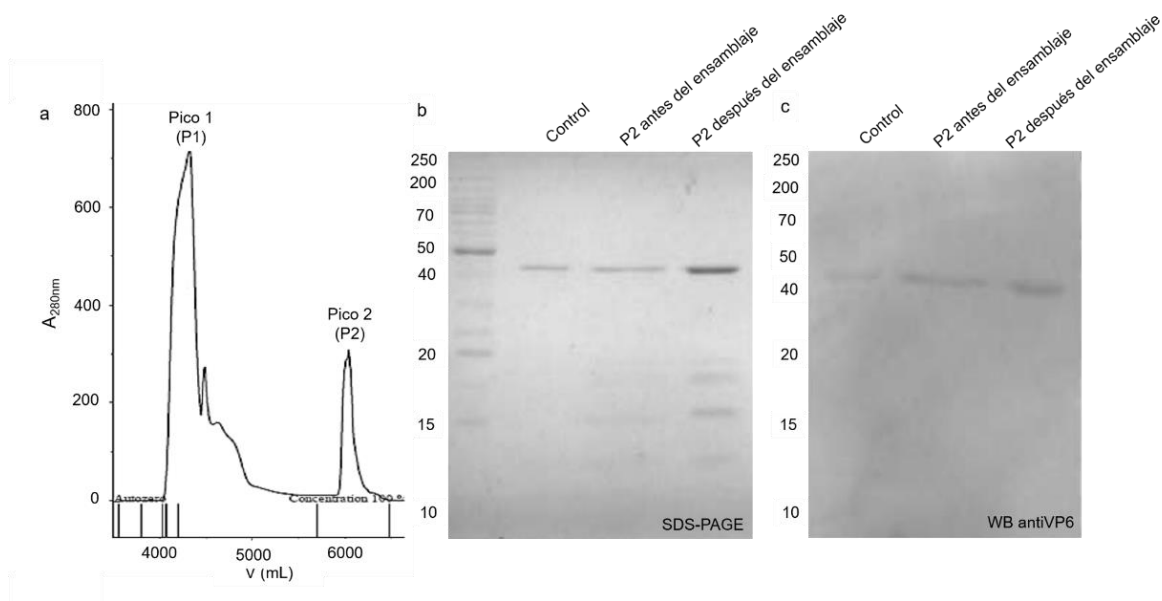


**Figura 15.** Purificación de la proteína VP6 de sobrenadante. La figura muestra que con nuestro proceso de purificación es posible obtener VP6 de sobrenadante en su forma multimérica. a) Cromatograma de intercambio aniónico. En la figura se señala el pico 1 (P1) donde se espera se encuentre VP6 y el pico 2 (P2) donde se espera se encuentren las proteínas contaminantes. b) SDS-PAGE de los productos del intercambio aniónico. Western blot de los productos del intercambio aniónico c) antiVP6 y d) antiGP64. e) Cromatograma de exclusión molecular. En la figura se señala el pico 1 (P1) donde se espera se encuentre VP6 ensamblada y la fracción 2 (F2) donde se espera se encuentren las proteínas contaminantes y VP6 desensamblada. b) SDS-PAGE de los productos de la exclusión molecular. g) Western blot antiVP6 de los productos de exclusión molecular.

### *Producción y purificación de nntVP6 de pellet*

La purificación de nntVP6 a partir de pellet celular se llevó a cabo con base en lo reportado por [186]. La metodología consiste en único paso de purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico. Primero, el pellet se lisa y acidifica a pH 3, con lo que VP6 se encuentra en su forma trimérica cargada positivamente y se adsorbe en la resina con carga negativa. Por tanto, en el P1 se esperan las proteínas contaminantes y en el P2, la proteína VP6 eluye con un amortiguador de acetatos pH 8. El cromatograma obtenido se muestra en la Fig. 16a. Al término de la cromatografía

se llevó a cabo un SDS-PAGE con el P2 de la cromatografía y el producto del ensamblaje *in vitro* según se reporta en [186] (Fig. 16b), así como un Western blot de la proteína VP6 (Fig. 16c). Como se esperaba, se detectó la presencia de VP6 en el P2 que se mantiene después del ensamblaje *in vitro*. Tras el ensamblaje se observaron productos de degradación de la proteína y las muestras se almacenaron para su observación por SEM.

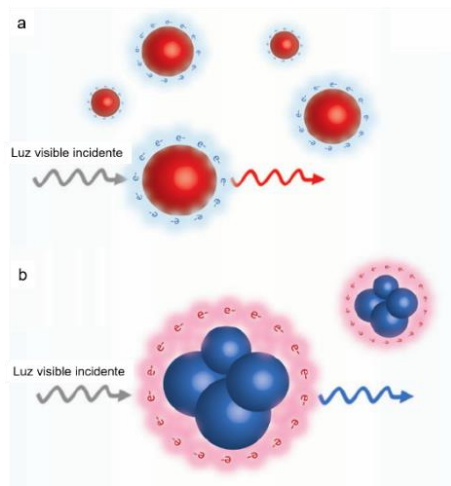


**Figura 16.** Purificación de la proteína VP6 de pellet. La figura muestra que con nuestro proceso de purificación es posible obtener VP6 de pellet en su forma trimérica. a) Cromatograma de intercambio catiónico. En la figura se señala el pico 1 (P1) donde se espera se encuentren las proteínas contaminantes y el pico 2 (P2) donde se espera se encuentre VP6. b) SDS-PAGE del P2 intercambio catiónico antes y después del ensamblaje *in vitro*. Western blot (antiVP6) del P2 del intercambio catiónico antes y después del ensamblaje *in vitro*.

### *Funcionalización de los nntVP6-Au*

Una vez purificados los nntVP6, se llevó a cabo la funcionalización externa con AuNPs. Con objeto de reducir la agregación de los nntVP6Au y evitar el uso de agentes dispersantes como los que reporta Carreño-Fuentes [149], se llevó a cabo una optimización de la funcionalización reportada por [26, 149]. La modificación al método se basó en detener la reacción de funcionalización de los nntVP6 cuando la resonancia del plasmón fuera máxima. El fenómeno de resonancia del plasmón consiste en que al incidir un haz de luz sobre una nanopartícula metálica se genera una oscilación en la densidad de carga, siempre y cuando la energía de la luz emitida coincida con la frecuencia de plasma. Al desplazar la nube electrónica, la red cristalina ejerce entonces una fuerza contraria para restablecer el

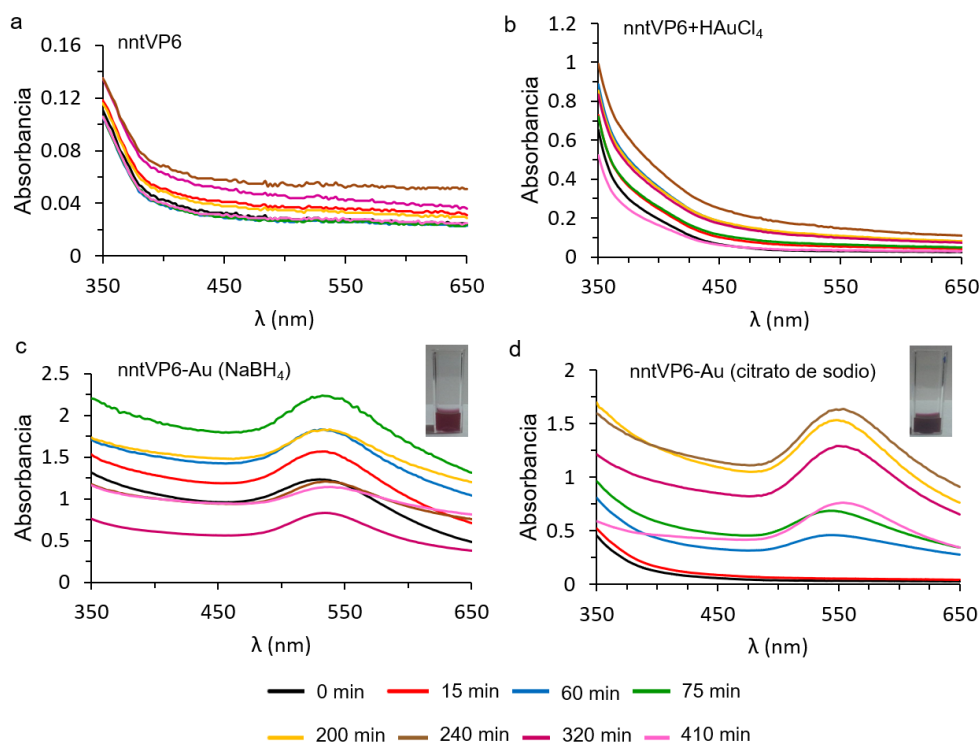
equilibrio, por lo que el sistema se comporta como un oscilador armónico, donde cada “quantum” de oscilación es un plasmón. Este fenómeno se observa en las dispersiones coloidales de nanopartículas metálicas y depende tanto del tamaño de la nanopartícula como de su agregación [243]. En el caso de las AuNPs de 15 nm diámetro, se ha reportado la resonancia de plasmón a 520 nm, mientras que las AuNPs de 50 nm se ha reportado a 540 nm [244]. Cuando las AuNPs se agregan, sus nubes electrónicas se superponen, comportándose como una partícula más grande, donde su máximo de absorbancia de resonancia de plasmón se desplaza a una longitud de onda más larga (desplazamiento rojo), lo cual se puede distinguir a simple vista porque la dispersión se torna de roja (dispersa) a azul (agregada) [245]. El fenómeno se esquematiza en la Fig. 17.



**Figura 17.** Resonancia del plasmón superficial en AuNPs dispersas y agregadas. La figura ilustra que cuando las AuNPs se agregan, su máximo de absorbancia de resonancia de plasmón se desplaza a una longitud de onda más larga. a) Las AuNPs de aproximadamente 15 nm de diámetro en dispersión dispersas absorben luz visible (520 nm). La dispersión se observa roja. b) Cuando las AuNPs se agregan, las nubes electrónicas se superponen, existe un desplazamiento rojo y el color de la dispersión se torna azul. Modificado de [245].

Con objeto de tener nntVP6-Au funcionalizados con AuNPs de diferentes tamaños, se evaluaron dos agentes reductores, uno fuerte como el borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), con el cual se obtienen AuNPs de  $15 \pm 3$  nm de diámetro y uno suave como el citrato de sodio  $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$  con el cual se obtienen AuNPs de  $50 \pm 5$  nm, en relación equimolar a la cantidad de  $\text{Au}^{3+}$  añadido a la reacción (2 mM). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 18. Como controles internos de la reacción se obtuvieron los espectros de extinción (UV-Vis) de los nntVP6 en agua desionizada sin ácido cloroaurico ( $\text{AuHCl}_4$ ) (Fig. 18a) y con 2 mM de  $\text{AuHCl}_4$  (Fig. 18b). Como se observa en sus

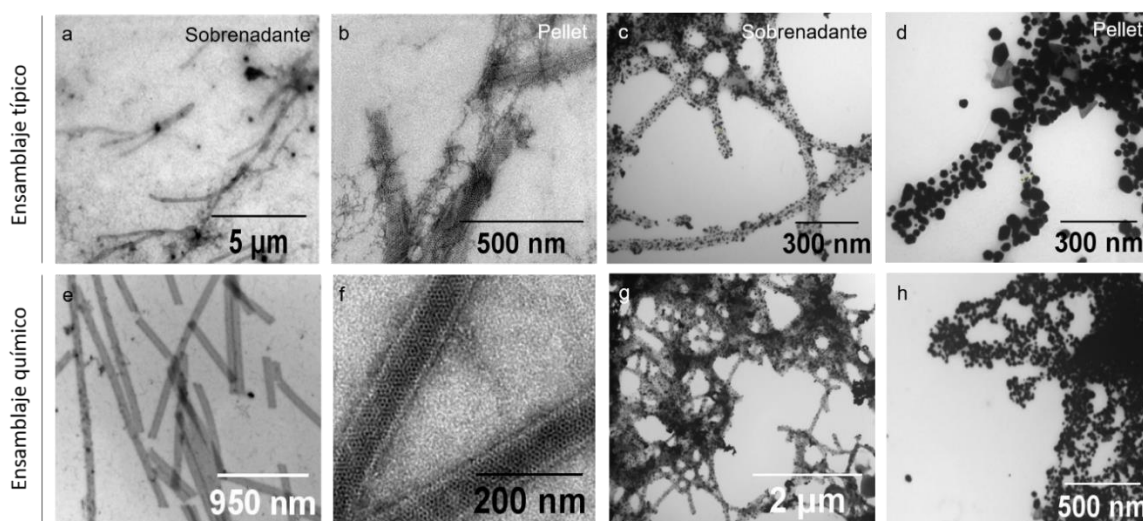
respectivos espectros, no se aprecia ningún máximo de absorbancia a 520-540 nm. No obstante, tras la adición equimolar de  $\text{NaBH}_4$  o citrato de sodio, la máxima absorbancia a 520 nm y 540 nm, respectivamente, se observó a los 75 min de reacción (Figs. 18c y 18d, respectivamente). Después de ese tiempo se observó en ambos espectros un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores (rojo), como indicación de agregación. Esto contrasta con los resultados de Plascencia-Villa et al. [26] quienes para el caso del  $\text{NaBH}_4$  o citrato de sodio, detienen la reacción a las 4 h y 9 h, respectivamente obteniendo agregados de nntVP6-Au [143, 149]. Con nuestra metodología, se obtuvieron dispersiones de nntVP6-Au a simple vista color rojizas estables por varias semanas, sin la necesidad de agregar los agentes dispersantes (Figs. 18c y 18d) utilizados por [149]. Nuestras observaciones se confirmaron midiendo el potencial Z de los nntVP6-Au en un Zetasizer Nano (Malvern, UK) como medida de su estabilidad coloidal (resultados no mostrados).



**Figura 18.** Espectros de extinción UV-Vis de la cinética de funcionalización de nntVP6-Au con diferentes agentes reductores. La figura muestra que el tiempo de funcionalización de lo nntVP6-Au donde la agregación es mínima es de 75 min independientemente del agente reductor empleado. a) nntVP6, b) nntVP6+AuHCl<sub>4</sub>, c) nntVP6+AuHCl<sub>4</sub>+NaBH<sub>4</sub>, d) nntVP6+AuHCl<sub>4</sub>+citrato de sodio. Los agentes reductores se añadieron en cantidades equimolares con respecto al Au<sup>3+</sup> (2 mM). A la derecha de las Figs. c y d se muestra una fotografía de la muestra de reacción al t=75 min tras 2 semanas de almacenamiento a 4° C.

La estructura de los nntVP6 y su correcta funcionalización se corroboró por TEM. Los resultados se muestran en la Fig. 19. Los nntVP6 obtenidos mostraron tamaños similares, independientemente de su origen de pellet o sobrenadante (diámetro  $80\pm 5$  nm, longitud  $2.0\pm 1.0$   $\mu\text{m}$ ).

En la Fig. 19a se muestran los nntVP6 obtenidos de sobrenadante. En la Fig. 19b se muestran los nntVP6 purificados de pellet y ensamblados según lo reportado por Mena JA et al. [147] y López-Saldaña [186]. Los nntVP6 obtenidos, tanto de sobrenadante como de pellet, se funcionalizaron con AuNPs bajo nuestras condiciones experimentales, como se muestra en las Figs. 19c y 19d, respectivamente. Asimismo, se ensayó un nuevo método de ensamblaje *in vitro* Rodríguez-González et al. (artículo en preparación) [187] basado en el desensamblaje de la proteína VP6 con 300 mM de  $\text{CaCl}_2$  y la posterior precipitación del calcio en forma de  $\text{CaCO}_3$  con 10 volúmenes de  $\text{NaHCO}_3$  100 mM como se describe en materiales y métodos. Como resultado de este procedimiento, se obtuvieron muestras de nntVP6 más limpias (con menos residuos de lípidos y ácidos nucleicos) que con los protocolos convencionales (Figs. 19e y 19f) [26, 147, 186]. Además de ello, se demostró por primera vez que con esta nueva metodología de ensamblaje *in vitro* se mantiene tanto la estructura del trímero de VP6 como la exposición de los residuos aminoacídicos (N250, E315, H316) que tienen afinidad a metales [144], siendo posible en consecuencia su funcionalización Rodríguez-González et al. (artículo en preparación) [187].



**Figura 19.** Micrografías de SEM de muestras de nntVP6 y nntVP6-Au obtenidas por el ensamblaje típico *in vivo* (panel superior), como por ensamblaje químico *in vitro* (panel inferior). La figura muestra que independientemente del mecanismo de ensamblaje de VP6 (*in vivo* de sobrenadante, *in vitro* de pellet o *in vitro* químico), es posible su funcionalización con AuNPs en su superficie. nntVP6 ensamblados *in vivo* purificados de a) sobrenadante, b) pellet. nntVP6-Au ensamblados *in vivo* purificados de c) sobrenadante, d) pellet. e-f) nntVP6 ensamblados químicamente *in vitro* por secuestro de calcio, g-h) nntVP6-Au ensamblados químicamente *in vitro* por secuestro de calcio.



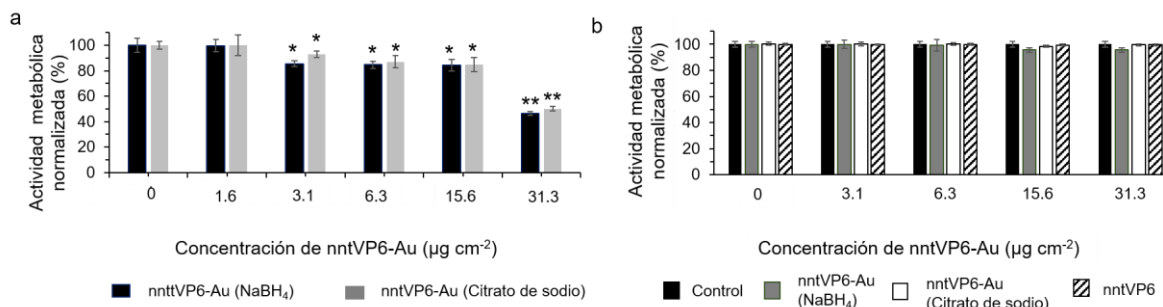
## *Análisis de biocompatibilidad de los nntVP6-Au*

Trabajos previos de nuestro laboratorio habían reportado que los nntVP6-Au resultan tóxicos hacia diferentes cultivos de células de mamífero. Por ejemplo, Carreño-Fuentes evaluó la viabilidad normalizada de cultivos A-549 de carcinoma de pulmón humano y THP-1 de monocitos humanos expuestas 48 h a nntVP6-Au (18, 35 y 70  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en ausencia y presencia de 3-mercaptopentil propanosulfato de sodio (MPS) y 5-mercaptopentil  $\beta$ -D-glucopiranosido (GlcC5SH) como agentes dispersantes. De acuerdo con sus resultados, los efectos citotóxicos de los nntVP6-Au fueron diferentes para cada línea celular. En ambas líneas celulares, la citotoxicidad observada fue directamente proporcional a la dosis de nntVP6-Au añadida sin efecto significativo del agente dispersante [149]. García-García obtuvo resultados similares al evaluar la viabilidad celular normalizada a las 48 h en la línea mHypoE-N1 y de neuroblastoma de ratón, Neuro2A expuestas a 4 y 8  $\mu\text{g cm}^{-2}$  de nntVP6-Au. De acuerdo con sus resultados existe una citotoxicidad dosis-dependiente respecto a los nanocomplejos [247]. En ambos trabajos se emplearon únicamente nntVP6-Au obtenidos con  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor. Tanto Carreño-Fuentes como García-García descartaron la posibilidad de emplear nntVP6-Au como andamios para el cultivo celular [149, 247].

Con base en ello, en el presente trabajo se reprodujo la metodología seguida por García-García [247] en la línea celular mHypoE-N1 expuesta 48 h a nntVP6-Au (0-31.5  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) obtenidos con  $\text{NaBH}_4$  y citrato de sodio como agentes reductores, obteniendo resultados similares en ambos casos y observándose de manera consistente una citotoxicidad dosis-dependiente (Fig. 20a). Un control adicional, en el cual se colocó el mismo volumen de nntVP6-Au, pero del sobrenadante de la dispersión de los nanocomplejos, mostró que incluso éste inducía una citotoxicidad celular dosis-dependiente, lo cual sugirió que la toxicidad de los nntVP6-Au podría provenir de trazas de reductor de la reacción de funcionalización y no del material *per se* (datos no mostrados). Con base en ello, se decidió modificar el procedimiento de lavado de los nntVP6-Au reportado [26, 149, 247], que consistía en ciclos de centrifugación y decantación para deshacerse del medio de dispersión. En su lugar, se utilizó una diálisis en agua desionizada durante 7 días, cambiando el agua cada día, y se evaluó nuevamente la citotoxicidad de los nntVP6-Au obtenidos con  $\text{NaBH}_4$  y citrato de sodio, y se comparó con el control en ausencia de nanopartículas y los nntVP6 sin funcionalizar. Los resultados se muestran en la Fig. 20b.

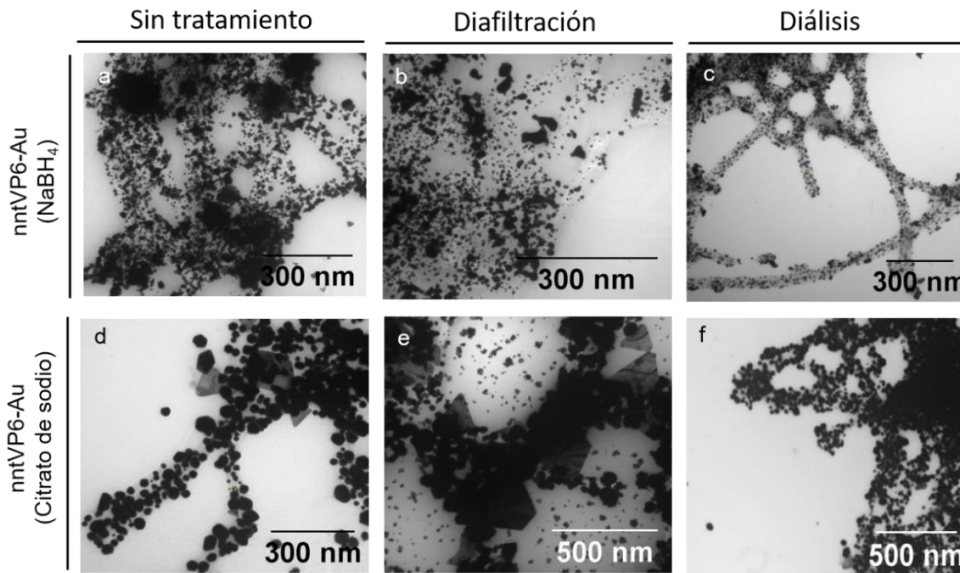
De acuerdo con nuestros resultados, en todas las condiciones se obtuvieron viabilidades superiores al 95%, con lo cual se demuestra que los nntVP6 y los nntVP6-Au funcionalizados tanto con  $\text{NaBH}_4$  como con citrato de sodio como agentes reductores no son citotóxicos para cultivos de mHypoE-N1 tras 48 h de exposición.

Experimentos similares se llevaron a cabo removiendo las trazas del agente reductor mediante ultrafiltración sin embargo esta técnica, a diferencia de la diálisis, afectó la integridad de los nntVP6-Au (Fig. 21).



**Figura 20.** Ensayos de MTS para medir la actividad metabólica como medida indirecta de la viabilidad celular ante diferentes concentraciones de las nanopartículas indicadas en la figura. La figura muestra que los nntVP6-Au son inocuos hacia células de mamífero una vez que las trazas del agente reductor usado en su funcionalización se hayan dializado. a) Exposición a nntVP6-Au funcionalizados con NaBH<sub>4</sub> o citrato de sodio como agentes reductores, utilizando ciclos de centrifugación-decantación como técnica para la remoción de sustancias remanentes de la reacción. b) Exposición a diferentes materiales obtenidos utilizando diálisis por 7 días en agua desionizada para la remoción de sustancias remanentes de la reacción. Las mediciones se realizaron a las 48 h de exposición a los materiales (n = 6). Las barras de error representan desviaciones estándar entre experimentos independientes. (\*) p < 0.05, (\*\*) p < 0.01.

Una vez removidas las trazas del agente reductor, se evaluó el papel de los nntVP6-Au en cultivos celulares de mHypoE-N1 (Fig. 22) y A-549 (Fig. 23). La proliferación celular se normalizó con respecto a la proliferación de las células crecidas en las placas comerciales en el tiempo y se comparó con la proliferación alcanzada en placas recubiertas con 31.5 µg cm<sup>-2</sup> de nntVP6 y nntVP6-Au obtenidos mediante reducción con citrato de sodio. Para los experimentos posteriores se eligió trabajar con nntVP6Au obtenidos con citrato de sodio, ya que se ha reportado que los aniones de citrato se adsorben en las AuNPs a través de grupos carboxilato centrales, donde una combinación entre puentes de hidrógeno, formación de bicapas de citrato y la quiralidad contribuyen a la estabilización de las AuNPs, como se reporta en [248].



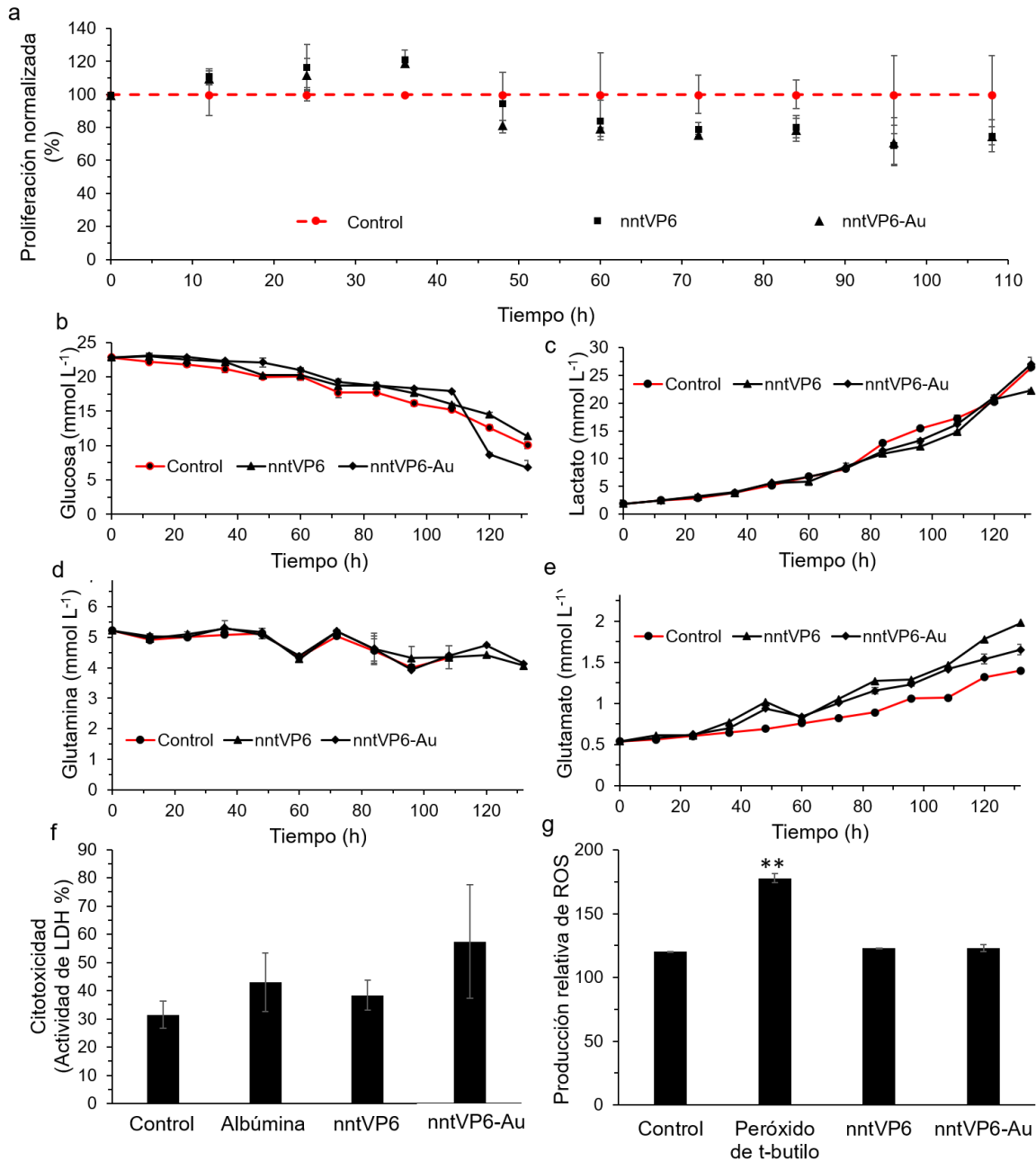
**Figura 21.** Micrografías de TEM de muestras de nntVP6-Au funcionalizados con dos diferentes agentes reductores. La figura muestra la que la funcionalización de nntVP6-Au con citrato de sodio o  $\text{NaBH}_4$ , genera AuNPs de diferente tamaño en la superficie de los nntVP6 y que, a diferencia de la diafiltración, la diálisis es un proceso para la remoción de trazas de agente reductor que no compromete la estructura de los nanocomplejos. En el panel superior se muestran nntVP6-Au con  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor a) sin remoción de trazas de la reacción, y tras la remoción de trazas de la reacción mediante b) diafiltración o c) diálisis. En el panel inferior se muestran nntVP6-Au con citrato de sodio como agente reductor d) sin remoción de trazas de la reacción, y tras la remoción de trazas de la reacción mediante e) diafiltración o f) diálisis.

En el caso de las células mHypoE-N1, la proliferación celular fue similar en las cuatro condiciones, siendo superior al 75% durante toda la cinética (Fig. 22a). No se observaron diferencias significativas en el consumo de glucosa (Fig. 22b), producción de lactato (Fig. 22c), consumo de glutamina (Fig. 22d) o producción de glutamato (Fig. 22e) durante la cinética de crecimiento. No se encontró diferencia significativa en la liberación de LDH en los cultivos celulares a las 72 h, independientemente del tipo de nanomaterial al cual fueron expuestos (Fig. 22f). Como control negativo las células se expusieron a la misma concentración de albúmina como proteína irrelevante. No se detectó inducción de ROS, excepto en el control positivo con peróxido de *t*-butilo (Fig. 22g). Estos resultados demuestran que bajo nuestras condiciones experimentales los nntVP6 y nntVP6-Au no resultan citotóxicos para las células neuronales mHypoE-N1.

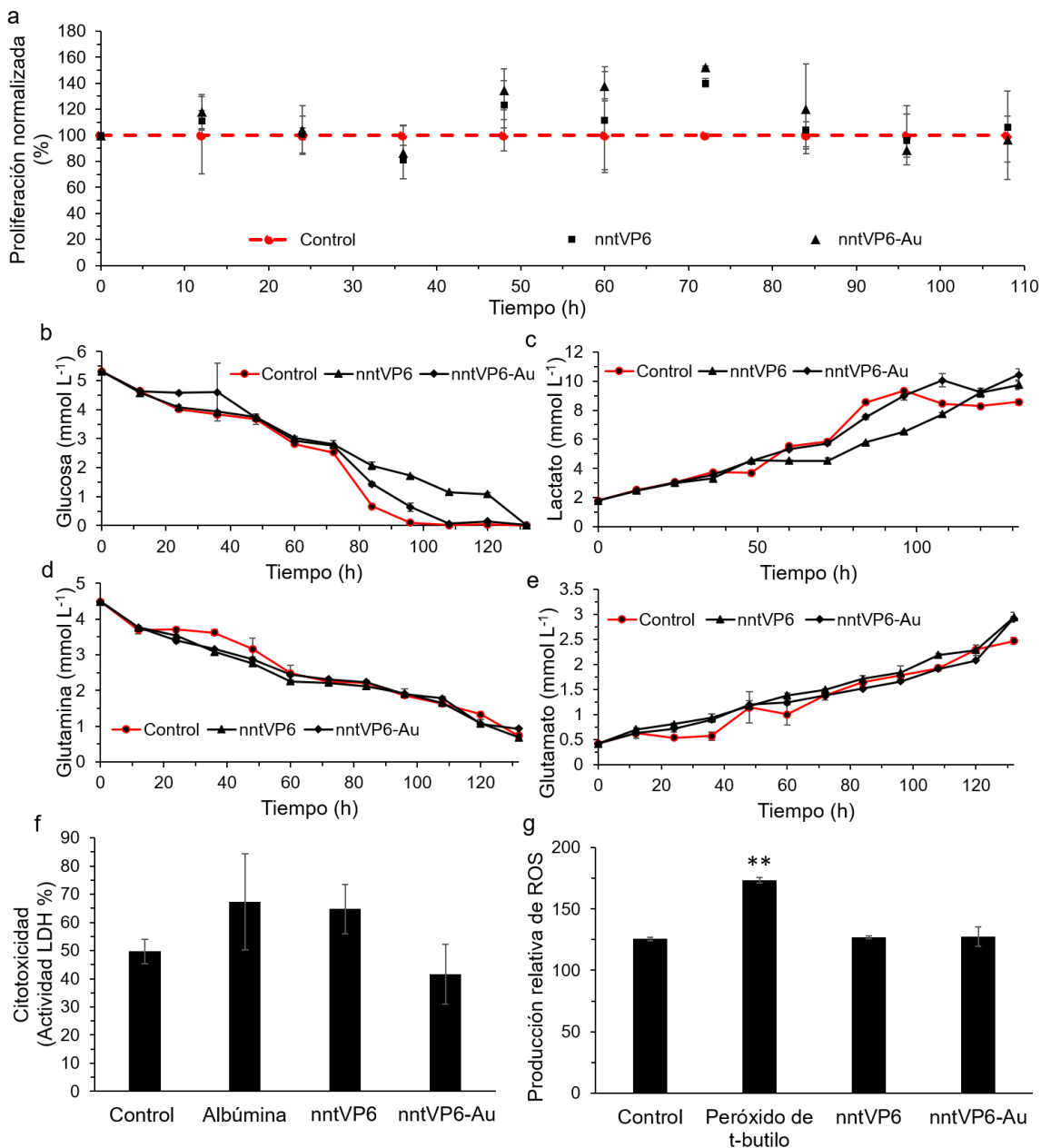
Resultados similares se obtuvieron para la línea A-549, donde la proliferación celular fue similar ante la exposición a los cuatro tipos de nanomateriales anteriormente mencionados y fue superior al 80% en todos los puntos de la cinética (Fig. 23a). Asimismo, no se observaron diferencias

significativas en el consumo de glucosa (Fig. 23b), producción de lactato (Fig. 23c), consumo de glutamina (Fig. 23d) o producción de glutamato (Fig. 23e). No se encontró diferencia significativa en la liberación de LDH en los cultivos celulares a las 72 h, independientemente del tipo de nanomaterial al cual fueron expuestos, así como en el control con albúmina Fig. 23f). No se observaron alteraciones en los niveles de intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), excepto en el control positivo con peróxido de *t*-butilo (Fig. 23g). Estos resultados demuestran que bajo nuestras condiciones experimentales los nntVP6 y nntVP6-Au no resultan citotóxicos para las células A-549.

Los resultados obtenidos respecto a la inocuidad de los nntVP6-Au es son de particular relevancia puesto que, a diferencia de los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), cuya toxicidad en células de mamífero ha sido ampliamente reportada [249-250], los nntVP6-Au resultan inocuos para las líneas evaluadas. Los MWCNT inducen citotoxicidad en células A-549 en concentraciones relativamente altas ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) tras 24 h de exposición, mientras que a dosis menores ( $0.3 - 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no se induce citotoxicidad significativa, detención del ciclo celular, apoptosis o daño al DNA [251]. En el presente trabajo se usaron dosis de nntVP6 y nntVP6-Au incluso superiores ( $31.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) que, considerando un volumen de cultivo de  $100 \mu\text{L}$ , corresponden a  $315 \mu\text{g mL}^{-1}$  aproximadamente. Bajo nuestras condiciones experimentales, los cultivos expuestos a nntVP6 y nnVP6-Au tanto de mHypoE-N1 como de A-549 alcanzaron niveles de proliferación similares a las condiciones control en ausencia de nanomaterial, sin citotoxicidad aparente. Consideramos importante realizar ensayos adicionales para evaluar la citotoxicidad de los nntVP6-Au a largo plazo, así como el análisis transcripcional de marcadores apoptóticos como  $p^{53}$ ,  $p^{21\text{WAF1/CIP1}}$ , Bax, Bcl<sub>2</sub> y caspasa-3, de forma similar al estudio realizado por [252].

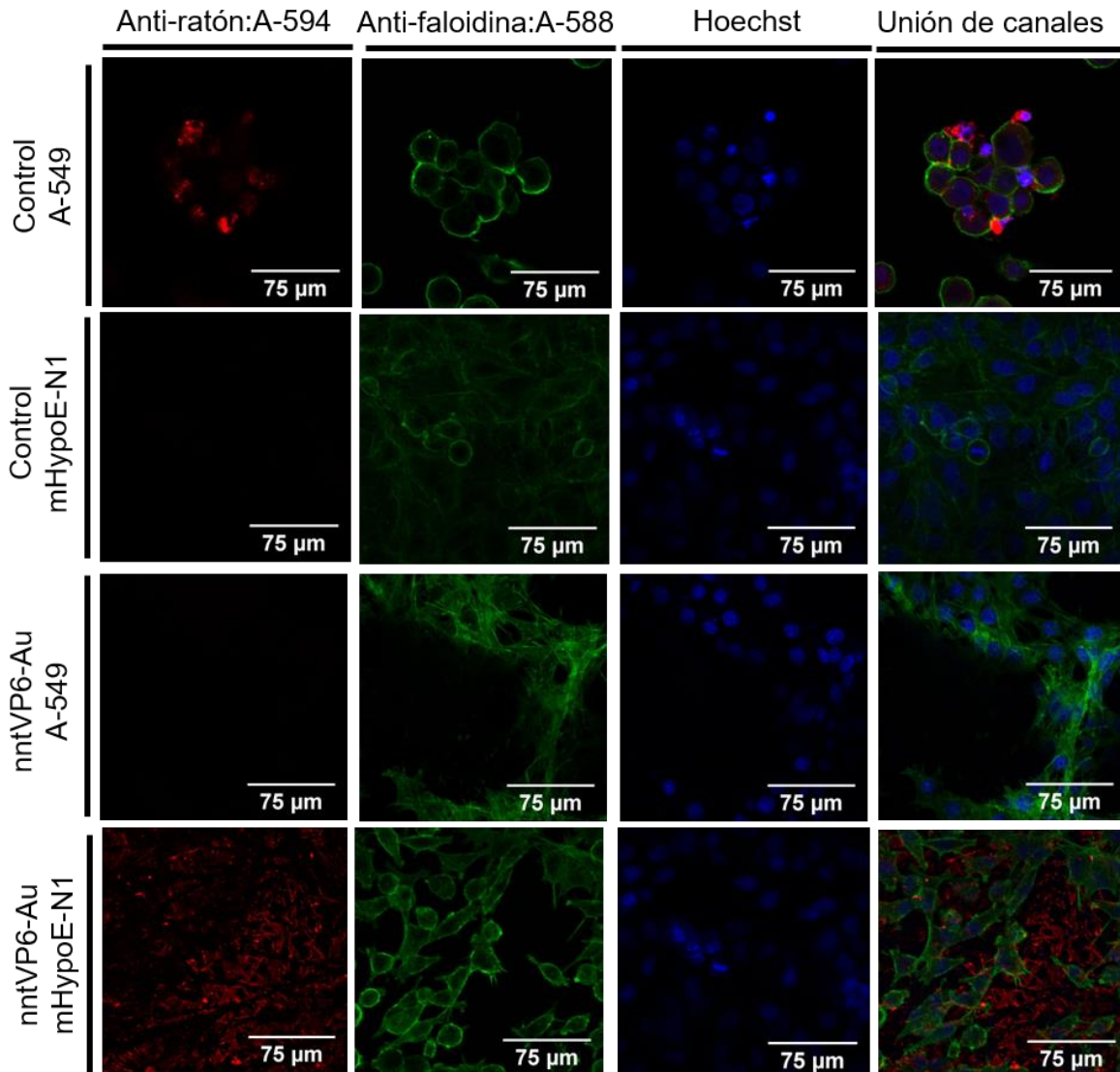


**Figura 22.** Células *mHypoE-N1* expuestas a  $31.5 \mu\text{g cm}^{-2}$  de *nntVP6*, *nnVP6-Au* o en ausencia del nanomaterial como control. La figura muestra que los *nntVP6* y *nntVP6-Au* resultan inocuos para células *mHypoE-N1*. Cinética de a) proliferación celular normalizada, b) consumo de glucosa, c) producción de lactato, d) consumo de glutamina, e) producción de glutamato. f) Citotoxicidad medida a través de la actividad de LDH a las 72 h de cultivo. g) Producción relativa de ROS a las 72 h de cultivo (n = 3). Las barras de error representan desviaciones estándar o diferencia entre experimentos. (\*) p < 0.05, (\*\*) p < 0.01.



**Figura 23.** Células A-549 expuestas a  $31.5 \mu\text{g cm}^{-2}$  de nntVP6, nntVP6-Au o en ausencia de nanomateriales como control. La figura muestra que los nntVP6 y nntVP6-Au resultan inocuos para células A-549. Cinética de a) proliferación celular normalizada, b) consumo de glucosa, c) producción de lactato, d) consumo de glutamina, e) producción de glutamato. f) Citotoxicidad medida a través de la actividad de LDH a las 72 h de cultivo. g) Producción relativa de ROS a las 72 h de cultivo. (n = 3). Las barras de error representan desviaciones estándar o diferencia entre experimentos. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ .

Los ensayos de inmunocitoquímica son una poderosa herramienta para la visualización directa de proteínas celulares. Esta técnica se basa en el reconocimiento de un antígeno (proteína o parte de ésta que se quiere detectar) por parte de un anticuerpo específico conjugado a una sustancia reportera, típicamente fluorescente [252]. Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para visualizar las células creciendo sobre un sustrato de nntVP6-Au. En la Fig. 24 se muestran las micrografías de fluorescencia de células crecidas sobre nntVP6-Au usando en todos los casos el anticuerpo primario anti-ratón 255/60 que reconoce VP6 y como anticuerpo secundario un anti-ratón Alexa 594 (rojo). Además, se tiñó la actina con faloidina Alexa 588 (verde). La tinción de los ácidos nucleicos se llevó a cabo con Hoechst (azul). Como control positivo del experimento se marcaron células de insecto High Five® infectadas con una MDI de  $0.5 \text{ ufp cel}^{-1}$  con bacVP6, y se muestra a las 72 h post-infección la proteína VP6 producida por las células de insecto. Se muestran las células A-549 (Fig. 24e-h) o mHypoE-N1 (Fig. 24i-l) crecidas en ausencia y en presencia de nntVP6-Au (Fig. 24m-p) y (Fig. 24q-t), respectivamente. Cabe señalar que los nntVP6-Au no requirieron de algún tratamiento para permitir la proliferación celular en su superficie, como fue necesario para lograr el crecimiento sobre PAcVA. Esto probablemente se deba a que su estructura emula la arquitectura de la matriz extracelular, como sucede en el caso de las fibras de PLC, fibronectina y MWCNT [56-57, 61, 253]. Se sugiere un análisis más detallado sobre las interacciones entre las células y los nntVP6 y nntVP6-Au, específicamente para determinar si la unión celular depende de integrinas y la adsorción de proteínas del suero a los nntVP6-Au, como sucede en el caso de los MWCNT [253]. Nuestros resultados demuestran que las células A-549 y mHypoE-N1 son capaces de crecer sobre nntVP6-Au como sustrato, los que funcionan como un andamio conductor para el crecimiento y proliferación celular y que, a diferencia de los MWCNT y otros polímeros conductores, éstos no inducen daño celular.



**Figura 24.** Ensayos de inmunofluorescencia de las células A-549 y mHypoE-N1. Como anticuerpo primario se empleó el anticuerpo anti-ratón 255/60, que reconoce a la proteína VP6. Los anticuerpos secundarios o agentes de tinción empleados se especifican en la figura. a-d) Células High Five® infectadas con bacVP6 (MDI 0.5 ufp cel<sup>-1</sup>) a las 72 h post-infección. Células crecidas en ausencia de nntVP6-Au e-h) A-549 y i-l) mHypoE-N1. Células crecidas en presencia de 31.5 μg cm<sup>-2</sup> de nntVP6-Au m-p) A-549 y q-t) mHypoE-N1.

### Bloque III. Construcción y caracterización del μChipVP6-Au

El éxito de los andamios para la ingeniería de tejidos no sólo depende de sus componentes individuales sino del comportamiento del dispositivo en conjunto. Con base en ello, en la siguiente



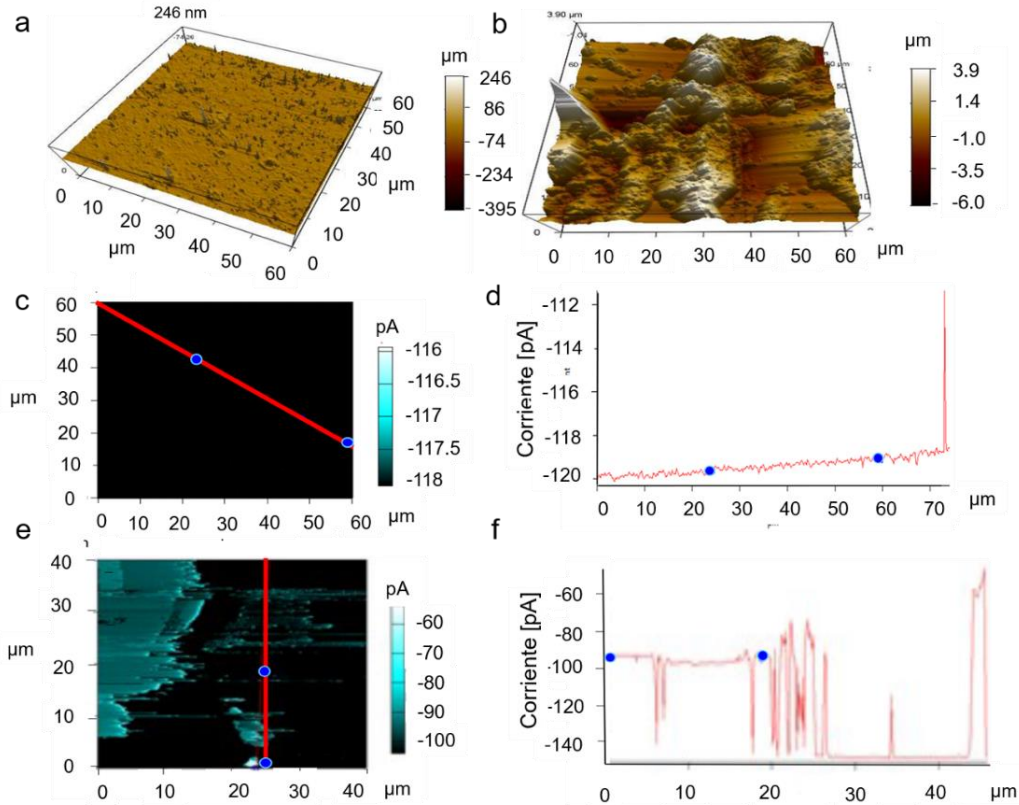
sección se presentan las propiedades topográficas y eléctricas del compuesto, así como su capacidad para servir como andamio para el crecimiento celular según se describe a continuación.

### *Análisis de las propiedades eléctricas del compuesto PAcVA+nntVP6-Au*

Con objeto de explorar las propiedades eléctricas del compuesto PAcVA-nntP6-Au y con ello, su uso potencial como estimulador eléctrico neural, se depositó  $1 \text{ mg cm}^{-2}$  de nntVP6-Au sobre películas de PAcVA y se analizaron tanto su topografía, como sus propiedades eléctricas. Los resultados se muestran en la Fig. 25.

Como se discutió previamente, PAcVA es un material relativamente plano con microporos en su superficie (Fig. 25a). Sin embargo, la adición de nntVP6-Au cambia la topografía del material, proveyéndole elevaciones y depresiones de aproximadamente  $4 \text{ }\mu\text{m}$  (Fig. 25b). La rugosidad adquirida podría favorecer la diseminación, proliferación, transmisión de señales eléctricas, adhesión, guía y extensión de neuritas, migración celular y comunicación neural como se ha reportado en diversos trabajos [16, 52-54].

Mediante AFM por sonda conductiva, se estudió la conductividad por unidad de área del compuesto PAcVA-nntVP6-Au. El PAcVA deshidratado no conduce electricidad, como se muestra en la Fig. 25c y en su gráfico asociado (Fig. 25d), correspondiente a la línea roja de la Fig. 25c. En contraste, la presencia de nntVP6-Au genera islas de conductividad estocásticamente distribuidas en la superficie de PAcVA dada la deposición aleatoria de los nntVP6-Au, con conductividades entre  $-60$  y  $-140 \text{ pA}$  en aquellas regiones donde existe una acumulación o ausencia de nntVP6-Au, respectivamente (Fig. 25e). En la Fig. 25f, se muestra el gráfico de conductividad correspondiente a la línea roja de la Fig. 25e, en el cual se muestran las variaciones entre las zonas de alta y baja conductividad. Estos resultados muestran que la deposición de los nntVP6-Au da como resultado una distribución heterogénea a lo largo de las películas de PAcVA, provocando cortos en el circuito, lo cual supone un inconveniente en la construcción de un andamio para la estimulación eléctrica neural donde se requiere que a estimulación sea homogénea y reproducible. ¿Cómo ordenar los nntVP6-Au, intrínsecamente desordenados, para conseguir respuestas eléctricas de alta reproducibilidad?

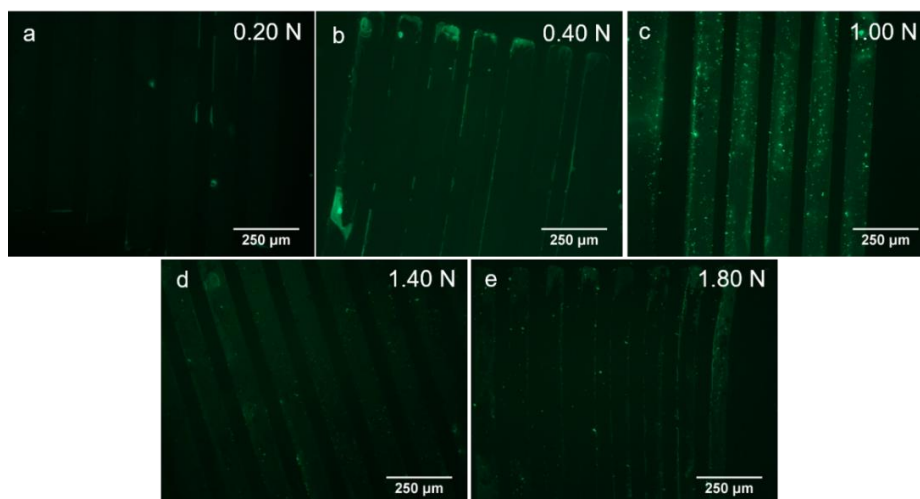


**Figura 25.** Mapa topográfico y de conductividad del compuesto PACVA+nntVP6-Au. La figura muestra que la adición de nntVP6-Au a PACVA le provee rugosidad e islas de conductividad en las zonas de acumulación de los nanocomplejos. Mapa topográfico por AFM de a) PACVA y b) del compuesto PACVA-nntVP6-Au. Análisis de conductividad de PACVA: c) región de análisis y d) gráfico de conductividad correspondiente a la línea roja trazada en (c). Mapa de conductividad del compuesto PACVA-nntVP6-Au: e) región de análisis y f) gráfico de conductividad correspondiente a la línea roja trazada en la (d). Las escalas de color a la derecha en los mapas topográficos y de conductividad indican la profundidad y corriente, respectivamente.

Diversas estrategias para la construcción de arreglos de multielectrodos (MEAs) se han llevado a cabo. Por ejemplo, Gupta et al. (2016) han logrado la alineación de MWCNT en una matriz de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante la aplicación de una tensión alterna o pulsos de corriente. Sus resultados demostraron que el alineamiento de los MWCNT mejora significativamente la conductividad eléctrica direccional [254]. En el presente trabajo se descartó esta metodología, ya que el paso de corriente podría afectar la estructura proteínica de los nntVP6. Otra estrategia para el alineamiento de MWCNT empleada en la fabricación de MEAs ha sido la deposición química de vapor asistida por plasma mediante microondas, con la cual se logran arreglos conductores de alta resolución espacial, sin embargo, esta técnica de microfabricación resulta costosa y requiere de altas temperaturas que comprometen la integridad de VP6 [255]. Otra alternativa es la impresión por

microcontacto, una forma de litografía suave donde se estampan monocapas de un material en la superficie de un sustrato [256]. La impresión por microcontacto ha resultado exitosa para el estampado de patrones de CNT en resinas de acrílico, donde pese a la baja conductividad del acrílico, el contacto entre los CNT depositado en patrones predeterminados provee al material de una conductividad equivalente a otras mezclas de CNT y polímero de la literatura según lo reportado por [257].

A diferencia de las técnicas mencionadas, la impresión por microcontacto puede llevarse a cabo a temperatura ambiente, es poco costosa y no requiere de equipo sofisticado. Por ello, con objeto de realizar un depósito más homogéneo de nntVP6-Au sobre películas de PAcVA de conductividad eléctrica continua y reproducible, se comenzó por estandarizar las condiciones de impresión por microcontacto sobre PAcVA usando gelatina marcada con fluoresceína como molécula modelo. Como se demostró anteriormente, PAcVA posee una baja fuerza de fractura y alta deformación a los esfuerzos, por ello fue necesario realizar pruebas variando la fuerza aplicada. Los resultados se muestran en la Fig. 26. Con una fuerza de 0.2 - 0.4 N se obtienen patrones de impresión poco definidos (Fig. 26a-b), mientras que con 1.0-1.4 N se mejora la definición en las impresiones (Fig. 26c-d) y finalmente, con una fuerza de 1.8 N PAcVA se deforma de manera irreversible generando patrones de microimpresión difusos (Fig. 26e). Con este experimento fue posible estandarizar la fuerza necesaria para establecer un microcontacto que permitiera la transferencia exitosa de un patrón determinado de una proteína modelo en PAcVA sin que éste se deformara o fracturara. Estas condiciones fueron luego extrapoladas para las microimpresiones con nntVP6-Au.

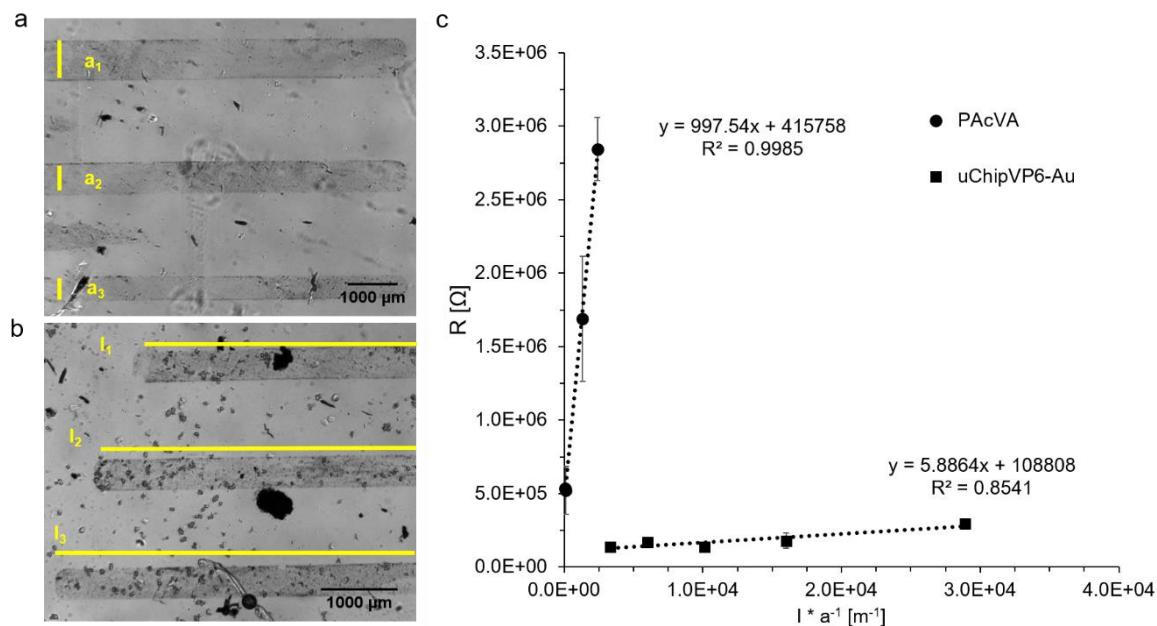


**Figura 26.** Micrografías de fluorescencia de microimpresiones de gelatina marcada con fluoresceína sobre películas de PAcVA con diferentes fuerzas aplicadas. La figura muestra que aplicando una fuerza de 1.00 N es posible imprimir patrones nítidos de gelatina fluorescente sobre PAcVA. ) 0.20 N, b) 0.040 N, c) 1.00 N, d) 1.40 N, e) 1.80 N.

Para caracterizar la resistividad de las impresiones de nntVP6-Au sobre películas de PAcVA, se imprimieron canales rectos de 150  $\mu\text{m}$  de profundidad y de largo ( $l_n$ ) (Fig. 27a) y ancho ( $a_n$ ) (Fig. 27b) variable, donde “n” es el valor de la medición. La resistividad se define como la resistencia eléctrica específica de cada material para oponerse al paso de una corriente eléctrica. La estimación experimental de la resistividad se basa en la ley de Pouillet (Ec. 8), que establece que la resistencia de un material (R) es directamente proporcional a  $l$  y a la resistividad ( $\rho$ ), e inversamente proporcional al área (a) [259]. En la superficie de los canales se colocaron electrodos y se obtuvieron los perfiles de impedancia a frecuencia variable. A frecuencias menores de 1 kHz, la impedancia es igual a la resistencia al ser despreciable la reactancia, el componente imaginario de la impedancia [260]. Se graficaron los valores de resistencia (o impedancia) medidos a 20 Hz como función del área transversal. Con base en ello, en el gráfico  $R$  versus  $l$  a  $l^{-1}$  la pendiente de la curva determina la resistividad del material. Para PAcVA se obtuvo un valor de  $997.54 \text{ m}^{-1}$ , mientras que PAcVA recubierto canales impresos usando una solución de  $2.1 \text{ mg mL}^{-1}$  de nntVP6-Au fue de  $5.8864 \text{ m}^{-1}$  (Fig. 27c). Nuestros resultados muestran que la adición de nntVP6-Au disminuye hasta 170 veces la resistividad de la superficie de PAcVA. Estos resultados demuestran que, bajo nuestras condiciones experimentales, existe un camino continuo de corriente a través del depósito de nntVP6-Au que completa el circuito. Lo que implica que con estas condiciones de fuerza y concentración de nntVP6-Au existe a lo largo de todo el camino al menos un contacto molécula-molécula. Con estas condiciones de impresión con nntVP6-Au se provee al hidrogel PAcVA caminos de conductividad que pueden ser diseñados a voluntad.

Una vez establecidas las condiciones de microimpresión de los nntVP6-Au sobre PAcVA y caracterizada la resistividad de los materiales, se imprimieron circuitos electrónicos en serie (Fig. 28a) y paralelo (Fig. 28b). Como se aprecia en ambas imágenes los caminos de nntVP6-Au están bien definidos, sin contaminación entre los canales y con algunos agregados de oro. Se imprimieron ambos patrones para tener respuestas eléctricas diferenciables entre ellos. Por ejemplo, en los circuitos en serie, los nntVP6-Au están conectados de manera sucesiva entre una misma entrada y salida de corriente y las terminales exhiben en todos los puntos la misma cantidad de corriente con la misma intensidad. El arreglo en serie nos permite evaluar la eficiencia de las microimpresiones pues si un elemento de los conectados en serie deja de funcionar (no se establece contacto eléctrico entre al menos un par de nntVP6-Au), se interrumpirá el flujo en todo el circuito. Por otro lado, en los circuitos en paralelo, existen diversas ramas o caminos de nntVP6-Au tienen conectadas sus entradas a un mismo punto del circuito y sus salidas a otro mismo punto del circuito. Si bien en los circuitos en paralelo la resistencia es mayor que en los circuitos en serie, tienen la ventaja de que si existe un corto

en una de las ramas (discontinuidad en los contactos entre los nntVP6-Au), el flujo de corriente puede continuar por las demás.

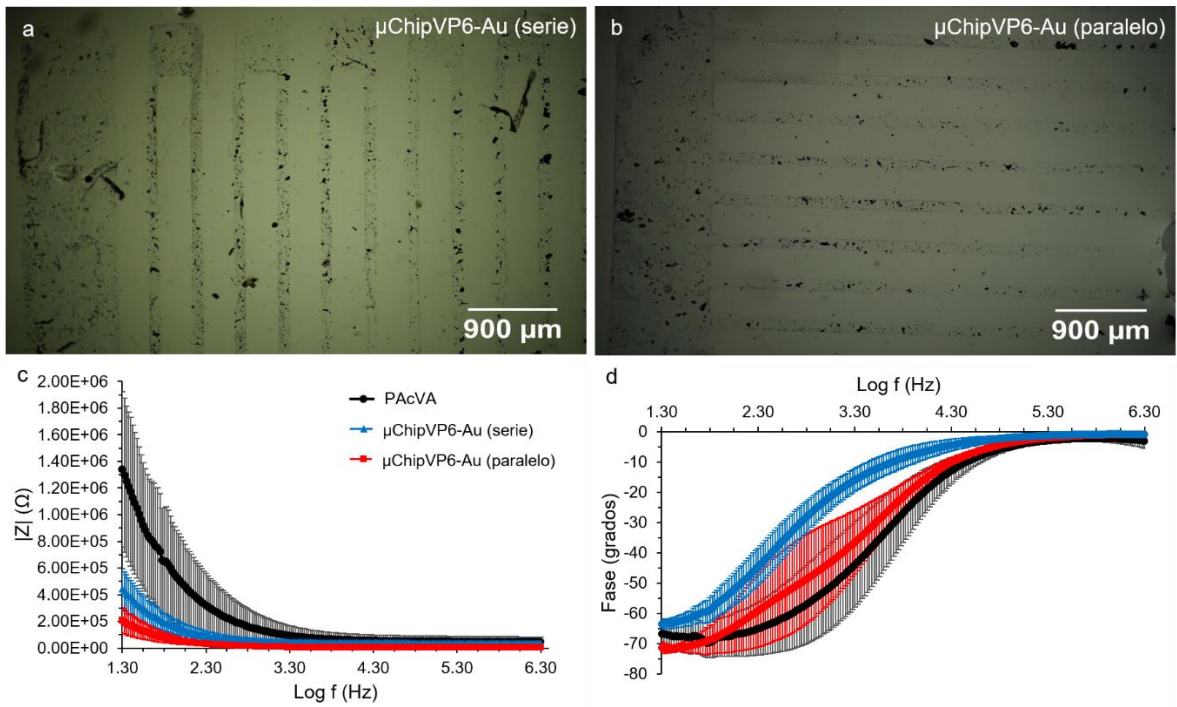


**Figura 27.** Análisis de la resistividad de la microimpresión de nntVP6-Au en películas de PACVA. La figura muestra que la impresión de circuitos de nntVP6-Au sobre PACVA reduce su resistividad hasta 170 veces. Microimpresión de caminos de nnVP6-Au de a) ancho ( $a_n$ ) y b) longitud ( $l_n$ ) variable, donde “n” es el valor de la medición. c) Gráfico de resistencia ( $R$ ) versus  $l$  entre el área transversal ( $a^{-1}$ ), donde la pendiente determina la resistividad del material. En el gráfico se muestran los valores obtenidos para películas de PACVA con y sin recubrimiento de nntVP6-Au. ( $n = 3$ ). Las barras de error representan la desviación estándar de experimentos independientes.

En el presente trabajo se midió la impedancia ( $Z$ ) y la fase en los circuitos como funciones de la frecuencia ( $f$ ) de PACVA y de cada uno de los circuitos en un rango logarítmico de 1.3 - 6.3 Hz. La impedancia extiende el concepto de resistencia a los circuitos de corriente alterna, y posee tanto magnitud como fase [259]. En la Fig. 28c se aprecia que existe un orden de magnitud de diferencia entre la impedancia de PACVA ( $1.3 \pm 0.6 \times 10^6 \Omega$ ) y los  $\mu$ ChipVP6-Au en serie ( $4.0 \pm 1.0 \times 10^6 \Omega$ ) y paralelo ( $2.0 \pm 1.0 \times 10^6 \Omega$ ) a una frecuencia de 20 Hz. Estos resultados demuestran que bajo nuestras condiciones experimentales de impresión por microcontacto se lograron diferencias estadísticamente significativas entre la conductividad de PACVA sin recubrir, y cada uno de los circuitos en serie o paralelo de PACVA con  $\mu$ ChipVP6-Au. Como se esperaba, el material menos conductor fue el hidrogel hidratado PACVA, seguido por el  $\mu$ ChipVP6-Au en serie y finalmente el  $\mu$ ChipVP6-Au en

paralelo, diferencia que es más notoria a frecuencias bajas. Cabe resaltar que en el caso del  $\mu\text{ChipVP6-Au}$  en serie, se logró la continuidad de corriente en un camino de más de 8 cm de longitud con  $\text{nntVP6-Au}$  cuya longitud promedio se encuentra entre 1 - 3  $\mu\text{m}$ , logrando así formar un tipo de microcanales biorganometálicos cuya forma y tamaño pueden controlarse a voluntad para diversas aplicaciones. Por último, se midió el desfase como función de la frecuencia en los distintos materiales. Los resultados se muestran en la Fig. 28d donde se observa que la fase es negativa, lo que demuestra que los materiales tienen un comportamiento capacitivo dado que la corriente adelanta al voltaje.

En síntesis, se caracterizó eléctricamente el  $\mu\text{ChipVP6-Au}$ , en arreglos de serie y paralelo, obteniendo comportamientos de impedancia y desfase estadísticamente distinguibles entre ellos. Gracias a la realización de este trabajo, ahora contamos con dos tipos de circuitos electrónicos biorganometálicos con comportamientos eléctricos altamente reproducibles con los que se espera sea posible estimular eléctricamente un cultivo neuronal crecido en la superficie del  $\mu\text{ChipVP6-Au}$ .



**Figura 28.** Circuitos electrónicos de  $\text{nntVP6-Au}$  impresos sobre películas de PACVA para formar el  $\mu\text{ChipVP6-Au}$ . La figura muestra que es posible imprimir circuitos bioelectrónicos sobre PACVA con un comportamiento capacitivo que generan señales eléctricas de alta reproducibilidad. Circuitos en a) serie y b) paralelo. c) Gráfico de impedancia ( $Z$ ) versus frecuencia ( $f$ ). d) Gráfico de fase (grados) versus frecuencia ( $f$ ). ( $n = 10$ ). Las barras de error representan la desviación estándar de experimentos independientes.

## *Análisis de biocompatibilidad del $\mu$ ChipVP6-Au*

El diseño de una interfaz entre un tejido vivo y un dispositivo electrónico debe considerar las diferencias estructurales y químicas entre estos dos sistemas. Los tejidos vivos son blandos, mientras que los dispositivos electrónicos suelen ser rígidos. El tejido vivo conduce las cargas por transporte iónico, mientras que los dispositivos electrónicos conducen electrones.

El  $\mu$ ChipVP6-Au posee tanto elementos suaves como el hidrogel y los nntVP6, como elementos rígidos como las AuNPs. La interacción electrodo-neurona es fundamental para garantizar tanto la viabilidad de las células como la efectividad del contacto eléctrico. Por ello, células A-549 y mHypoE-N1 se crecieron sobre el  $\mu$ ChipVP6-Au (en paralelo) y se compararon con el crecimiento en placas comerciales tratadas con poli-L-lisina y laminina como se describió previamente, cuya proliferación se utilizó como criterio de normalización. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 29.

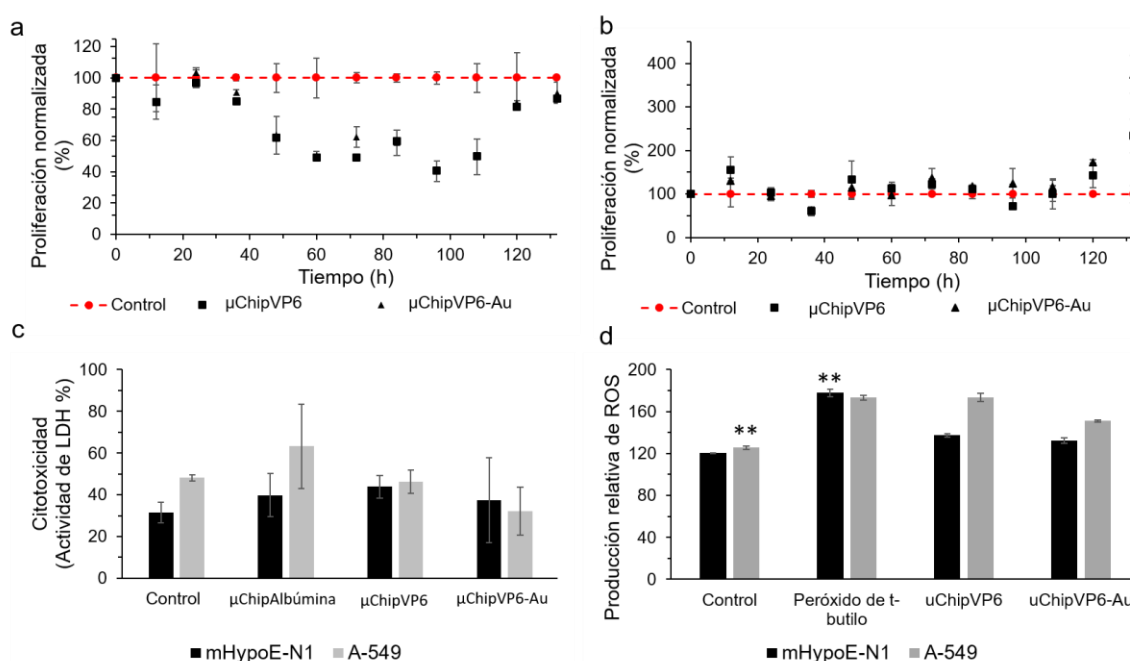
En las Fig. 29a se muestra la cinética de proliferación, medida como la actividad metabólica normalizada de la línea mHypoE-N1. La proliferación de las células mHypoE-N1 durante las primeras 108 h del cultivo fue menor sobre el  $\mu$ ChipVP6 y el  $\mu$ ChipVP6-Au comparado con los cultivos control sobre la placa comercial. Después de las 108 h, la proliferación sobre los  $\mu$ Chips fue más rápida que en los cultivos control, hasta alcanzar concentraciones celulares similares. Este perfil de proliferación es comparable con el de la Fig. 13f, donde las células crecidas únicamente sobre PAcVA requieren de un tiempo de adaptación al sustrato para después proliferar a niveles comparables al control. En los tiempos finales de la cinética, la proliferación fue incluso mejor que en el control, lo que sugiere que los nntVP6 y nntVP6-Au podrían beneficiar al cultivo posiblemente por su estructura de fibras de proteína que mimetizan la matriz extracelular.

En contraste, no se observó diferencia en la proliferación de las células A-549 crecidas sobre los  $\mu$ Chips hasta las 108 h de cultivo. Posteriormente, las células crecidas sobre el  $\mu$ ChipVP6 y el  $\mu$ ChipVP6-Au alcanzaron concentraciones celulares dos y cuatro veces más altas, respectivamente, que las alcanzadas en las placas de cultivo control.

En este caso también se aprecia un perfil parecido a la proliferación de esta línea sobre PAcVA a tiempos tempranos del cultivo. Después de las 108 h de cultivo, la proliferación de A-549 sobre el  $\mu$ ChipVP6-Au es cuatro veces mayor que la placa comercial y dos veces mayor que en PAcVA (Fig. 19g). Estos resultados reiteran que los nntVP6-Au favorecen la proliferación celular en el  $\mu$ ChipVP6-Au con respecto a PAcVA.

No se encontró diferencia significativa en la liberación de LDH en cultivos celulares crecidos en el  $\mu$ ChipVP6 o en el  $\mu$ ChipVP6-Au, como tampoco en el control negativo de  $\mu$ ChipAlbúmina,

(películas de PACVA con albúmina como proteína irrelevante impresa por microcontacto) a las 72 h (Fig. 29c). Estos resultados demuestran que el menor crecimiento celular de mHypoE-N1 no era ocasionado por muerte celular y que los  $\mu$ Chips no son citotóxicos para esta línea celular. No se observó aumento en el nivel intracelular de ROS en las células mHypoE-N1 cultivadas en placas o en los  $\mu$ ChipVP6 o  $\mu$ ChipVP6-Au, sino únicamente en el control positivo con peróxido de *t*-butilo. En contraste, las células A-549 mostraron estrés oxidante cuando se crecen sobre los  $\mu$ ChipVP6 y  $\mu$ ChipVP6-Au (Fig. 29d). Se realizarán experimentos posteriores para elucidar los mecanismos moleculares por los que las células A-549, a diferencia de las mHypoE-N1, presentan estrés oxidante bajo nuestras condiciones experimentales, con el fin de garantizar la seguridad del  $\mu$ ChipVP6-Au.

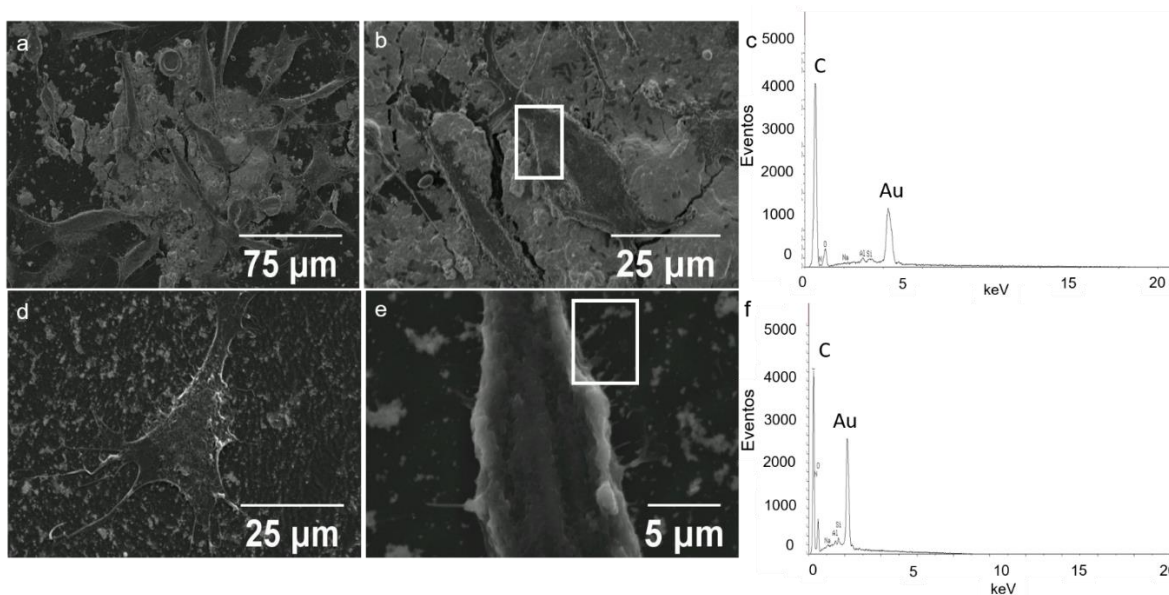


**Figura 29.** Proliferación celular sobre el  $\mu$ ChipVP6 y  $\mu$ ChipVP6-Au. La figura muestra que el  $\mu$ ChipVP6 y el  $\mu$ ChipVP6-Au funcionan como andamios para el crecimiento de células de mamífero. a) Proliferación celular en los sustratos indicados en la figura de a) mHypoE-N1 y b) A-549. c) Citotoxicidad medida a través de la actividad de LDH a las 72 h de cultivo (n = 3). d) Producción relativa de ROS de células creciendo sobre los sustratos indicados (n = 3). Las barras de error representan desviaciones estándar entre experimentos. (\*\*)  $p < 0.01$ .

Para visualizar las células crecidas en el  $\mu$ ChipVP6-Au, éstas se fijaron y deshidrataron como se describió previamente y se observaron por SEM. En las Figs. 30a y 30b se muestran células A-549 crecidas sobre el  $\mu$ ChipVP6-Au a dos diferentes aumentos. En la Fig. 30b se ha seleccionado una sección de la imagen por un rectángulo blanco de la cual se obtuvo el análisis elemental semicuantitativo mediante XAS para determinar el perfil elemental mostrado en la Fig. 30c, donde



como era de esperarse los dos elementos principales son el C y el Au. En las Figs. 30d y 30e se muestran células mHypoE-N1 crecidas sobre el  $\mu$ ChipVP6-Au. En la Fig. 30e se ha resaltado la sección de la que se obtuvo el espectro de XAS, donde también los elementos mayoritarios son el C y el Au (Fig. 30f). Ambos tipos celulares presentaron las clásicas proyecciones y formaron estructuras de adherencia a todo el sustrato, debido a que todo el  $\mu$ ChipVP6-Au fue recubierto con poli-L-lisina y laminina. Se realizarán experimentos posteriores donde el  $\mu$ ChipVP6-Au no sea tratado, para caracterizar la unión célula- $\mu$ ChipVP6-Au y el esparcimiento celular.



**Figura 30.** Imágenes de SEM y análisis elemental por XAS de células crecidas sobre el  $\mu$ ChipVP6-Au. La figura muestra que las células que crecen sobre el  $\mu$ ChipVP6-Au conservan su fenotipo fibroblastoide, asimismo que los elementos mayoritarios en la muestra son carbono y oro. a-b) Micrografías electrónicas de células A-549 crecidas sobre el  $\mu$ ChipVP6-Au. c) Análisis elemental por XAS de la sección señalada en b). d-e) Micrografías electrónicas de células mHipoE-N1 crecidas sobre el  $\mu$ ChipVP6-Au. c) Análisis elemental por XAS de la sección señalada en e). En ambos casos el análisis experimental muestra al C y Au como los elementos mayoritarios en la imagen, los picos menores corresponden a silicio, aluminio y sodio en concentraciones despreciables.

#### **Bloque IV. Implantación intracraneal del $\mu$ ChipVP6-Au en un modelo murino de Parkinson**

Se ha reportado que dispositivos que son exitosos *in vitro*, no necesariamente lo son en condiciones *in vivo*. Por ello, se realizó una prueba de concepto con el  $\mu$ ChipVP6-Au para evaluar su potencial como implante intracraneal, así como para la administración controlada de L-DOPA en un

modelo murino de Parkinson. Primeramente fue de interés conocer si un grupo de ratones podía sobrevivir con el  $\mu$ ChipVP6-Au implantado en el cerebro, el efecto *in vivo* de los componentes (PAcVA y nntVP6-Au) del  $\mu$ ChipVP6-Au, posibles efectos secundarios, la respuesta de apoptosis o necrosis asociada, y finalmente, la posibilidad de revertir las alteraciones motoras típicas de la enfermedad de Parkinson (EP) mediante la administración *in situ* de L-DOPA a través del  $\mu$ ChipVP6-Au y comparar la respuesta obtenida con la administración de la misma dosis de droga administrada vía intraperitoneal.

Como modelo de estudio, se eligió la EP, que es una enfermedad degenerativa del sistema nervioso central. La EP se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas y la desregulación en el control del movimiento [261]. La EP está ampliamente extendida y actualmente afecta entre 4.1 a 4.6 millones de personas mayores de 50 años. En México se estima que existen entre 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes [262]. Actualmente no existe un tratamiento con la capacidad de revertir el proceso degenerativo y progresivo en la EP [263]. Los tratamientos convencionales tienen un efecto estrictamente en el control sintomático [264]. El fármaco más empleado para su tratamiento es la L-DOPA, la cual posee la desventaja de que debe ser administrada frecuentemente y se han reportado múltiples efectos secundarios como el riesgo de presentar alteraciones psiquiátricas y es posible la reaparición de los síntomas. En pacientes que no son controlados con las opciones farmacológicas convencionales se han aplicado otros tratamientos como la estimulación eléctrica cerebral profunda mediante un electrodo que es implantado por cirugía estereotáxica, una extensión conductora y un generador de pulsos subcutáneo, similar a un marcapasos [265]. Por ello, es necesario encontrar una opción terapéutica que ofrezca un control sintomático, minimice los efectos adversos, sea poco invasivo, económico y eficiente. Con base en ello, se decidió evaluar el potencial del  $\mu$ ChipVP6-Au aprovechando sus propiedades de biocompatibilidad, capacidad para liberar fármacos y conductividad eléctrica demostradas en este trabajo.

Primeramente, se evaluó la biocompatibilidad *in vivo* del  $\mu$ ChipVP6-Au. Para ello, grupos de 10 ratones se intervinieron quirúrgicamente y mediante cirugía estereotáxica se implantó el dispositivo en la corteza cerebral de un modelo murino. Imágenes del procedimiento se muestran en la Fig. 31a-e. Como un primer acercamiento se evaluó la sobrevivencia de los ratones al implante intracraneal, la aparición de efectos secundarios, así como la respuesta apoptótica o necrótica asociada a la implantación. Para ello, 2 ratones de cada grupo se sacrificaron al quinto día post-implantación y se realizaron cortes histológicos y una tinción con hematoxilina-eosina. La hematoxilina, al oxidarse forma hemateína, una molécula catiónica que tiñe de color azul-púrpura la cromatina del núcleo, agregaciones ribosomales del citoplasma y otras estructuras ácidas. La eosina, por otro lado, tiñe

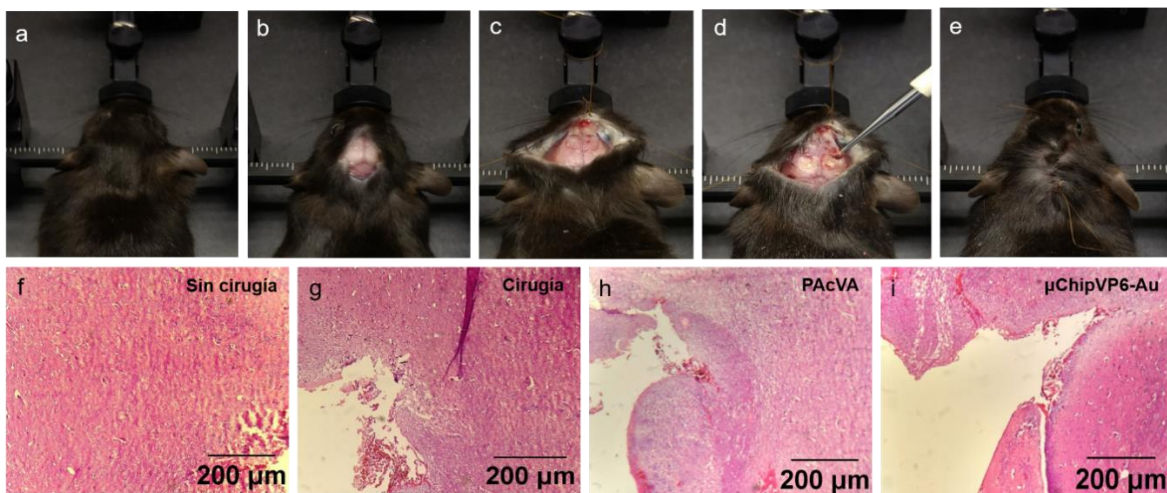
componentes básicos como el citoplasma de color rosa dada gracias a su naturaleza aniónica, como el citoplasma [266]. Esta tinción, permite distinguir la presencia de eosinófilos, un tipo de leucocitos, cuyas principales funciones son la defensa contra parásitos, respuestas alérgicas e inflamación de tejidos. La eosinofilia es frecuente durante el desarrollo de tumores cerebrales. Los eosinófilos se tiñen de color rojo intenso con la eosina [267].

Una respuesta común a la implantación de dispositivos en el cerebro es la formación de tejido cicatricial que dificulta la difusión de metabolitos que se originan a partir de tejido necrótico y desencadena una reacción inflamatoria. La tinción hematoxilina-eosina permite distinguir tanto tejido necrótico como apoptótico. La necrosis que generalmente resulta de una lesión, y se caracteriza por la aparición de áreas de condensación desigual de cromatina y cariolisis (disolución de la cromatina). Mientras que en la apoptosis la cromatina nuclear se condensa en la periferia nuclear, y la cromatina condensada a menudo adquiere una forma cóncava que se asemeja a una media luna. En la apoptosis existe una lisis mayor de DNA que en la necrosis y además el DNA en la cromatina condensada presenta hipercromasia marcándose intensamente con hematoxilina en azul-púrpura. Además, una ventaja de esta tinción es que permite evaluar inflamación tisular, mediante el número total de fibras nucleadas centrales y la variación del diámetro celular. Estas características hacen que la tinción hematoxilina-eosina sea ampliamente usada en los laboratorios de patología para el diagnóstico de enfermedades [267].

En la Fig. 31f se muestra un corte histológico de la corteza cerebral de ratones los cuales no fueron sometidos a ningún procedimiento quirúrgico. Como se aprecia en la imagen, existe cierta coloración rojiza correspondiente a la cantidad basal de eosinófilos y no se aprecian rasgos necróticos. En la Fig. 31g, se aprecia una mínima inflamación que no resulta patológica, resultado del procedimiento quirúrgico. En la Fig. 31h y Fig. 31i se muestra el tejido de la periferia de implantación de PAcVA y el  $\mu$ ChipVP6-Au, respectivamente. En ambas imágenes existe una cantidad comparable de eosinófilos (rojos) con respecto al grupo control que fue sometido al procedimiento quirúrgico. No se observaron señales de apoptosis o necrosis (azul) en mayor cantidad que en la Fig. 31g donde se realizó el mismo proceso quirúrgico, exceptuando la deposición del implante. En otras palabras, no se aprecia una inflamación patológica o necrosis asociada a la presencia de PAcVA o el  $\mu$ ChipVP6-Au, superior a la causada por el procedimiento quirúrgico *per sé*. Se sugieren ensayos de inmunohistoquímica adicionales para evaluar la activación de microglía y reclutamiento de astrocitos para estudiar la posible formación de una cicatriz glial y su impacto en la salud de los ratones.

Posteriormente se evaluó la capacidad del  $\mu$ ChipVP6-Au para emplearse como un implante intracraneal para la liberación controlada de L-DOPA en un modelo murino de Parkinson. Se han desarrollado varios modelos para inducir el fenotipo de la EP mediante neurotoxinas que funcionan

como agentes destructores de las neuronas dopaminérgicas. En el modelo más extendido se emplea la neurotoxina MPTP la cual es la única neurotoxina dopaminérgica capaz de producir un cuadro clínico en monos y en humanos similar a la EP. Si bien el modelo preclínico más empleado para el estudio de la EP son los monos, se ha demostrado que el uso de ratones es un buen acercamiento pues aporta información relevante y comparable en humanos, además de simplificar los procedimientos y abaratar los costos del mantenimiento de las colonias. Con base en lo reportado en [188], se administró MPTP vía intraperitoneal como se describe en materiales y métodos donde se espera una muerte de aproximadamente el 90% de las neuronas dopaminérgicas a los 7 días de haber sido administrada la droga. De acuerdo a nuestros resultados, logramos observar diferencias estadísticamente significativas en la actividad espontánea, movimiento grueso y movimiento fino de manera comparable a lo reportado por [188].



**Figura 31.** Implantación del PAcVA y el  $\mu$ ChipVP6-Au en corteza cerebral de ratón y tinción de hematoxilina-eosina de los cortes histológicos asociados. La figura muestra que la implantación en la corteza cerebral de ratón de PAcVA o el  $\mu$ ChipVP6-Au no induce apoptosis o necrosis al quinto día post-implantación. a) Posicionamiento del ratón en el equipo estereotáxico. b) Incisión longitudinal del periostio. c) Visualización del Bregma. d) Trepanación craneal. e) Sutura de tegumentos. Cortes histológicos de corteza cerebral de ratones f) sin procedimiento quirúrgico, g) 5 días posteriores a la cirugía sin implantación. Cortes con implantes de 2 mm<sup>2</sup> h) de PAcVA y del i)  $\mu$ ChipVP6-Au a los 5 días post-implantación (n = 8).

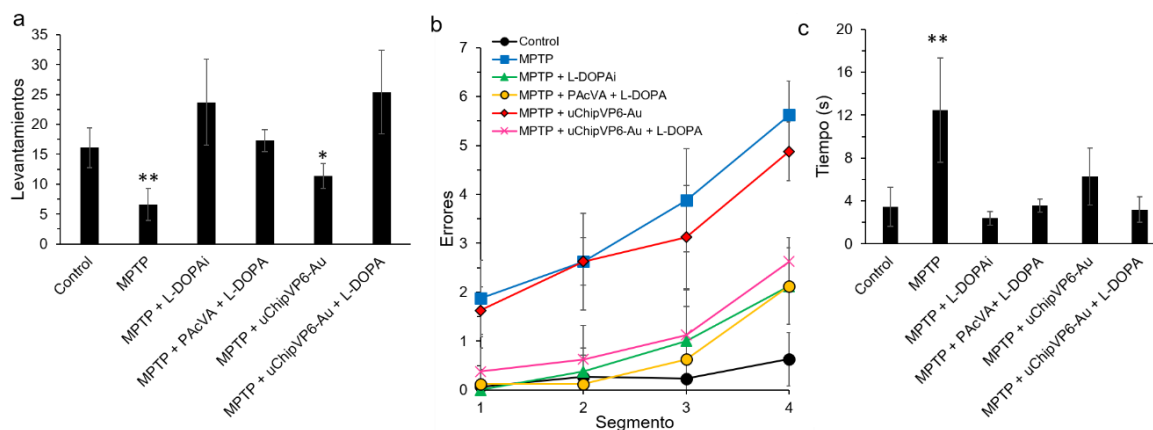
Grupos de 8 ratones Parkinsonianos se intervinieron quirúrgicamente para la implantación tanto de PAcVA como del  $\mu$ ChipVP6-Au cargados con 120 mg kg<sup>-1</sup> (del peso del ratón) con L-DOPA y sin fármaco para evaluar el efecto del material *per sé*. Como blancos del experimento se emplearon tanto ratones sanos (sin MPTP) como Parkinsonianos, los cuales carecían del implante. Los ratones

se sometieron a pruebas de comportamiento donde se evaluó la actividad espontánea, la coordinación motora gruesa y la coordinación motora fina. La actividad espontánea se determinó midiendo el número de veces en que los ratones se levantaban o sentaban sobre sus patas traseras cada 3 min en un cilindro de vidrio como se muestra en la Fig. 7a de la sección de materiales y métodos. Los resultados se muestran en la Fig. 32a. De acuerdo a nuestros datos, mientras que un ratón sano se levanta en sus patas traseras un promedio de 16 veces, tras la administración de MPTP se levantan en promedio 5 veces cada 3 min. La coordinación motora gruesa se midió cuantificando el número de errores que los ratones cometían al pasar por una pista con obstáculos de anchura variable de 12, 8, 4 y 2 cm (denotados como segmentos 1, 2, 3, y 4, respectivamente en la Fig. 32b) cada uno de 25 cm de largo hasta completar un camino de 1 m. Cada error se definió como un falso en la colocación de la pata del ratón en los alambres de la pista, o caída de ésta (Fig. 7b de la sección de materiales y métodos). Finalmente, la coordinación motora fina se determinó con base en el tiempo en que tardaba el ratón en retirarse una etiqueta pegada a su hocico como se muestra en la Fig. 6c de la sección de materiales y métodos. Los resultados se muestran en la Fig. 32c.

Se administraron  $120 \text{ mg kg}^{-1}$  de L-DOPA vía intraperitoneal o intracraneal a través tanto del PAcVA como del  $\mu\text{ChipVP6-Au}$ . A los 8 días tras haber iniciado el tratamiento, la actividad espontánea alcanzó niveles comparables a los ratones sanos. Los individuos a los que se les implantó el  $\mu\text{ChipVP6-Au}$  sin L-DOPA presentaron una actividad espontánea comparable a la de los ratones Parkinsonianos sin intervención quirúrgica. Resultados similares se obtuvieron para la coordinación motora gruesa y fina. Como era de esperarse, los ratones tuvieron un mayor número de errores en la pista de obstáculos a medida que el ancho de ésta se reducía. De acuerdo con nuestros resultados, los ratones Parkinsonianos y los ratones implantados con el  $\mu\text{ChipVP6-Au}$  o PAcVA sin L-DOPA tienen un comportamiento comparable. Por el contrario, los ratones a los que se les administró L-DOPA vía intraperitoneal o intracraneal mediante el implante de PAcVA o del  $\mu\text{ChipVP6-Au}$ , tuvieron un comportamiento similar a los ratones sanos. Estos resultados demuestran, por un lado, que los efectos observados se deben a la L-DOPA y no a los materiales implantados en sí mismos. Por otro lado, el hecho de que se obtengan resultados similares con la administración vía intraperitoneal e intracraneal en el mismo periodo de tiempo, sugiere que con la administración de L-DOPA *in situ* se requiere 90% menos fármaco, extrapolando la eficiencia de liberación de PAcVA (10% de GA) donde para fluoresceína, gentamicina y heparina es inferior al 10% del total de la droga inmovilizada. Esto podría resultar beneficioso dado que mediante el implante se administra al paciente una dosis localizada y 10 veces menor de L-DOPA. Hipotetizamos que con esta vía de administración se podrían prolongar los efectos de la L-DOPA en el mediano y largo plazo y retrasar o evitar la reaparición de las alteraciones [268, 269], aunque se requieren más estudios adicionales que lo confirmen. Finalmente,

estos resultados también demuestran que los nntVP6-Au no juegan un papel significativo en la motricidad de los ratones bajo nuestras condiciones experimentales.

Asimismo, la salud de los ratones se monitoreó durante dos meses post-implantación, sin efectos secundarios observables resultado de la implantación de PAcVA o el  $\mu$ ChipVP6-Au. En este periodo no se registró la muerte de ningún ratón implantado. Estos resultados demuestran que el  $\mu$ ChipVP6-Au es un buen candidato para la ingeniería de tejido neural al ser biocompatible y poder liberar fármacos de manera controlada y localizada. Se realizarán estudios adicionales para evaluar su capacidad como andamio para el cultivo de células troncales y explorar su potencial como material para terapias de reemplazo celular, así como la liberación de factores de crecimiento que permitan la diferenciación del cultivo *in situ* para la reparación de tejido dañado.



**Figura 32.** Pruebas de comportamiento de ratones Parkinsonianos (MPTP) tratados con 120 mg kg<sup>-1</sup> de L-DOPA administrada vía intraperitoneal (L-DOPA<sub>i</sub>) o intracraneal (L-DOPA) a través del implante PAcVA o el  $\mu$ ChipVP6-Au. La figura muestra que es posible revertir las alteraciones motoras en ratones Parkinsonianos mediante la administración de L-DOPA a través del PAcVA o el  $\mu$ ChipVP6-Au implantado en corteza cerebral a los 8 días post-implantación. Como control se analizó también el efecto de PAcVA o el  $\mu$ ChipVP6-Au sin L-DOPA. a) Actividad espontánea, b) Coordinación motora gruesa, c) Coordinación motora final (n = 8). Las barras de error representan la desviación estándar. (\*) p < 0.05, (\*\*) p < 0.01.

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

### **Bloque I. Síntesis y caracterización del acetato de poli(vinil alcohol co-vinilo) (PAcVA)**

Se demostró que PAcVA es un material con propiedades interesantes que lo convierten en un buen candidato para la liberación controlada de fármacos y como andamio para el cultivo de células de mamífero. El contenido de GA se utilizó para modular el grado de entrecruzamiento, la estructura microscópica y las propiedades mecánicas y difusión iónica del hidrogel, lo que puede aprovecharse para manipular sus propiedades para mimetizar las características de diferentes tejidos blandos, que lo convierten en un excelente candidato para implantes *in vivo*. Por otro lado, se demostró que PAcVA es capaz de inmovilizar en su matriz sustancias que pueden ser lábiles a temperaturas o pH extremos y liberarlos de manera controlada en función de su grado de entrecruzamiento o pH del medio, lo que resulta en un atractivo material para la liberación controlada de fármacos. La difusión fue Fickiana a 5 y 10% de GA, pero anormal a 20% de GA, donde la estructura interna de PAcVA era más intrincada. El material obtenido al ser incoloro y translúcido permitió la observación de células durante los experimentos de crecimiento celular. Se demostró por primera vez que PAcVA puede servir como andamio para el crecimiento de células A-549 y mHypoE-N1. Ambos tipos celulares fueron capaces de adherirse al hidrogel y proliferar en él a niveles comparables con los cultivos de control, o incluso mejor. No se observó citotoxicidad ni citólisis causada por trazas GA u otros reactivos. Interesantemente el material mostró una absorción preferencial por el lactato, cuya acumulación resulta tóxica para los cultivos celulares, lo que resulta beneficioso a las células que se crecen en él.

En síntesis, fue posible modular las propiedades de PAcVA variando el contenido de GA, lo cual es útil para el diseño de nuevos materiales “a la carta” con aplicaciones biomédicas que pueden producirse de acuerdo con las necesidades específicas de cada paciente. Visualizamos su aplicación como un andamio para terapia de remplazo celular y futuras aplicaciones en la ingeniería de tejidos.

### **Bloque II. Producción de nntVP6-Au y estudio de su biocompatibilidad**

Se modificaron las condiciones de funcionalización de los nntVP6-Au para obtener nanopartículas con menor agregación, evitando el uso de agentes dispersantes, con lo que se redujo

el costo de producción de los nntVP6-Au. Se demostró que la toxicidad que se le había atribuido a los nntVP6-Au provenía de trazas del agente reductor y no de los nanocomplejos *per sé* y que la diálisis es un procedimiento eficaz para la remoción de dichas trazas que no compromete la integridad de los nntVP6-Au. Asimismo, demostramos que es posible la funcionalización de nntVP6 ensamblados *in vitro* con AuNPs. Nuestros resultados muestran que nntVP6 o nnVP6-Au, a diferencia de lo reportado en la literatura para los CNT, no afecta de manera significativa la proliferación celular, esparcimiento celular, liberación de LDH o producción de ROS en células mHypoE-N1 y A-549, por lo que los nntVP6-Au resultan una alternativa atractiva para la sustitución de los CNT en la construcción de MEAs. Cabe resaltar que la adhesión celular sobre sustratos de nntVP6 o nntVP6-Au no requiere la adición de moléculas de anclaje adicionales, posiblemente porque las fibras proteicas de los nntVP6 mimetizan las condiciones de la matriz extracelular, lo que favorece la proliferación celular. Se explorarán en un futuro las interacciones moleculares entre las adhesiones focales de la célula con el sustrato de nntVP6 y nntVP6-Au. Con estos resultados se demuestra por primera vez que los nntVP6-Au son un material inocuo y apto para el cultivo de células de mamífero independientemente del agente reductor empleado en su funcionalización, con el potencial de emplearse como andamio para la proliferación de células de mamífero. Se realizarán investigaciones adicionales para explorar el uso potencial de los nntVP6-Au para aplicaciones de ingeniería de tejidos y el aprovechamiento de sus propiedades eléctricas para la estimulación eléctrica neural mediante la aplicación de diferencias de potencial utilizando los nntVP6-Au como electrodos.

### **Bloque III. Construcción y caracterización del $\mu$ ChipVP6-Au**

Se caracterizó la topografía y conductividad del composito PAcVA-nntVP6-Au y se logró la estandarización de las condiciones de impresión por microcontacto de los nntVP6-Au en patrones predeterminados en el hidrogel PAcVA, con las cuales fue posible la construcción de dos circuitos biorganometálicos (en serie y paralelo) a los que hemos denominado  $\mu$ ChipVP6-Au. Mediante de la ley de Pouillet, se caracterizó la resistividad de PAcVA y se comparó con patrones impresos de nntVP6-Au, logrando un incremento en la conductividad de hasta 170 veces. Se caracterizó la impedancia y desfase en función de la frecuencia del  $\mu$ ChipVP6-Au obteniéndose respuestas eléctricas de alta reproducibilidad, con las cuales se demostró que es posible construir caminos conductores de hasta 8 cm con los nntVP6-Au superando en 40 mil veces la longitud promedio de los nntVP6-Au de manera individual. El desfase obtenido fue negativo lo que demuestra que tanto el



$\mu$ ChipVP6-Au en serie y paralelo, como PAcVA, tienen un comportamiento capacitivo dado que la corriente adelanta al voltaje.

Asimismo, se demostró que el  $\mu$ ChipVP6-Au es un andamio biocompatible con cultivos de células de mamífero mHypoE-N1 y A-549, las cuales pudieron proliferar en el andamio a niveles comparables o incluso mejores que el control de la placa de cultivo comercial y PAcVA sin nntVP6-Au, lo que sugiere que los nntVP6-Au coadyuvan al crecimiento celular por un mecanismo hasta ahora desconocido. No se observó citotoxicidad en ambos cultivos, pero a diferencia de mHypoE-N1, las células A-549 exhibieron una mayor producción de ROS a las 72 h. Estos resultados demuestran que el  $\mu$ ChipVP6-Au es un andamio prometedor para la ingeniería de tejido neural.

#### **Bloque IV. Implantación intracraneal del $\mu$ ChipVP6-Au en un modelo murino de Parkinson**

En el presente trabajo se demostró que el tanto PAcVA como el  $\mu$ ChipVP6-Au son materiales biocompatibles *in vivo*, lo cuales se implantaron exitosamente en corteza cerebral de ratón sin signos de apoptosis o necrosis al quinto día post-implantación. Asimismo, se realizó una prueba de concepto para la liberación controlada de L-DOPA en un modelo murino de Parkinson, logrando la recuperación de la actividad espontánea, la coordinación motora gruesa y fina a niveles comparables de la administración intraperitoneal de la misma dosis del fármaco al octavo día post-implantación.

Estos resultados demuestran que el  $\mu$ ChipVP6-Au es un material biorganometálico implantable apto para la ingeniería de tejido neural. Sus propiedades de biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo*, su capacidad para liberar fármacos de manera controlada, su funcionamiento como andamio para el crecimiento de células neuronales y propiedades conductivas de alta reproducibilidad, lo convierten en un material único en su clase en la literatura de acuerdo a nuestro conocimiento. Se realizarán estudios adicionales para evaluar su capacidad como andamio para el cultivo de células no diferenciadas para terapias de reemplazo celular, así como la liberación de factores de crecimiento que permitan la diferenciación del cultivo *in situ* para la reparación de tejido dañado. Visualizamos este material como un implante neural que en el corto plazo restablezca la función cerebral mediante la liberación controlada de fármacos *in situ*. En el mediano plazo cuando los componentes orgánicos se hayan biodegradado, las células “explante” que hayan crecido en él se integren a las neuronas propias del paciente para reparar el tejido dañado. Y finalmente, en el largo plazo, las AuNPs que

permanezcan en el sitio de implantación puedan utilizarse para la estimulación eléctrica cerebral profunda.

Con el presente trabajo se contribuye al estado del arte del diseño de andamios para la ingeniería de tejido neuronal, con el primer implante biorganometálico basado en proteínas virales funcionalizadas con metales preciosos conjugadas a un nuevo hidrogel estímulo-responsivo. Se espera que estos nuevos biomateriales ayuden en un futuro al planteamiento de estrategias integrales para el tratamiento de trastornos neurológicos.

## CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS

1. Estudiar la difusión anormal de PAcVA (20% GA).
2. Dado que la difusión y movilidad de las cadenas de PAcVA es mayor a pH 5.8, evaluar su potencial como administrador de agentes quimioterapéuticos en cultivos tumorales.
3. Evaluar la citotoxicidad de los nntVP6-Au a largo plazo en las células mHypoE-N1 y A-549, así como el análisis transcripcional de marcadores apoptóticos como p<sup>53</sup>, p<sup>21WAF1/CIP1</sup>, Bax, Bcl<sub>2</sub> y caspasa-3.
4. Estudiar la interacción entre las células y los nntVP6 y nntVP6-Au, específicamente para determinar si la unión celular depende de integrinas y la adsorción de proteínas del suero a los nntVP6-Au, como sucede en el caso de los MWCNT.
5. Evaluar los circuitos electrónicos en serie y paralelo de los nntVP6-Au para la estimulación eléctrica neural.
6. Dadas las propiedades electromagnéticas de las AuNPs, estudiar el comportamiento electromagnético de los nntVP6-Au y explorar la posibilidad de una estimulación eléctrica intracraneal a través de un campo magnético externo.
7. Caracterizar la biodegradación (tiempo e inocuidad de sus subproductos) del  $\mu$ ChipVP6-Au y sus componentes *in vivo*.
8. Evaluar el potencial del  $\mu$ ChipVP6-Au como andamio para la ingeniería de tejido neural, mediante el estudio del crecimiento de células troncales y liberación de factores de crecimiento.
9. Dado que las neuronas proliferan mejor sobre sustratos suaves y los astrocitos sobre sustrato duros, realizar co-cultivos de neuronas y astrocitos sobre el  $\mu$ ChipVP6-Au, para evaluar la posible proliferación diferencial, como se observó para mHypoE-N1 y A-549.
10. Realizar ensayos de inmunohistoquímica para estudiar los procesos de activación de microglía y reclutamiento de astrocitos post-implantación del  $\mu$ ChipVP6-Au.

## LISTA DE ANEXOS: Productos generados durante el doctorado

**Producto 1.** Villanueva-Flores, F., Miranda-Hernández, M., Flores-Flores, J.O. et al. Poly(vinyl alcohol co-vinyl acetate) as a novel scaffold for mammalian cell culture and controlled drug release. *J Mater Sci* (2019) 54: 7867. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03402-1> (**Anexo 1**).

**Producto 2.** Villanueva-Flores, F., Castro-Lugo, A., Ramírez OT., and Palomares LA. Understanding Cellular Interactions with Nanomaterials: Towards a Rational Design of Medical Nanodevices. (Sometido). (**Anexo 2, incluye carta de recepción**).

**Producto 3.** Villanueva-Flores, F., Ramírez OT., and Palomares LA. Low-cost Poly(vinyl formal) for Heavy Removal in a Polluted Mexican River (Escrito). (**Anexo 3**).

**Producto 4.** *Solicitud de patente.* Villanueva-Flores, F., Ramírez OT., and Palomares LA. Microfibras de poli(vinil formal) para la adsorción de metales pesados. (Escrito). (**Anexo 4**).

**Producto 5.** Rodríguez-Martínez, M., Castro-Acosta, RM., Ruiz-Morales, ER., Villanueva-Flores, F., Ramírez OT., and Palomares LA. Tailoring the Formation of Protein Assemblies *in vitro* Using a Novel Method. (Escrito). (**Anexo 5**).

**Producto 6.** Villanueva-Flores, F., Ramírez OT., and Palomares LA. Brain Implantable  $\mu$ ChipVP6-Au: A Novel Nanobiomaterial for Restoring Cellular Function. (En proceso).

**Producto 7.** *Solicitud de patente:* Villanueva-Flores, F., Ramírez OT., and Palomares LA. Uso de proteínas multiméricas virales funcionalizadas con metales como andamios para el crecimiento y excitación eléctrica celular (En proceso).

## REFERENCIAS

1. Feigin VL, Abajobir AA, Abate KH, et al (2017) Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol* 16:877–897. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30299-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30299-5)
2. WHO (2014) Neurological Disorders: public health challenges. *Neurol Disord Public Heal Challenges* 26–39. <https://doi.org/10.1037/e521482010-002>
3. Pettikiriachchi TSJ, Parish CL, Shoichet MS, et al (2010) Biomaterials for Brain Tissue Engineering. *Aust J Chem.* 63:1143–1154
4. Simonato M, Bennett J, Boulis NM, et al (2013) Progress in gene therapy for neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 9:277–291. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.56>
5. Vilar G, Tulla-Puche J, Albericio F (2012) Polymers and drug delivery systems. *Curr Drug Deliv* 9:367–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.045>
6. Sudhakar CK, Upadhyay N, Verma A, et al (2015) Chapter 1. Nanomedicine and Tissue Engineering. *J. Nanotech App for Tissue Eng.* 1-19. ISBN 9780323328890 <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32889-0.00001-7>
7. Venkatesan J, Kim S-K, Wong TW (2015) Chapter 9. Chitosan and Its Application as Tissue Engineering Scaffolds. *J. Nanotech App for Tissue Eng.* 1-19. ISBN 9780323328890 <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32889-0.00001-7>
8. Dvir T, Timko BP, Brigham MD, et al (2011) Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nat Nanotechnol* 6:720–725. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.160>
9. Saini R, Saini S, Sharma S (2010) Nanotechnology: The Future Medicine. *J Cutan Aesthet Surg* 3:32–33. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.63301>
10. Tian B, Liu J, Dvir T, et al (2012) Macroporous nanowire nanoelectronic scaffolds for synthetic tissues. *Nat Mater* 11:986–994. <https://doi.org/10.1038/nmat3404>
11. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS (2011) Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *Int. J. Polym. Sci.* 2011:19 <https://doi.org/10.1155/2011/290602>
12. Balint R, Cassidy NJ, Cartmell SH (2014) Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater* 10:2341–2353. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.015>
13. Adil MM, Vazin T, Ananthanarayanan B, et al (2017) Engineered hydrogels increase the post-transplantation survival of encapsulated hESC-derived midbrain dopaminergic neurons. *Biomaterials* 136:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.008>
14. Ballios BG, Cooke MJ, Donaldson L, et al (2015) A Hyaluronan-Based Injectable Hydrogel Improves the Survival and Integration of Stem Cell Progeny following Transplantation. *Stem Cell Reports* 4:1031–1045. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.04.008>
15. Marcus M, Baranes K, Park M, et al (2017) Interactions of Neurons with Physical Environments. *Adv. Healthc. Mater.* 6:1700267 <https://doi.org/10.1002/adhm.201700267>
16. Brunetti V, Maiorano G, Rizzello L, et al (2010) Neurons sense nanoscale roughness with nanometer sensitivity. *Proc Natl Acad Sci* 107:6264–6269. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914456107>
17. Yang JM, Olanrele OS, Zhang X, Hsu CC (2018) Fabrication of Hydrogel Materials for Biomedical

- Applications BT - Novel Biomaterials for Regenerative Medicine. In: Chun HJ, Park K, Kim C-H, Khang G (eds). Springer Singapore. 1077:197-224. [http://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2\\_12](http://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_12)
18. Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter B V., Peppas NA (2010) Polymers for Drug Delivery Systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 1:149–173. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847>
  19. Aghabegi Moghanjoughi A, Khoshnevis D, Zarrabi A (2016) A concise review on smart polymers for controlled drug release. *Drug Deliv Transl Res* 6:333–340. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0274-7>
  20. Boni R, Ali A, Shavandi A, Clarkson AN (2018) Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering. *J Biomed Sci* 25:90. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0491-8>
  21. Burdick JA, Mauck RL, Gerecht S (2016) To Serve and Protect: Hydrogels to Improve Stem Cell-Based Therapies. *Cell Stem Cell* 18:13–15 <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.004>
  22. Lovat V, Pantarotto D, Lagostena L, et al (2005) Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. *Nano Lett* 5:1107–1110. <https://doi.org/10.1021/nl050637m>
  23. Baldrighi M, Trusel M, Tonini R, Giordani S (2016) Carbon nanomaterials interfacing with neurons: An in vivo perspective. *Front. Neurosci.* 10:250 <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00250>
  24. Park DW, Schendel AA, Mikael S, et al (2014) Graphene-based carbon-layered electrode array technology for neural imaging and optogenetic applications. *Nat Commun* 5:5258. <http://doi.org/10.1038/ncomms6258>
  25. Guo W, Qiu J, Liu J, Liu H (2017) Graphene microfiber as a scaffold for regulation of neural stem cells differentiation. *Sci Rep* 7:5678. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06051-z>
  26. Plascencia-Villa G, Saniger JM, Ascencio JA, et al (2009) Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnol Bioeng* 104:871–881. <https://doi.org/10.1002/bit.22497>
  27. Ramírez, OT., Plascencia-Villa, G., Palomares LA., Mena YA., Saniger JM (2008) Uso de proteínas multiméricas virales como plantados para la construcción de nanobiomateriales. WO2009157746A1
  28. Pérez-Garnes M, Barcía JA, Gómez-Pinedo U, et al (2014) Materials for Central Nervous System Tissue Engineering. Open access peer-reviewed chapter. *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine*. In Eberli D (ed) Ch.7 <https://doi.org/10.5772/59339>
  29. Martin I, Wendt D, Heberer M (2004) The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 22:80–86. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.12.001>.
  30. Mahumane GD, Kumar P, du Toit LC, et al (2018) 3D scaffolds for brain tissue regeneration: architectural challenges. *Biomater Sci.* 6:2812-2837 <https://doi.org/10.1039/C8BM00422F>
  31. Koser DE, Thompson AJ, Foster SK, et al (2016) Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat Neurosci* 19:1592-1598. <https://doi.org/10.1038/nn.4394>
  32. Blumenthal NR, Hermanson O, Heimrich B, Shastri VP (2014) Stochastic nanoroughness modulates neuron-astrocyte interactions and function via mechanosensing cation channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:16124–16129. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412740111>
  33. Posati T, Pistone A, Saracino E, et al (2016) A Nanoscale Interface Promoting Molecular and Functional Differentiation of Neural Cells. *Sci Rep* 6:31226 <http://doi.org/10.1038/srep31226>
  34. Nel AE, Mädler L, Velegol D, et al (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the

nano-bio interface. *Nat Mater* 8:543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>

35. Khan F, Tanaka M (2018) Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 19:17. <https://doi.org/10.3390/ijms19010017>
36. Nakajima K and Kohsaka S (2001) Microglia: Activation and Their Significance in the Central Nervous System. *J Biochem* 130:169–175. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002969>
37. Biran R, Martin DC, Tresco PA (2005) Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays. *Exp Neurol* 195:115–126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.04.020>
38. Kozai TDY, Gugel Z, Li X, et al (2014) Chronic tissue response to carboxymethyl cellulose based dissolvable insertion needle for ultra-small neural probes. *Biomaterials* 35:9255–9268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.039>
39. McConnel GC, Rees, HD, Levey AI, et al (2009) Implanted neural electrodes cause chronic, local inflammation that is correlated with local neurodegeneration. *J Neural Eng* 6:56003. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/6/5/056003>
40. Jorfi M, Skousen JL, Weder C, Capadona JR (2014) Progress towards biocompatible intracortical microelectrodes for neural interfacing applications. *J Neural Eng* 12:11001. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/12/1/011001>
41. Ahearne M (2014) Introduction to cell-hydrogel mechanosensing. *Interface Focus* 4:20130038. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0038>
42. Xia T, Liu W, Yang L (2017) A review of gradient stiffness hydrogels used in tissue engineering and regenerative medicine. *J Biomed Mater Res Part A* 105:1799–1812. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36034>
43. Tusan CG, Man YH, Zarkoob H, et al (2018) Collective Cell Behavior in Mechanosensing of Substrate Thickness. *Biophys J* 114:2743–2755. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.037>
44. Caliari SR, Burdick JA (2016) A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods.* 13:405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>
45. Zhu J, Marchant RE. (2011) Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* 8:607–626. <https://doi.org/10.1586/erd.11.27>
46. Yang Y, Wang K, Gu X, Leong KW (2017) Biophysical Regulation of Cell Behavior-Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography. *Eng (Beijing, China)* 3:36–54. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.014>
47. Georges PC, Miller WJ, Meaney DF, et al (2006) Matrices with Compliance Comparable to that of Brain Tissue Select Neuronal over Glial Growth in Mixed Cortical Cultures. *Biophys J* 90:3012–3018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1529/biophysj.105.073114>
48. Potjewyd G, Moxon S, Wang T, et al (2018) Tissue Engineering 3D Neurovascular Units: A Biomaterials and Bioprinting Perspective. *Trends Biotechnol* 36:457–472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.01.003>
49. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas I V, Gibson LJ (2005) The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 26:433–441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.052>
50. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ (2010) The effect of mean pore size on cell attachment,

- proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 31:461–466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>
51. Bružauskaitė I, Bironaitė D, Bagdonas E, Bernotienė E (2016) Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology* 68:355–369. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9895-4>
  52. Seidlits SK, Lee JY, Schmidt CE (2008) Nanostructured scaffolds for neural applications. *Nanomedicine* 3:183–199. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.2.183>
  53. Sapelkin A V, Bayliss SC, Unal B, Charalambou A (2006) Interaction of B50 rat hippocampal cells with stain-etched porous silicon. *Biomaterials* 27:842–846. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.06.023>
  54. Song L, Wang K, Li Y, Yang Y (2016) Nanotopography promoted neuronal differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 148:49–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.041>
  55. Park S, Kim D, Park S, et al (2018) Nanopatterned Scaffolds for Neural Tissue Engineering and Regenerative Medicine BT - Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine. ISBN:978-981-13-0949-6. In: Chun HJ, Park CH, Kwon IK, Khang G (eds). Springer Singapore 421–443
  56. Schnell E, Klinkhammer K, Balzer S, et al (2007) Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-ε-caprolactone and a collagen/poly-ε-caprolactone blend. *Biomaterials* 28:3012–3025. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.009>
  57. Mukhatyar VJ, Salmerón-Sánchez M, Rudra S, et al (2011) Role of fibronectin in topographical guidance of neurite extension on electrospun fibers. *Biomaterials* 32:3958–3968. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.015>
  58. Corey JM, Lin DY, Mycek KB, et al (2007) Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth. *J Biomed Mater Res Part A* 83A:636–645. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31285>
  59. Ferrari A, Cecchini M, Dhawan A, et al (2011) Nanotopographic Control of Neuronal Polarity. *Nano Lett* 11:505–511. <https://doi.org/10.1021/nl103349s>
  60. Krishna L, Dhamodaran K, Jayadev C, et al (2016) Nanostructured scaffold as a determinant of stem cell fate. *Stem Cell Res Ther* 7:188. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0440-y>
  61. Zhang S-JL, Zhu W, Nowicki M, et al (2018) 3D printing nano conductive multi-walled carbon nanotube scaffolds for nerve regeneration. *J Neural Eng* 15:16018. <https://doi.org/10.1088/1741-2552/aa95a5>
  62. Jang MJ, Namgung S, Hong S, Nam Y (2010) Directional neurite growth using carbon nanotube patterned substrates as a biomimetic cue. *Nanotechnology* 21:235102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/23/235102>
  63. Fan L, Feng C, Zhao W, et al (2012) Directional Neurite Outgrowth on Superaligned Carbon Nanotube Yarn Patterned Substrate. *Nano Lett* 12:3668–3673. <https://doi.org/10.1021/nl301428w>
  64. Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S (2005) Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 26:2603–2610. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.051>
  65. Hoffman-Kim D, Mitchel JA, Bellamkonda R V (2010) Topography, cell response, and nerve regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* 12:203–231. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-070909->



66. Haq F, Anandan V, Keith C, Zhang G (2007) Neurite development in PC12 cells cultured on nanopillars and nanopores with sizes comparable with filopodia. *Int J Nanomedicine* 2:107–115. <http://doi.org/10.2147/nano.2007.2.1.107>
67. Xie J, Willerth SM, Li X, et al (2009) The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. *Biomaterials* 30:354–362. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.046>
68. Xie J, MacEwan MR, Liu W, et al (2014) Nerve Guidance Conduits Based on Double-Layered Scaffolds of Electrospun Nanofibers for Repairing the Peripheral Nervous System. *ACS Appl Mater Interfaces* 6:9472–9480. <https://doi.org/10.1021/am5018557>
69. Onesto V, Cancedda L, Coluccio ML, et al (2017) Nano-topography Enhances Communication in Neural Cells Networks. *Sci Rep* 7:9841. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09741-w>
70. Park S, Choi KS, Kim D, et al (2018) Controlled extracellular topographical and chemical cues for acceleration of neuronal development. *J Ind Eng Chem* 61:65–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.12.001>
71. Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE (2007) Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 59:325–338. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.014>
72. Li W, Guo Y, Wang H, et al (2008) Electrospun nanofibers immobilized with collagen for neural stem cells culture. *J Mater Sci Mater Med* 19:847–854. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3087-5>
73. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP (2007) Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120:1955–1958. <https://doi.org/10.1242/jcs.03453>
74. Cui FZ, Tian WM, Hou SP, et al (2006) Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 17:1393–1401. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0615-7>
75. Luo Y, Shoichet MS (2004) A photolabile hydrogel for guided three-dimensional cell growth and migration. *Nat Mater* 3:249. <http://doi.org/10.1038/nmat1092>
76. Moriarty N, Dowd E (2018) Brain repair for Parkinson’s disease: is the answer in the matrix? *Neural Regen Res* 13:1187–1188. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.235027>
77. Nih LR, Gojgini S, Carmichael ST, Segura T (2018) Dual-function injectable angiogenic biomaterial for the repair of brain tissue following stroke. *Nat Mater* 17:642–651. <https://doi.org/10.1038/s41563-018-0083-8>
78. Zhang H, Hayashi T, Tsuru K, et al (2007) Vascular endothelial growth factor promotes brain tissue regeneration with a novel biomaterial polydimethylsiloxane-tetraethoxysilane. *Brain Res* 1132:29–35. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.117>
79. Delgado-Rivera R, Harris SL, Ahmed I, et al (2009) Increased FGF-2 secretion and ability to support neurite outgrowth by astrocytes cultured on polyamide nanofibrillar matrices. *Matrix Biol* 28:137–147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.02.001>
80. Kapur TA, Shoichet MS (2004) Immobilized concentration gradients of nerve growth factor guide neurite outgrowth. *J Biomed Mater Res Part A* 68A:235–243. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10168>
81. Alberti K, Davey RE, Onishi K, et al (2008) Functional immobilization of signaling proteins enables control of stem cell fate. *Nat Methods* 5:645. <http://doi.org/10.1038/nmeth.1222>

82. Horne MK, Nisbet DR, Forsythe JS, Parish CL (2009) Three-Dimensional Nanofibrous Scaffolds Incorporating Immobilized BDNF Promote Proliferation and Differentiation of Cortical Neural Stem Cells. *Stem Cells Dev* 19:843–852. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0158>
83. Bothwell M (2016) Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Research* 5:F1000 Faculty Rev-1885. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8434.1>
84. Klaver CL, Caplan MR (2007) Bioactive surface for neural electrodes: Decreasing astrocyte proliferation via transforming growth factor- $\beta$ 1. *J Biomed Mater Res Part A* 81A:1011–1016. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31153>
85. Siegel GJ, Chauhan NB (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Rev* 33:199–227. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00030-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00030-8)
86. Chen BK, Madigan NN, Hakim JS, et al (2018) GDNF Schwann cells in hydrogel scaffolds promote regional axon regeneration, remyelination and functional improvement after spinal cord transection in rats. *J Tissue Eng Regen Med* 12:e398–e407. <https://doi.org/10.1002/term.2431>
87. Martinelli V, Cellot G, Toma FM, et al (2012) Carbon nanotubes promote growth and spontaneous electrical activity in cultured cardiac myocytes. *Nano Lett* 12:1831–1838. <https://doi.org/10.1021/nl204064s>
88. Almaraz L., Fidone S. (1987) Release of Catecholamines by Electrical Stimulation of the Cat Carotid Sinus Nerve In Vitro. ISBN:978-94-015-1157-5. In: Ribeiro J.A., Pallot D.J. (eds) *Chemoreceptors in Respiratory Control*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-015-1155-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-015-1155-1_15)
89. Cuadra G, Zurita A, Macedo CE, et al (2000) Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex. *Brain Res Bull* 52:413–418. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(00\)00278-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00278-1)
90. Taber MT, Fibiger HC (1993) Electrical stimulation of the medial prefrontal cortex increases dopamine release in the striatum. *Neuropsychopharmacology* 9:271–275. <https://doi.org/10.1038/npp.1993.63>
91. Gale JT, Lee KH, Amirnovin R, et al (2013) Electrical stimulation-evoked dopamine release in the primate striatum. *Stereotact Funct Neurosurg* 91:355–363. <https://doi.org/10.1159/000351523>
92. Geremia NM, Gordon T, Brushart TM, et al (2007) Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Exp Neurol* 205:347–359. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.01.040>
93. Zhang X, Xin N, Tong L, Tong X-J (2013) Electrical stimulation enhances peripheral nerve regeneration after crush injury in rats. *Mol Med Rep* 5:1523-1527. <http://doi.org/10.3892/mmr.2013>
94. Pozzi NG, Pacchetti C (2017) Back to the future: 30th anniversary of deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Funct Neurol* 32:5–6. <https://doi.org/10.11138/FNeur/2017.32.1.005>
95. Boutry CM, Gerber-Hörler I, Hierold C (2013) Electrically conducting biodegradable polymer composites (polylactide-polypyrrole and polycaprolactone-polypyrrole) for passive resonant circuits. *Polym Eng Sci* 53:1196–1208. <https://doi.org/10.1002/pen.23373>
96. Gordon T, English AW (2016) Strategies to promote peripheral nerve regeneration: electrical stimulation and/or exercise. *Eur J Neurosci* 43:336–350. <https://doi.org/10.1111/ejn.13005>
97. Moriarty N, Pandit A, Dowd E (2017) Encapsulation of primary dopaminergic neurons in a GDNF-loaded collagen hydrogel increases their survival, re-innervation and function after intra-striatal transplantation. *Sci Rep* 7:16033. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15970-w>

98. Doron G and Brecht, M (2015) What single-cell stimulation has told us about neural coding. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 370:20140204. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0204>
99. Edwards CA, Kouzani A, Lee KH, Ross EK (2017) Neurostimulation Devices for the Treatment of Neurologic Disorders. *Mayo Clin Proc* 92:1427–1444. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.05.005>
100. John AA, Subramanian AP, Vellayappan MV, et al (2015) Carbon nanotubes and graphene as emerging candidates in neuroregeneration and neurodrug delivery. *Int. J. Nanomedicine* 10:4267–4277. <http://doi.org/10.2147/IJN.S83777>
101. Malarkey EB, Parpura V (2010) Carbon Nanotubes in Neuroscience. *Acta Neurochir Suppl* 106:337–341. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-98811-4\\_62](https://doi.org/10.1007/978-3-211-98811-4_62)
102. Hollister SJ (2005) Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 4:518–524. <https://doi.org/10.1038/nmat1421>
103. Bauquier SH, McLean KJ, Jiang JL, et al (2016) Evaluation of the Biocompatibility of Polypyrrole Implanted Subdurally in GAERS. *Macromol Biosci* 17:1600334. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600334>
104. Pillay V, Tsai TS, Choonara YE, et al (2014) A review of integrating electroactive polymers as responsive systems for specialized drug delivery applications. *J Biomed Mater Res Part A* 102:2039–2054. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34869>
105. Humpolíček P, Radaszkiewicz KA, Capáková Z, et al (2018) Polyaniline cryogels: Biocompatibility of novel conducting macroporous material. *Sci Rep* 8:135. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18290-1>
106. Fan L, Xiong Y, Fu Z, et al (2017) Polyaniline promotes peripheral nerve regeneration by enhancement of the brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor expression and activation of the ERK1/2/MAPK signaling pathway. *Mol Med Rep* 16:7534–7540. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7534>
107. Mandal H, Knaack G, Charkhkar H, et al (2014) Improving the performance of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) for brain machine interface applications. *Acta Biomater.* 6:2446-54. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.029>
108. Alba NA, Du ZJ, Catt KA, et al (2015) In Vivo Electrochemical Analysis of a PEDOT/MWCNT Neural Electrode Coating. *Biosens* 5:618–646. <https://doi.org/10.3390/bios5040618>
109. Malarkey EB, Fisher KA, Bekyarova E, et al (2009) Conductive Single-Walled Carbon Nanotube Substrates Modulate Neuronal Growth. *Nano Lett* 9:264–268. <https://doi.org/10.1021/nl802855c>
110. Wang X, Bukoreshtliev NV, Gerdes HH (2012) Developing Neurons Form Transient Nanotubes Facilitating Electrical Coupling and Calcium Signaling with Distant Astrocytes. *PLoS One* 7:e47429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047429>
111. Cellot G, Cilia E, Cipollone S, et al (2009) Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts. *Nat Nanotechnol* 4:126–133. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.374>
112. Fabbro A, Bosi S, Ballerini L, Prato M (2012) Carbon nanotubes: Artificial nanomaterials to engineer single neurons and neuronal networks. *ACS Chem. Neurosci.* 3:611–618. <http://doi.org/10.1021/cn300048q>
113. Ema M, Gamo M, Honda K (2017) A review of toxicity studies on graphene-based nanomaterials in laboratory animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 85:7–24. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.01.011>

114. Khalid P, Suman VB, Hussain MA, Arun AB (2016) Toxicology of carbon nanotubes - A review. *Int J Appl Eng Res* 11:148–157
115. Lam C, James JT, McCluskey R, et al (2006) A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks. *Crit Rev Toxicol* 36:189–217. <https://doi.org/10.1080/10408440600570233>
116. Madani SY, Mandel A, Seifalian AM (2013) A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano Rev* 4:21521. <https://doi.org/10.3402/nano.v4i0.21521>
117. Kobayashi N, Izumi H, Morimoto Y (2017) Review of toxicity studies of carbon nanotubes. *J Occup Health* 59:394–407. <https://doi.org/10.1539/joh.17-0089-RA>
118. George PM, Lyckman AW, LaVan DA, et al (2005) Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics. *Biomaterials* 26:3511–3519. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.037>
119. Granato AEC, Ribeiro AC, Marciano FR, et al (2018) Polypyrrole increases branching and neurite extension by Neuro2A cells on PBAT ultrathin fibers. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 14:1753–1763. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.05.004>
120. Thompson BC, Moulton SE, Richardson RT, Wallace GG (2011) Effect of the dopant anion in polypyrrole on nerve growth and release of a neurotrophic protein. *Biomaterials* 32:3822–3831. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.053>
121. Zhang Q, Esrafilzadeh D, Crook JM, et al (2017) Electrical Stimulation Using Conductive Polymer Polypyrrole Counters Reduced Neurite Outgrowth of Primary Prefrontal Cortical Neurons from NRG1-KO and DISC1-LI Mice. *Sci Rep* 7:42525. <http://doi.org/10.1038/srep42525>
122. Stewart E, Kobayashi NR, Higgins MJ, et al (2014) Electrical Stimulation Using Conductive Polymer Polypyrrole Promotes Differentiation of Human Neural Stem Cells: A Biocompatible Platform for Translational Neural Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 21:385–393. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0338>
123. Street GB, Lindsey SE, Nazzal AI, Wynne KJ (1985) The Structure and Mechanical Properties of Polypyrrole. *Mol Cryst Liq Cryst* 118:137–148. <https://doi.org/10.1080/00268948508076201>
124. Sun K-H, Liu Z, Liu C, et al (2016) Evaluation of in vitro and in vivo biocompatibility of a myo-inositol hexakisphosphate gelated polyaniline hydrogel in a rat model. *Sci Rep* 6:23931. <http://doi.org/10.1038/srep23931>
125. Mawad D, Mansfield C, Lauto A, et al (2016) A conducting polymer with enhanced electronic stability applied in cardiac models. *Sci Adv* 2:e1601007–e1601007. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1601007>
126. Qazi TH, Rai R, Boccaccini AR (2014) Tissue engineering of electrically responsive tissues using polyaniline based polymers: A review. *Biomaterials* 35:9068–9086. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.020>
127. Wang CH, Dong YQ, Sengothi K, et al (1999) In-vivo tissue response to polyaniline. *Synth Met* 102:1313–1314. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(98\)01006-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0379-6779(98)01006-6)
128. Borriello A, Guarino V, Schiavo L, et al (2011) Optimizing PANi doped electroactive substrates as patches for the regeneration of cardiac muscle. *J Mater Sci Mater Med* 22:1053–1062. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4259-x>
129. Zhang Q-S, Yan Y-H, Li S-P, Feng T (2009) Synthesis of a novel biodegradable and electroactive polyphosphazene for biomedical application

130. Cui X, Zhou D (2008) Poly (3,4-Ethylenedioxythiophene) for Chronic Neural Stimulation. *Biomed Mater.* 3:035008. <http://doi.org/10.1088/1748-6041/4/3/035008>
131. Pires F, Ferreira Q, Rodrigues CA V, et al (2015) Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1850:1158–1168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.01.020>
132. Kim D-H, Richardson-Burns SM, Hendricks JL, et al (2007) Effect of Immobilized Nerve Growth Factor on Conductive Polymers: Electrical Properties and Cellular Response. *Adv Funct Mater* 17:79–86. <https://doi.org/10.1002/adfm.200500594>
133. Asplund M, Thaning E, Lundberg J, et al. (2009) Toxicity evaluation of PEDOT/biomolecular composites intended for neural communication electrodes. *Biomed Mater* 4:45009. <http://doi.org/10.1088/1748-6041/4/4/045009>
134. Richardson-Burns SM, Hendricks JL, Foster B, et al (2007) Polymerization of the conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) around living neural cells. *Biomaterials* 28:1539–1552. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.026>
135. Reddig PJ, Juliano RL (2005) Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 24:425–439. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-5134-3>
136. Mazzatenta A, Giugliano M, Campidelli S, et al (2007) Interfacing Neurons with Carbon Nanotubes: Electrical Signal Transfer and Synaptic Stimulation in Cultured Brain Circuits. *J Neurosci* 27:6931–6936. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1051-07.2007>
137. El-Sherbiny I, Yacoub M (2013) Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract* 2013:316–42. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2013.38>
138. Guan X, Avci-Adali M, Alarçin E, et al (2017) Development of hydrogels for regenerative engineering. *Biotechnol J* 12:1600394. <https://doi.org/10.1002/biot.201600394>
139. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (Eds.). (2004). *Neuroscience* (2nd ed.). ISBN:10: 0-87893-742-0. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates.
140. Shepherd GM (2003) *The synaptic organization of the brain*. ISBN-13: 9780195159561 Oxford university press. <http://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195159561.001.1>
141. Pereda AE (2014) Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci* 15:250–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3708>
142. Wu J, Xie L, Lin WZY, Chen Q (2017) Biomimetic nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering and drug development. *Drug Discov Today* 22:1375–1384. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.03.007>
143. Plascencia-Villa G, Carreño-Fuentes L, Bahena D, et al (2014) Characterization of conductive nanobiomaterials derived from viral assemblies by low-voltage STEM imaging and Raman scattering. *Nanotechnology* 25:385706. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/38/385706>
144. Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, et al (2001) Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: Implications for the architecture of the virion. *EMBO J* 20:1485–1497. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1485>
145. Zhang X, Settembre E, Xu C, et al (2008) Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc Natl Acad Sci* 105:1867–1872. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711623105>

146. Lepault J, Petitpas I, Erk I, et al (2001) Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO J* 20:1498–507. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1498>
147. Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA (2006) Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *J Biotechnol* 122:443–452. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.10.005>
148. Świdwińska-Gajewska AM, Czerczak S (2017) Nanogold – Biological effects and occupational exposure levels. *Med Pr.* 68:545–556. <https://doi.org/10.13075/mp.5893.00538>
149. Carreño-Fuentes L (2014) Funcionalización dirigida y localizada de VP6 de rotavirus. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.
150. Khan F, Tanaka M (2017) Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* 19:17. <https://doi.org/10.3390/ijms19010017>
151. Carpenter R, Reddi B (2012) *Neurophysiology: A Conceptual Approach, Fifth Edition.* Hodder Arnold. CRC Press.
152. Bas O, Catelas I, De-Juan-Pardo EM, Hutmacher DW (2018) The quest for mechanically and biologically functional soft biomaterials via soft network composites. *Adv Drug Deliv Rev.* 132:214–234. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.015>
153. Pawar K, Prang P, Müller R, et al (2015) Intrinsic and extrinsic determinants of central nervous system axon outgrowth into alginate-based anisotropic hydrogels. *Acta Biomater* 27:131–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.032>
154. Wang Y, Cooke MJ, Morshead CM, Shoichet MS (2012) Hydrogel delivery of erythropoietin to the brain for endogenous stem cell stimulation after stroke injury. *Biomaterials* 33:2681–2692. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.031>
155. Azadi A, Hamidi M, Rouini M-R (2013) Methotrexate-loaded chitosan nanogels as ‘Trojan Horses’ for drug delivery to brain: Preparation and in vitro/in vivo characterization. *Int J Biol Macromol* 62:523–530. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.004>
156. Mo L, Yang Z, Zhang A, Li X (2010) The repair of the injured adult rat hippocampus with NT-3-chitosan carriers. *Biomaterials.* 8:2184-2192. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.078>
157. Huang C, Zhao L, Gu J, et al (2016) The migration and differentiation of hUC-MSCs CXCR4/GFP encapsulated in BDNF/chitosan scaffolds for brain tissue engineering. *Biomed. Mat.* 11:035004. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/3/035004>
158. Gil V and Del Río J (2012) Analysis of axonal growth and cell migration in 3D hydrogel cultures of embryonic mouse CNS tissue. *Nat Protoc.* 2:268-80. <http://doi.org/10.1038/nprot.2011.445>.
159. Huang KF, Hsu WC, Chiu WT, Wang JY (2012) Functional improvement and neurogenesis after collagen-GAG matrix implantation into surgical brain trauma. *Biomaterials* 33:2067–2075. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.040>
160. Duan H, Li X, Wang C, et al (2016) Functional hyaluronate collagen scaffolds induce NSCs differentiation into functional neurons in repairing the traumatic brain injury. *Acta Biomater* 45:182–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.043>
161. Ucar B and Humpel C. (2018) Collagen for brain repair: Therapeutic perspectives. *Neural Regen Res.* 4:595-598. <http://doi.org/10.4103/1673-5374.230273>.
162. Wang TW, Chang KC, Chen LH, et al (2017) Effects of an injectable functionalized self-assembling nanopeptide hydrogel on angiogenesis and neurogenesis for regeneration of the central nervous

system. *Nanoscale* 9:16281–16292. <https://doi.org/10.1039/C7NR06528K>

163. Sun W, Motta A, Shi Y, et al (2016) Co-culture of outgrowth endothelial cells with human mesenchymal stem cells in silk fibroin hydrogels promotes angiogenesis. *Biomed Mater.* 3:035009. <http://doi.org/10.1088/1748-6041/11/3/035009>
164. Lozano R, Stevens L, Thompson BC, et al (2015) 3D printing of layered brain-like structures using peptide modified gellan gum substrates. *Biomaterials* 67:264–273. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.022>
165. Lim TC, Toh WS, Wang LS, et al (2012) The effect of injectable gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogel matrices on the proliferation, migration, differentiation and oxidative stress resistance of adult neural stem cells. *Biomaterials* 33:3446–3455. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.037>
166. Sarnowska A, Jablonska A, Jurga M, et al (2013) Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells by Bioscaffolds Protects Cell Survival and Attenuates Neuroinflammatory Reaction in Injured Brain Tissue After Transplantation. *Cell Transplant.* 1:S67-82. <http://doi.org/10.3727/096368913X672172>.
167. Xing Q, Zhao F, Chen S, et al (2010) Porous biocompatible three-dimensional scaffolds of cellulose microfibril/gelatin composites for cell culture. *Acta Biomater* 6:2132–2139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.036>
168. Moshayedi P, Nih L, Llorente I, et al (2016) Systematic optimization of an engineered hydrogel allows for selective control of human neural stem cell survival and differentiation after transplantation in the stroke brain. *Biomaterials.* 105:145-155. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.028>.
169. Nisbet D, Rodda A, K Horne M, et al (2010) Implantation of Functionalized Thermally Gelling Xyloglucan Hydrogel Within the Brain: Associated Neurite Infiltration and Inflammatory Response. *Tissue Eng Part A.* 9:2833-2842. <http://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0677>.
170. Fon D, Zhou K, Ercole F, et al (2014) Nanofibrous scaffolds releasing a small molecule BDNF-mimetic for the re-direction of endogenous neuroblast migration in the brain. *Biomaterials* 35:2692–2712. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.016>
171. Limongi T, Rocchi A, Cesca F, et al (2018) Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor by 3D Biocompatible Polymeric Scaffolds for Neural Tissue Engineering and Neuronal Regeneration. *Mol Neurobiol* 55:8788–8798. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1022-z>
172. Lampe K, S Kern D, J Mahoney M, Bjugstad K (2011) The administration of BDNF and GDNF to the brain via PLGA microparticles patterned within a degradable PEG-based hydrogel: Protein distribution and the glial response. *J Biomed Mater Res A.* 3:595-607. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.33011>.
173. Bjugstad KB, Lampe K, Kern DS, Mahoney M. (2010) Biocompatibility of poly(ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: An analysis of the glial response across space and time. *J Biomed Mater Res A.* 1:79-91. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.32809>.
174. Jhaveri SJ, Hynd MR, Dowell-Mesfin N, et al (2009) Release of Nerve Growth Factor from HEMA Hydrogel-Coated Substrates and Its Effect on the Differentiation of Neural Cells. *Biomacromolecules* 10:174–183. <https://doi.org/10.1021/bm801101e>
175. Adams Kapur T and Shoichet MS (2003) Chemically-bound nerve growth factor for neural tissue engineering applications. *J Biomater Sci Polym Ed.* 4:383-394. <http://10.1163/156856203321478883>

176. Plant GW, Woerly S, Harvey AR (1997) Hydrogels Containing Peptide or Aminosugar Sequences Implanted into the Rat Brain: Influence on Cellular Migration and Axonal Growth. *Exp Neurol* 143:287–299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6407>
177. Alvarez Z, Castano O, Castells A, et al (2014) Neurogenesis and vascularization of the damaged brain using a lactate-releasing biomimetic scaffold. *Biomaterials*. 17:4769–81. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.051>
178. Carlberg B, Axell MZ, Nannmark U, et al. (2009) Electrospun polyurethane scaffolds for proliferation and neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Biomed Mater* 4:45004. <http://doi.org/10.1088/1748-6041/4/4/045004>
179. Hsieh F-Y, Lin HH and Hsu S (2015) 3D bioprinting of neural stem cell-laden thermoresponsive biodegradable polyurethane hydrogel and potential in central nervous system repair. *Biomaterials* 71:48–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.028>
180. Aligholi H, Rezayat SM, Azari H, et al (2016) Preparing neural stem/progenitor cells in PuraMatrix hydrogel for transplantation after brain injury in rats: A comparative methodological study. *Brain Res* 1642:197–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.03.043>
181. Wadhwa R, Lagenaur CF, Cui XT (2006) Electrochemically controlled release of dexamethasone from conducting polymer polypyrrole coated electrode. *J Control Release* 110:531–541. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.10.027>
182. Zarrintaj P, Ahmadi Z, Vahabi H, et al (2018) Polyaniline in retrospect and prospect. *Mater Today Proc* 5:15852–15860. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.05.084>
183. Mansur HS, Sadahira CM, Souza AN, Mansur AAP (2008) FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Mater Sci Eng C* 28:539–548. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088>
184. Caló E and Khutoryanskiy VV (2015) Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur Polym J* 65:252–267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>
185. Fumio U, Hiroshi Y, Kumiko N, et al (1990) Swelling and mechanical properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Int J Pharm* 58:135–142. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90251-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90251-X)
186. López-Saldaña VM (2016) Estrategias de purificación caracterización de nanotubos de VP6 de rotavirus. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila
187. Rodríguez-González, M., Castro-Acosta, RM., Ruiz-Morales, ER., Villanueva-Flores, F., Ramírez OT., and Palomares LA. Tailoring the Formation of Protein Assemblies *in vitro* Using a Novel Method (In preparation).
188. Jackson-Lewis V and Przedborski S (2007) Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson’s disease. *Nat Protoc* 2:141–151. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.342>
189. Fleming SM, Ekhatior OR and Ghisays V (2013) Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson’s disease. *J Vis Exp* 76:50303. <https://doi.org/10.3791/50303>
190. Polyvinyl alcohol, CID=11199. In: Natl. Cent. Biotechnol. Information. PubChem Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11199>
191. Figueiredo KCS, Alves TLM, Borges CP (2009) Poly(vinyl alcohol) Films Crosslinked by Glutaraldehyde Under Mild Conditions. *J Appl Polym Sci* 111:3074–3080. <https://doi.org/10.1002/app.29263>



192. Charles RN, Derek JM, Scott MH, Kristi SA (2001) Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. *J Biomed Mater Res* 57:217–223. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200111\)57:2<217::AID-JBM1161>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200111)57:2<217::AID-JBM1161>3.0.CO;2-I)
193. Kumar A, Han SS (2017) PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 66:159–182. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190930>
194. Oliveira JM, Carvalho L, Silva-Correia J, et al (2018) Hydrogel-based scaffolds to support intrathecal stem cell transplantation as a gateway to the spinal cord: clinical needs, biomaterials, and imaging technologies. *NPJ Regen Med.* 3:8. <http://doi.org/10.1038/s41536-018-0046-3>
195. Tang X, Alavi S (2011) Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. *Carbohydr Polym* 85:7–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.030>
196. Hassan C.M., Peppas N.A. (2000) Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. ISBN: 978-3-540-67313-2. In: *Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*. Advances in Polymer Science. 153. Springer, Berlin, Heidelberg.
197. Otsuka E, Suzuki A (2009) A simple method to obtain a swollen PVA gel crosslinked by hydrogen bonds. *J Appl Polym Sci* 114:10–16. <https://doi.org/10.1002/app.30546>
198. Kodavaty, J. and Deshpande A (2014) Mechanical and Swelling Properties of Poly (vinyl alcohol) and Hyaluronic Acid Gels used in Biomaterial Systems - a Comparative Study. *Def Sci J* 64:222–229. <https://doi.org/10.14429/dsj.64.7320>
199. Wang Y, Hsieh Y-L (2008) Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *J Memb Sci* 309:73–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.10.008>
200. Araujo A, Neves M, Azevedo W, et al. (1997) Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilisation. ISSN: 0951-208X. In: *Kluwer Academic Publishers* (ed). 11:67–70. <https://doi.org/10.1023/A:1018404103626>
201. Moreno-Cortez IE, Romero-García J, González-González V, et al (2015) Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA cross-linked with glutaraldehyde vapor. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 52:306–314. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.049>
202. Kim KJ, Lee SB, Han NW (1994) Kinetics of crosslinking reaction of PVA membrane with glutaraldehyde. *Korean J Chem Eng* 11:41–47. <https://doi.org/10.1007/BF02697513>
203. Gohil JM, Bhattacharya A, Ray P (2006) Studies On The Crosslinking Of Poly (Vinyl Alcohol). *J Polym Res* 13:161–169. <https://doi.org/10.1007/s10965-005-9023-9>
204. Smith BC (1995) *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. 2<sup>nd</sup> Edition. ISBN 9781420069297. CRC Press
205. Antonietti M, Caruso RA, Göltner CG, Weissenberger MC (1999) Morphology Variation of Porous Polymer Gels by Polymerization in Lyotropic Surfactant Phases. *Macromolecules* 32:1383–1389. <https://doi.org/10.1021/ma9812478>
206. Ahearne M, Yang Y, El Haj AJ, et al (2005) Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *J R Soc Interface* 2:455–463. <https://doi.org/10.1098/rsif.2005.0065>
207. Liebschner M, Bucklen B, Wettergreen M (2005) Mechanical Aspects of Tissue Engineering. *Semin Plast Surg* 19:217–228. <https://doi.org/10.1055/s-2005-919717>

208. Sonker AK, Rathore K, Nagarale RK, Verma V (2018) Crosslinking of Polyvinyl Alcohol (PVA) and Effect of Crosslinker Shape (Aliphatic and Aromatic) Thereof. *J Polym Environ* 26:1782–1794. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1077-3>
209. Peng Z, Li Z, Zhang F, Peng X (2012) Preparation and Properties of Polyvinyl Alcohol/Collagen Hydrogel. *J Macromol Sci Part B* 51:1934–1941. <https://doi.org/10.1080/00222348.2012.660060>
210. Liang XLX, Boppart S a. (2010) Biomechanical Properties of In Vivo Human Skin From Dynamic Optical Coherence Elastography. *IEEE Trans Biomed Eng* 57:953–959. <https://doi.org/10.1109/TBME.2009.2033464>
211. van Dommelen JAW, van der Sande TPJ, Hrapko M, Peters GWM (2010) Mechanical properties of brain tissue by indentation: Interregional variation. *J Mech Behav Biomed Mater* 3:158–166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2009.09.001>
212. Soza G, Grosso R, Nimsy C, et al (2005) Determination of the elasticity parameters of brain tissue with combined simulation and registration. *Int J Med Robot* 1:87–95. <https://doi.org/10.1002/rcs.32>
213. Agache GP, Monneur C, Leveque JL, De Rigal J (1980) Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. *Arch Dermatol Res.* 3:221-32. <https://doi.org/10.1007/BF00406415>
214. Peppas NA and Merrill EW (1976) Poly(vinyl alcohol) hydrogels: Reinforcement of radiation-crosslinked networks by crystallization. *J Polym Sci Polym Chem Ed* 14:441–457. <https://doi.org/10.1002/pol.1976.170140215>
215. Maldonado-Codina C and Efron N (2003) Hydrogel materials and manufacture. *Optom Pract* 4:101–113.
216. White DR, Woodard HQ, Hammond SM (1987) Average soft-tissue and bone models for use in radiation dosimetry. *Br J Radiol* 60:907–913. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-60-717-907>
217. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, et al (2013) Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int* 13:89. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-89>
218. Muthukumar M, Edwards SF (1982) Screening concepts in polymer solution dynamics. *Polymer (Guildf)* 23:345–348. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0032-3861\(82\)90333-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0032-3861(82)90333-0)
219. Rusling JF, Suib SL (1994) Characterizing Materials with Cyclic Voltammetry. *Adv Mater* 6:922–930. <https://doi.org/10.1002/adma.19940061204>
220. Daubinger P, Kieninger J, Unmüssig T, Urban G (2014) Electrochemical characteristics of nanostructured platinum electrodes-A cyclic voltammetry study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16:8392-8399. <http://doi.org/10.1039/C4CP00342J>
221. Miller C. (1991). *Ionic channels of excitable membranes*. 2<sup>nd</sup> Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer. 607.
222. Kook YM, Jeong Y, Lee K, Koh WG (2017) Design of biomimetic cellular scaffolds for co-culture system and their application. *J Tissue Eng* 8:2041731417724640–2041731417724640. <https://doi.org/10.1177/2041731417724640>
223. Mawad D, Odell R, Poole-Warren LA (2009) Network structure and macromolecular drug release from poly(vinyl alcohol) hydrogels fabricated via two crosslinking strategies. *Int J Pharm* 366:31–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.08.038>
224. Renkin EM (1956) Filtration, diffusion and molecular steving through porous cellulose membranes. *J Gen Physiol.* 5:820.

225. Siepmann J and Siepmann F (2008) Mathematical modeling of drug delivery. *Int J Pharm* 364:328–343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.004>
226. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P (2010) Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* 3:217-223.
227. Higuchi T (1963) Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci* 52:1145–1149. <https://doi.org/10.1002/jps.2600521210>
228. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, et al (1983) Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm* 15:25–35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
229. Shamaeli E and Alizadeh N (2014) Nanostructured biocompatible thermal/electrical stimuli-responsive biopolymer-doped polypyrrole for controlled release of chlorpromazine: Kinetics studies. *Int J Pharm* 472:327–338. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.036>
230. Ritger PL and Peppas NA (1987) A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J Control Release* 5:23–36. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4)
231. Varshosaz J, Hajian M (2004) Characterization of Drug Release and Diffusion Mechanism Through Hydroxyethylmethacrylate/Methacrylic Acid pH-Sensitive Hydrogel. *Drug Deliv* 11:53–58. <https://doi.org/10.1080/10717540490265298>
232. LoPachin RM, Gavin T (2014) Molecular Mechanisms of Aldehyde Toxicity: A Chemical Perspective. *Chem Res Toxicol* 27:1081–1091. <https://doi.org/10.1021/tx5001046>
233. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81–128. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
234. O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N (2005) Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. *Crit Rev Toxicol* 35:609–662. <https://doi.org/10.1080/10408440591002183>
235. Kehrer JP and Biswal SS (2000) The Molecular Effects of Acrolein. *Toxicol Sci* 57:6–15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/57.1.6>
236. Gough JE, Scotchford CA, Downes S (2002) Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *J Biomed Mater Res* 61:121–130. <https://doi.org/10.1002/jbm.10145>
237. Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA (2003) Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques* 34:260–264. <http://doi.org/10.2144/03342bm05>
238. Lanier LM, Slack JM, Volkman L (1996) Actin Binding and Proteolysis by the Baculovirus AcMNPV: The Role of Virion-Associated V-CATH. *Virology* 216:380–388. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0073>
239. Turnbull PJ, Cormack SB, Huismans H (1996) Characterization of the gene encoding core protein VP6 of two African horsesickness virus serotypes. *J Gen Virol* 77:1421–1423. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-7-1421>
240. O'Brien GJ, Bryant CJ, Voogd C, et al (2000) Rotavirus VP6 Expressed by PVX Vectors in *Nicotiana benthamiana* Coats PVX Rods and Also Assembles into Viruslike Particles. *Virology* 270:444–453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/viro.2000.0314>

241. Monsma SA, Oomens AG, Blissard GW (1996) The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol* 70:4607–4616
242. Schasfoort RBM (2017) Chapter 1 Introduction to Surface Plasmon Resonance. In: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. ISBN: 978-1-78262-730-2. The Royal Society of Chemistry. 1–26. <https://doi.org/10.1039/9781788010283-00001>
243. Huang X, El-Sayed MA (2010) Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J Adv Res* 1:13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>
244. Amendola V, Pilot R, Frascioni M, et al (2017) Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *J Phys Condens Matter* 29:203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648x/aa60f3>
245. Azzazy H, Mansour M, Samir T, Franco R (2011) Gold nanoparticles in the clinical laboratory: Principles of preparation and applications. *Clin Chem Lab Med*. 2:193-209. <http://doi.org/10.1515/CCLM.2011.732>.
246. García-García WI (2016) Estudio de la interacción de los nanotubos de VP6 funcionalizados con metales y células en cultivo: hacia nuevas aplicaciones. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
247. Park J-W, Shumaker-Parry JS (2014) Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. *J Am Chem Soc* 136:1907–1921. <https://doi.org/10.1021/ja4097384>
248. Hiraku Y, Guo F, Ma N, et al (2015) Multi-walled carbon nanotube induces nitrate DNA damage in human lung epithelial cells via HMGB1-RAGE interaction and Toll-like receptor 9 activation. *Part Fibre Toxicol*. 13:16. <http://doi.org/10.1186/s12989-016-0127-7>
249. Allegrì M, Perivoliotis DK, Bianchi MG, et al (2016) Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicol Reports* 3:230–243. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.01.011>
250. Ju L, Zhang G, Zhang X, et al (2014) Proteomic analysis of cellular response induced by multi-walled carbon nanotubes exposure in A549 cells. *PLoS One* 9:e84974–e84974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084974>
251. Srivastava RK, Pant AB, Kashyap MP, et al (2011) Multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and apoptosis in human lung cancer cell line-A549. *Nanotoxicology* 5:195–207. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.503944>
252. Koch S (2017) Multiple Immunochemical Staining Techniques. *Immunohistochem. Immunocytochem.* In. S. Renshaw (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781118717769.ch4>
253. Imaninezhad M, Schober J, Griggs D, et al (2018) Cell Attachment and Spreading on Carbon Nanotubes Is Facilitated by Integrin Binding. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6:129
254. Gupta P, Rajput M, Singla N, et al (2016) Electric field and current assisted alignment of CNT inside polymer matrix and its effects on electrical and mechanical properties. *Polymer (Guildf)* 89:119–127. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.02.025>
255. Khalifa A, Gao Z, Bermak A, et al (2015) A novel method for the fabrication of a high-density carbon nanotube microelectrode array. *Sens Bio-Sensing Res* 5:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.04.001>
256. Kaufmann T, Ravoo BJ (2010) Stamps, inks and substrates: polymers in microcontact printing. *Polym Chem* 1:371–387. <https://doi.org/10.1039/B9PY00281B>

257. Oghihara H, Kibayashi H, Saji T (2012) Microcontact Printing for Patterning Carbon Nanotube/Polymer Composite Films with Electrical Conductivity. *ACS Appl Mater Interfaces* 4:4891–4897. <https://doi.org/10.1021/am3012214>
258. Tamarchenko T, Frenkel M, Mezzatesta A (1999) 3-D Modeling of Resistivity Devices. In: *Three-Dimensional Electromagnetics*. Society of Exploration Geophysicists, pp 600–610
259. Johnson D (2016) *Fundamentals of Electrical Engineering I*. In. Rice University (Ed.). Houston, Texas.
260. Muangpaisan W, Hori H, Brayne C (2009) Systematic Review of the Prevalence and Incidence of Parkinson's Disease in Asia. *J Epidemiol* 19:281–293. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20081034>
261. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, et al (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 5:384–386. <http://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03>
262. Elizondo-Cárdenas G, Déctor-Carrillo MA M-R, HR et al. (2011) Genética y la enfermedad de Parkinson: revisión de actualidades. *Med Univ* 13:69-117
263. Ferreira JJ, Katzenschlager R, Bloem BR, Bonuccelli U B, D, Deuschl G et al. (2013) Summary of the recommendations of the EFNS/MDS-ES review on therapeutic management of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 1:5–15. <http://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03866.x>.
264. Williams A, Gill S, Varma T, et al (2010) Deep brain stimulation plus best medical therapy versus best medical therapy alone for advanced Parkinson's disease (PD SURG trial): a randomised, open-label trial. *Lancet Neurol* 9:581–591. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70093-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70093-4)
265. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R (2008) Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harb Protoc* 2008:pdb-prot4986. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
266. Prophet EB (1992) *Laboratory methods in histotechnology*. ISBN: 1-881041-00-X. In. Amer Registry of Pathology. Washinton DC.
267. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, et al. (2017) Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3:17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
268. Tran T, Brophy JM, Suissa S, Renoux C (2015) Risks of Cardiac Valve Regurgitation and Heart Failure Associated with Ergot- and Non-Ergot-Derived Dopamine Agonist Use in Patients with Parkinson's Disease: A Systematic Review of Observational Studies. *CNS Drugs* 29:985–998. <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0293-4>

# ***Anexo 1***



# Poly(vinyl alcohol co-vinyl acetate) as a novel scaffold for mammalian cell culture and controlled drug release

Francisca Villanueva-Flores<sup>1</sup> , Margarita Miranda-Hernández<sup>2</sup> , José O. Flores-Flores<sup>3</sup> , Alberto Porrás-Sanjuanico<sup>1</sup> , Hailin Hu<sup>2</sup> , Leonor Pérez-Martínez<sup>1</sup> , Octavio T. Ramírez<sup>1</sup> , and Laura A. Palomares<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ave. Universidad 2001. Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>2</sup> Instituto de Energías Renovables, Universidad Nacional Autónoma de México, Priv. Xochicalco S/N, 62580 Temixco, Morelos, Mexico

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N. Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

Received: 8 November 2018

Accepted: 30 January 2019

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## ABSTRACT

Tissue engineering requires novel smart materials to sustain cell growth, tissue regeneration and in situ drug release in a controlled mode. Also, biocompatible synthesis methods are needed to immobilize biologically active compounds. Poly(vinyl alcohol co-vinyl acetate) (PACVA) was synthesized at 37 °C using glutaraldehyde (GA) as a crosslinking agent. The mechanical characteristics of the polymer were manipulated by varying crosslinking degrees using different GA concentrations. Materials with Young's modules similar to soft tissues, adequate for tissue engineering, were obtained. PACVA was a pH-responsive material with maximum swelling at pH 5.8. When hydrated, PACVA was electro-responsive. Fluorescein was used as a model molecule to characterize the releasing properties of the polymer. Effective diffusivities were a function of the crosslinking degree. Release rates were proportional to temperature and were faster at lower GA contents. According to a fit to the Korsmeyer–Peppas' model, diffusion at 5 and 10% GA was Fickian, but at 20% GA, diffusion was abnormal. To promote cell attachment and neutralize free aldehyde groups, PACVA hydrogels were covered with poly-L-lysine and laminin, which supported growth of lung carcinoma and mouse hypothalamic cells without signs of cytotoxicity or oxidative stress. An intelligent low-cost hydrogel with properties that can be easily modulated was synthesized and fully characterized. Its properties make it suitable for tissue engineering applications, as they mimic the mechanical properties of natural tissues.

Address correspondence to E-mail: laura@ibt.unam.mx

<https://doi.org/10.1007/s10853-019-03402-1>

Published online: 07 February 2019

## Introduction

Hydrogels are ideal scaffolds for cell culture due to their high water content, similar to that of soft tissues, their tunable physical and chemical properties, and their tridimensional structure that allows the diffusion of nutrients and cellular waste through the network [1]. The design of biologically active scaffolds with optimal physicochemical characteristics is one of the key factors for successful tissue engineering [2, 3]. Some of the desired characteristics of a suitable hydrogel to be used as scaffold for cell culture tissue engineering include biocompatibility, capacity for cell adhesion, a tunable surface, no cytotoxicity, electrical conductivity and adequate mechanical properties [1, 3, 4]. Development of advanced functional biomaterials that respond to stimulus as natural tissues is needed to generate smart 3D biomimetic scaffolds that actively interact with cells [5]. Ideal materials should promote cell growth and differentiation into functional tissues, and they should be synthesized at temperatures compatible with biologically active thermosensitive compounds, which quickly decompose at the high temperatures often used for synthesis. Moreover, harsh synthesis conditions that may leave cytotoxic traces of reagents not compatible with biological systems should be avoided. Additional properties are needed for real-life biomimetic applications. It is also desirable that the material responds to external stimuli, allowing controlled drug release, in order to provide the environment needed to grow excitable tissues [6]. Biocompatible materials with the adequate physicochemical properties of scaffolds for cell growth and controlled drug release are needed to meet the challenges of tissue engineering.

An excellent candidate material is crosslinked poly(vinyl alcohol) (PVA), which is especially suitable for tissue engineering due to its high stability and mechanical properties [7]. The crosslinked network of poly(vinyl alcohol co-vinyl acetate) (PACVA) has interesting physical and chemical properties [7, 8] that remain to be extensively characterized for tissue engineering applications, such as the ones investigated here. The possibility of responding to external stimuli for the controlled release of substances and the use of the material as a scaffold for cell growth have not been investigated before. In this work, we used mild PACVA synthesis conditions [9] that

resulted in a hydrogel with particular moldable properties. Hydrogels with three crosslinking degrees were obtained by varying the content of glutaraldehyde (GA), the crosslinking agent, and the resulting hydrogels were extensively characterized. It was possible to tune the properties of PACVA by varying the GA content, resulting in different microstructures, swelling degrees, mechanical behaviors, ionic permeabilities, and controlled release rates of fluorescein, a model molecule. The resulting material was able to support the growth of mouse hypothalamic and human carcinoma cells after eliminating the cytotoxicity of unreacted aldehyde groups by neutralization with poly-L-lysine and laminin. This is the first time that it is demonstrated that PACVA is a pH-responsive material, capable of releasing a model molecule in a controlled mode. The study presented here integrates two properties of PACVA, controlled molecule delivery and support for cell growth, into a smart scaffold that offers a new alternative for tissue engineering.

## Materials and methods

### Synthesis of PACVA hydrogels

Poly(vinyl alcohol) (PVA) (Aldrich, 11773 Mowiol® 20-98, Mw 125,000) was dissolved in double distilled water to 10% w/v in a water bath at 80 °C with magnetic stirring. This solution was mixed with different amounts of glutaraldehyde (GA) (Sigma, G7651) in the absence of an acid catalyst. The mix was incubated for 72 h at 37 °C. The expected reaction is shown in Fig. 1.

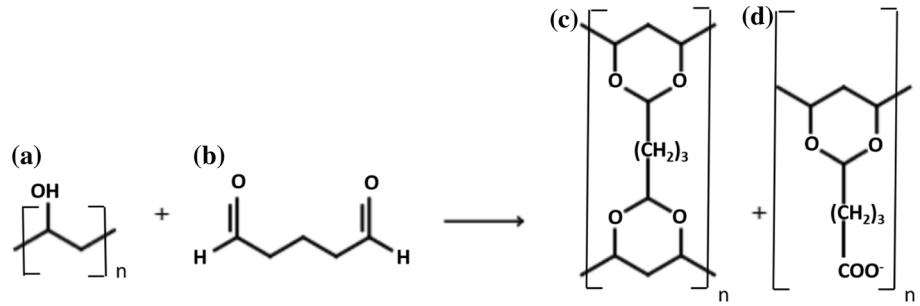
### Characterization of PACVA

#### FTIR

Films were analyzed by FTIR as described by Mansur et al. [10]. Thin films of the hydrogel were synthesized in 24 flat well plates (Costar®, 2548). 0.1 mL of PVA 10% v/v and GA (37% v/v) was added to each well and diluted with 0.1 mL of deionized water to allow for better dispersion on the plate. The mix was incubated for 72 h at 37 °C. Films were dried in a desiccator in presence of MgSO<sub>4</sub> (Merck, 106067) for 7 days or until the dry weight remained constant.



**Figure 1** Reaction between poly(vinyl alcohol) (a) and glutaraldehyde (b) to form poly(vinyl alcohol co-vinyl acetate) when polymerization is complete (c) or incomplete (d).



Fourier-transform infrared (FTIR) spectra were obtained at a range of 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ , using a Thermo Nicolet Nexus 670 spectrometer in transmittance mode. Absorptions at 3300  $\text{cm}^{-1}$  ( $A_{3300\text{cm}^{-1}}$ ), 1460  $\text{cm}^{-1}$  ( $A_{1460\text{cm}^{-1}}$ ), 1650  $\text{cm}^{-1}$  ( $A_{1650\text{cm}^{-1}}$ ) and 1710  $\text{cm}^{-1}$  ( $A_{1710\text{cm}^{-1}}$ ) were used to calculate the relative content of hydroxyl groups and acetal bridges, as described in Mansur et al. [10] and Eqs. 1 and 2.

$$\text{Hydroxyl groups} = \frac{A_{3300\text{cm}^{-1}}}{A_{1450\text{cm}^{-1}} * A_{1650\text{cm}^{-1}}} \quad (1)$$

$$\text{Acetal bridges} = \frac{A_{1710\text{cm}^{-1}}}{A_{1450\text{cm}^{-1}}} \quad (2)$$

### Mechanical properties

The tensile strength, Young’s modulus, yield stress and elastic deformation were determined by uniaxial compression of the hydrated PAcVA network at 24 °C and 65% of relative humidity with a mechanical testing machine (MTS, model Sintech 1/S, USA). A cylindrical flat tip (25 mm diameter) at a constant velocity of 100  $\text{mm min}^{-1}$  with a cell nominal load of 500 N (353.45 N of effective charge) was used.

Tensile strength was calculated according to the maximum strength in graphs of strength versus time. Young’s modulus was calculated from the slopes of the strain ( $\sigma$ ) versus deformation ( $\varepsilon$ ) graphs, as follows (Eqs. 3 and 4):

$$\text{Young’s modulus} = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon} \quad (3)$$

$$\Delta\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (4)$$

where  $\Delta\varepsilon$  is the ratio between the change of length ( $\Delta l$ ) over the initial length,  $l_0$ .

Yield stress was calculated from the maximum strain in graphs of strain versus deformation. Elastic

deformation was the deformation at the maximum yield strain.

### Swelling degree

Completely dry and pre-weighed PAcVA disk-shaped samples were placed in  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (J. T. Baker, 3252-01) and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (J. T. Baker, 3246-01) (1 M) buffer at various volume ratios to obtain different pH values: 5.8, 7.0 and 8.0, keeping ionic force constant. At time intervals, hydrogel disks were removed from buffer and weighed after blotting with a filter paper to remove unabsorbed liquid. Data presented are the mean values of 3 independent samples. Swelling degrees ( $D_s$ ) (%) were calculated using Eq. 5, as reported by [11]:

$$D_s(\%) = \left( \frac{W_h - W_d}{W_d} \right) \times 100 \quad (5)$$

where  $W_h$  and  $W_d$  are the weights of hydrated and dehydrated hydrogels, respectively.

### Electrochemical characterization

The experimental system was an electrochemical cell with three electrodes connected to a PGZ301 potentiostat (VoltaLab®) for application of a potential difference. The working electrode was a platinum wire (Sigma Aldrich, 267201) covered with a layer of 0.1 mm of PAcVA films, synthesized as described above. The counter electrode was a platinum mesh of area larger than the working electrode, and the reference electrode was a saturated calomel electrode (SCE,  $E_0 = 0.24\text{ V}$ ). The electrolyte was 0.1 M  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (Sigma, 203726) dissolved in ultrapure MilliQ™ water. All potentials reported in this work were corrected with respect to the normal hydrogen electrode. Data acquisition was performed with the Voltmaster 4 software.

Cyclic voltammetry was used to describe the potential intervals where reduction and oxidation of hydrated PAcVA occurred. Potential was varied from the rest potential ( $E_0 = -560$  mV vs. SCE) in the negative direction at 10 mV steps until reaching the negative limiting potential,  $E - \lambda = -1.0$  V versus SCE, at a scan rate of  $50 \text{ mV s}^{-1}$  for at least 5 cycles. Where indicated, films were previously dried in a desiccator in the presence of  $\text{MgSO}_4$  (Merck, 106067) until dry weight remained constant.

### Scanning electron microscopy (SEM)

PAcVA films were dried in a desiccator in presence of  $\text{MgSO}_4$  (Merck, 106067) until the dry weight remained constant. Dried films were coated with carbon. Scanning electron microscopy (SEM) images were obtained with a JSM 5600-LV microscope.

### Atomic force microscopy

Atomic force microscopy (AFM) measurements were carried out in an ASYLUM RESEARCH Oxford Instrument microscope model MFP-3D Origin. For high-resolution topographic analysis of PAcVA,  $4 \text{ mm}^2$  of film was cut and put on a glass support. Each sample was analyzed in AC air mode with a high-resolution probe model SSS-NCH (NANOSENSORS<sup>TM</sup>).

### Fluorescein immobilization

Fluorescein was immobilized into PAcVA (Sigma, F2456) by the addition of 100  $\mu\text{L}$  of the reaction mix for the synthesis of PAcVA to 96 well plates (Corning Costar, 3591), varying the amount of GA in order to obtain hydrogels with different crosslinking degrees. The mix was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 36 h; afterward, 100  $\mu\text{L}$  of a fluorescein solution at various concentrations was added to each well. The mix was incubated for 3 h at room temperature to allow dispersion of fluorescein in the hydrogel network. After incubation, plates were heated at  $37^\circ\text{C}$  for 36 h.

### Fluorescein release kinetics

$156 \mu\text{g cm}^{-2}$  of fluorescein was immobilized in PAcVA disks. Afterward, disks were washed three times with deionized water to discard unadsorbed fluorescein. Then, 200  $\mu\text{L}$  of deionized water was

added and fluorescein release kinetics were followed by measuring absorbance at 490 nm in a microplate reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, USA). Different network crosslinking degrees and temperatures were tested.

The distribution of fluorescein into the PAcVA network was determined by fluorescence images acquired with an Olympus FV1000 confocal 2P upright BX61WI microscope ( $\lambda_{\text{exc}}$  514 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  488 nm) and a 60X S/1.3 objective.

### Models for drug release

To determine effective diffusivities of fluorescein across PAcVA films, the following assumptions were made: (1) There is no momentum or heat transfer, (2) there is only mass transfer by diffusion (there is no convection), (3) there is no change in volume during transfer, (4) there is no chemical reaction during fluorescein release, (5) mass transport occurs only in the "z" axis, (6) there is no interfacial resistance and (7) the polymer has a flat-plate geometry. With these considerations, we obtained Eq. 6. The procedure followed can be consulted in the supplementary material 1 (S1).

$$\bar{x}(t) = x_e + \frac{8(x_0 - x_e)}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^2} e^{-\frac{(2n-1)^2 \pi^2 D_{\text{eff}} t}{4L^2}} \quad (6)$$

where  $\bar{x}(t)$  is fluorescein concentration in the polymer at time  $t$ ,  $x_0$  is fluorescein concentration at time zero,  $x_e$ , concentration of fluorescein in the polymer at equilibrium,  $D_{\text{eff}}$  is effective diffusivity, and  $L$  is material thickness. Data were fitted to this equation using a nonlinear square-fit procedure employing Excel's Problem Solver (Excel for Windows 2016; Microsoft Inc.).

### Cell culture

Thin films of PAcVA were synthesized in 24 well plates (Costar, 2548), as described above. To remove residual GA and neutralize pH, films were exhaustively washed with PBS until pH was 7.2. Washed films were sterilized with UV light for 60 min and dried at room temperature overnight. Hydrogels were coated with 1 mL of poly-L-lysine (Sigma, P4707) per well. Plates were incubated for 30 min at room temperature and then washed twice with sterile deionized water. This treatment was followed by coating with laminin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  dissolved in PBS,

1 mL/25 cm<sup>2</sup>) (Sigma, L2020) and incubating for 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. PAcVA films were finally washed twice with culture medium. To prevent nutrient absorption into PAcVA, as we have previously observed, films remained covered with culture medium overnight. Empty wells were used as controls.

After incubation, we added 1 mL of embryonic mouse hypothalamic mHypoE-N1 or human lung carcinoma A-549 cell suspensions ( $50 \times 10^3$  cells) in IMDM (Sigma, I7633) or DMEM (Sigma, D7777), respectively. Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, 12657029). Cells were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Micrographs were taken periodically with a Nikon DS-Qi1Mc camera coupled to a Nikon eclipse TE300 microscope.

Cell proliferation was measured using the CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, G3581), according to the manufacturer's instructions. Lactate dehydrogenase levels were measured as a biomarker for cytolysis using the Pierce<sup>™</sup> LDH Cytotoxicity Assay kit (Thermo Fisher Scientific, 88953). Reactive oxygen species were measured with the Image-iT<sup>™</sup> LIVE Green Reactive Oxygen Species (ROS) Detection kit (Thermo Fisher Scientific, I36007), following the manufacturer's instructions.

### Statistical analysis

All measurements reported are expressed as the average  $\pm$  standard deviation of at least 3 independent experiments. Statistical significances were calculated by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test.

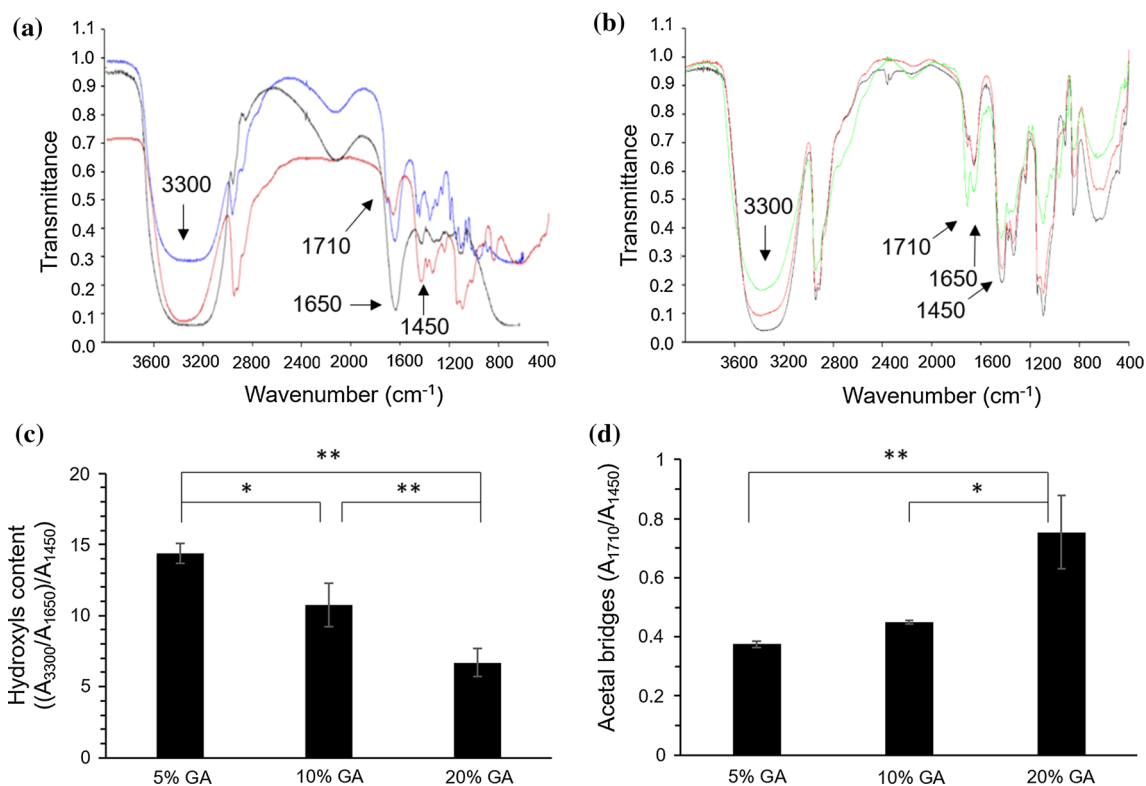
## Results and discussion

### Hydrogel synthesis and characterization

According to Figueireido et al. [9], PVA hydrogels have poor stability in water, which affects their performance. This limitation can be solved by crosslinking PVA hydrogels, which increases stability, reduces hydrophilicity and also provides a network capable of retaining molecules. There are various methods and molecules that can be used to crosslink PVA [9, 10, 12, 14–18]; GA was chosen here

because it can bind proteins [19, 20]. Protein binding on hydrogel surfaces can provide biological functionality to the polymer, such as enzyme or growth factor immobilization. The traditional way of preparing crosslinked PVA hydrogels with aldehydes uses acid catalysts, which results in traces of reagents not suitable for cell culture applications, and temperatures not compatible with biological systems. It has been previously reported that PAcVA can be synthesized without the acid catalyst [9], following a reaction mechanism well described previously by Kim et al. [20], but it has not been synthesized at low temperatures (below 55 °C). Physical methods to crosslink PVA, such as freezing and thawing cycles, have the advantage that no potentially cytotoxic additives are used, but the obtained materials can be unstable [21]. Here, we synthesized PAcVA in the absence of acid with different crosslinking degrees as determined by the amount of GA added at 37 °C, a temperature compatible with biological systems. Even when no acid was used, pH of the reaction was between 5 and 6, so it was neutralized after synthesis. The resulting material was colorless and translucent, suitable for the observation by optical microscopy of attached cells.

Reactants and hydrogels were analyzed by FTIR (Fig. 2), as described by Mansur et al. [10]. In Fig. 2a, the spectra of PVA, GA and the synthesized hydrogel are compared. The spectrum of the synthesized material was different to that of the reactants, indicating that a new chemical structure was formed. We can notice, for example, the band at 1710 cm<sup>-1</sup> that represents the carbonyl peak stretching, and the acetal bond (–C–O–C–) stretching vibrations at around 1087 cm<sup>-1</sup>. The peak due to C–O–C stretching is shifted to higher frequencies in the polymer, indicating the formation of C–O–C of acetal and ether bonds. The obtained spectrum was similar to the reference spectrum reported by Mansur et al. [10], indicating that synthesis was successful. In Fig. 2b, spectra of PAcVA synthesized with different amounts of GA are compared. Four major peaks are the most relevant. The first one, at 3300 cm<sup>-1</sup>, corresponds to hydroxyl groups (–OH). The second, at 1710 cm<sup>-1</sup>, corresponds to a stretching carbonyl group (–C=O); a third, at 1650 cm<sup>-1</sup>, has been exclusively attributed to the scissoring movement of the –OH bonds of water [13, 22]; and the fourth, at 1450 cm<sup>-1</sup>, is related to methylene (–CH<sub>2</sub>) groups that have been reported to remain almost constant at



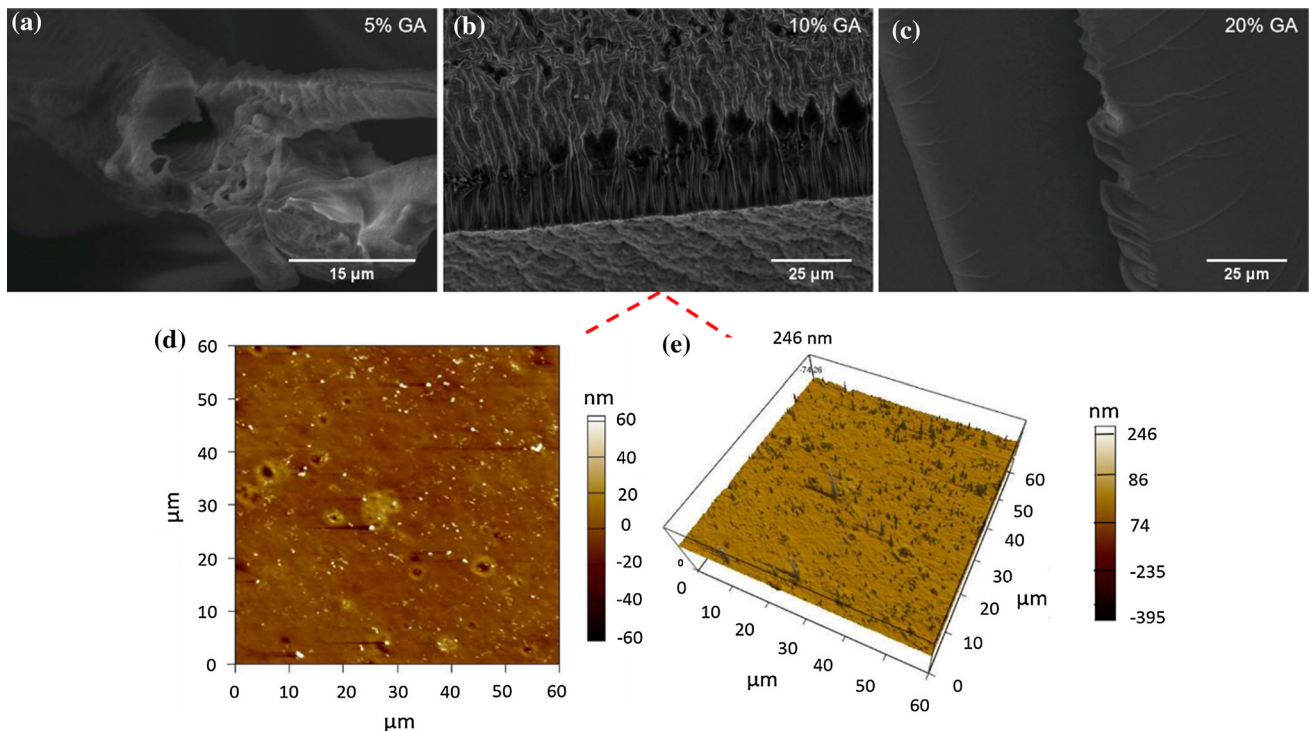
**Figure 2** FTIR analysis of PACVA. **a** Overlapped FTIR spectra of PVA (black), GA (blue) and PACVA (10% GA) (red). Line base was not corrected. **b** Overlapped FTIR spectra of PACVA with different crosslinking degrees (black 5% GA, red 10% GA, green

various crosslinking degrees [10]. Equations 1 and 2 were used to determine the crosslinking degrees of PACVA synthesized at different GA contents, as a reduction in the content of alcohol hydroxyls and an increase in the content of acetal bridges are expected when crosslinking occurs. Results are shown in Fig. 2c, d. Notice that the calculation of the relative abundance of hydroxyl groups was different to that used by Mansur et al. [10], who used the ratio of  $A_{3300}$  to  $A_{1450}$  that correspond to hydroxyl and methylene groups, respectively. It was decided not to use that ratio because hydroxyls from water and alcohol cannot be differentiated at  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Therefore, to quantitate hydroxyls only from the alcohol, the hydroxyl band was normalized with the water band at  $1650\text{ cm}^{-1}$ , and then with the band at  $1450\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to methylene groups, which remains constant. The relative concentration of hydroxyl groups of PVA that did not react with GA can then be estimated. An increase in acetal bridges and a decrease in hydroxyl groups were observed as the GA content increased, indicating that crosslinking

increased with GA concentration. Such results show that it is possible to manipulate the crosslinking degree by varying the quantity of GA added and that PACVA can be synthesized at  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , allowing for synthesis under conditions compatible with biological systems.

### Characterization by microscopy

To further characterize the synthesized material, AFM and SEM were used (Fig. 3). Interestingly, perpendicular views show that the amount of GA added changed the microscopic structure of the PACVA network. As shown in Fig. 3, the structure of the material is very different at the various crosslinking degrees tested. At 5% GA, empty spaces within an amorphous structure were observed (Fig. 3a), while highly oriented nanofibers (Fig. 3b) were observed at 10% GA. In contrast, PACVA with the highest content of GA (20%) resulted in a homogeneous polymeric phase (Fig. 3c). High-resolution AFM showed the presence of nanopores along the



**Figure 3** SEM and AFM images of dry PACVA films. SEM of cross-sectional views of three crosslinking degrees of PACVA varying the GA content **a** 5%, **b** 10%, **c** 20%, **d** and **e** High resolution AFM images of PACVA (10% of GA) showing

surface of PACVA (10% of GA) with a diameter between 0.8 and 1.5  $\mu\text{m}$  (Fig. 3d, e). The important differences in the microscopic structure of hydrogels synthesized with various GA contents are probably related to the different crosslinked densities, as previously observed by Antonietti et al. [22].

### Mechanical properties

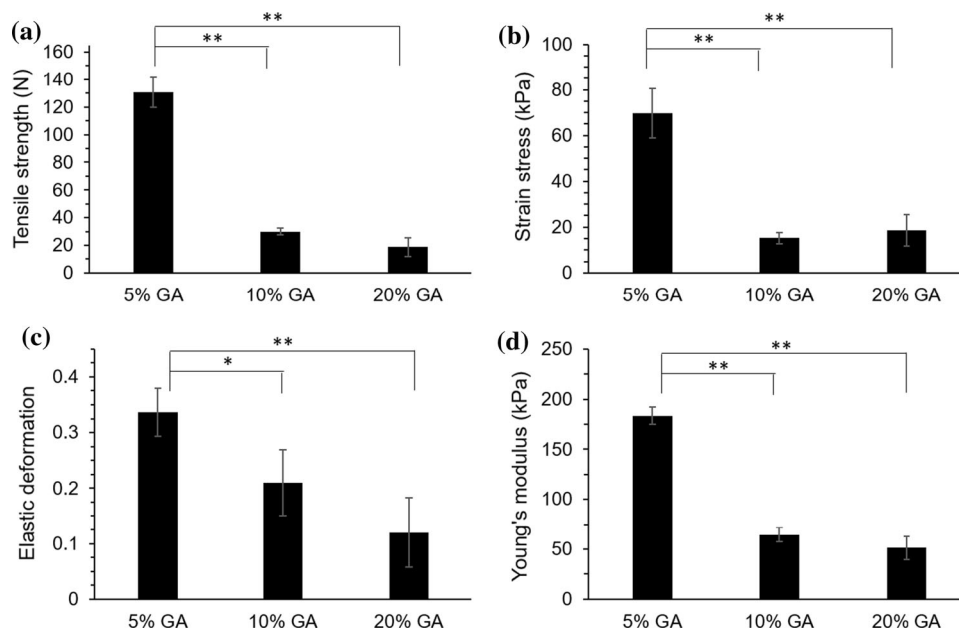
One of the main limitations of using hydrogels for in vitro tissue engineering is their poor mechanical properties [23], which are seldom studied. Suitable mechanical properties for each target tissue are necessary parameters for the adequate functionality of any implant, as implants will experience several deformation strains inside the body [24]. Mechanical properties of an adequate material for implants should mimic those of the target tissue to facilitate implant integration. Therefore, a rational design of materials for tissue engineering should consider the tensile strength, which indicates how much force can be resisted before breaking, and yield stress, needed to determine the strain that would

nanopores regularly distributed on the hydrogel surface. The color-coded bar on the right indicates the depth of the analyzed area.

provoke a permanent, damaging deformation of the material. Elasticity and the Young's modulus determine the diffusion capacity of molecules through the elastic hydrogel network, important for drug delivery [23, 25–27].

The mechanical properties of hydrated PACVA at different crosslinking degrees (Fig. 4) were evaluated. In contrast with what was expected, we observed that an increase in the GA content in the hydrogel dramatically reduced its tensile strength (Fig. 4a), yield stress (Fig. 4b), elasticity (Fig. 4c) and the Young's modulus (Fig. 4d). Reduced stiffness is possibly caused by a reduction in the number of hydroxyl groups, with a consequent reduction in hydrogen bonds, responsible for stiffness [28, 29]. The lower elasticity and Young's module as GA content increased are probably caused by a restriction in the mobility of PVA chains. Varying GA content is a simple way to modulate the mechanical properties of PACVA to obtain materials with properties similar to those of the target tissue. For example, the Young's moduli in PACVA containing 10% and 20% GA are in the same order of magnitude than the modulus of

**Figure 4** Mechanical properties of hydrated PACVA. **a** Tensile strength at three crosslinking degrees. **b** Yield stress at three crosslinking degrees. **c** Elastic deformation at three crosslinking degrees. **d** Young's modulus at three crosslinking degrees. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



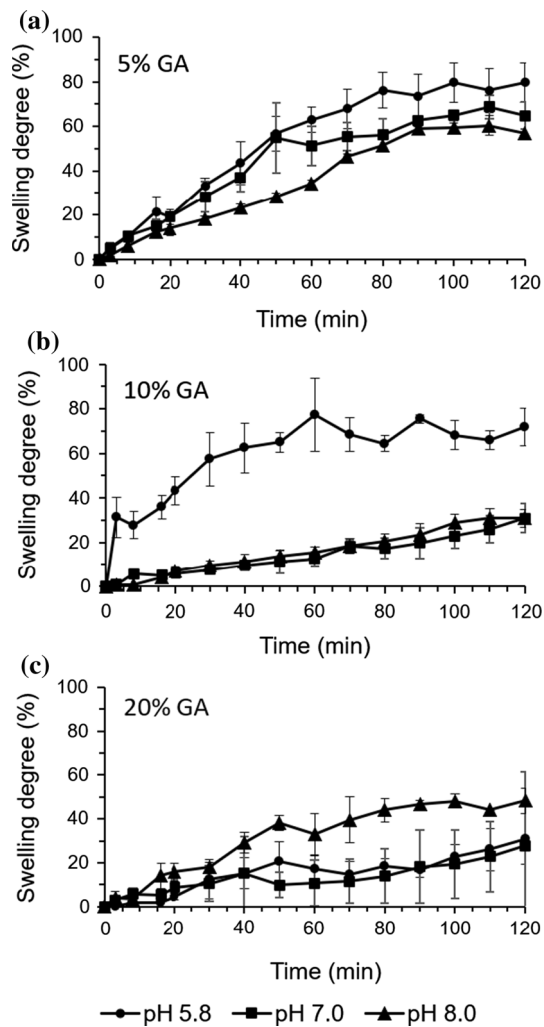
some soft tissues reported in the literature, such as brain, dorsal forearm and human palm [30–32].

Figure 5 shows that the swelling degree of PACVA is a function of pH and the crosslinking degree. The highest swelling degree was observed at pH 5.8 [32]. pH had a higher impact on swelling at 10% GA than at 5% GA. High pH drastically reduced swelling for such two GA concentrations. The lowest swelling was observed at 20% GA, where pH below 8 reduced swelling even more. Changes in the swelling degree are probably caused by deprotonation of carboxylic acid groups when polymerization is incomplete (Fig. 1, molecule d). The chains become negatively charged, repelling each other and increasing the swelling degree. PACVA behaved as a smart polymer, with the possibility of modulating swelling by varying pH. Interestingly, it has been reported that the pH of cancerous tissues can be as low as 5.8 as a result of anaerobic glycolysis, in contrast to normal tissue [33]. The swelling degree was maximum at acidic conditions, placing PACVA as a good candidate for controlled drug release in cancer therapies. Reduced swelling at 20% GA is possibly a result of a more compact matrix structure, as observed by SEM (Fig. 3c), which can cause a “screening effect,” as reported by Muthukumar and Edwards [34], where two species, in this case PVA remnant monomers and the PACVA polymer, interact and reduce swelling. It should be considered that SEM was performed on

dry samples and that the structure of hydrated gels is possibly different.

### Cyclic voltammetry

Electro-active polymers are particularly interesting for tissue engineering applications because they allow electrochemically controlled drug release or electrical cell stimulation [4]. Cyclic voltammetry provides information about the intrinsic redox reaction of a material as the potential of the electrode is changed in a cyclic manner and is an indication of ionic diffusion. The cyclic voltammogram is a plot of the measured current against the applied voltage to the working electrode versus the reference electrode [35]. Figure 6 shows the electrochemical characterization of PACVA at three crosslinking degrees (5%, 10% and 20% of GA content) and at two hydration states. The first hydration state is shown in black and corresponds to the voltammogram obtained immediately after PACVA was immersed into the electrolytic solution. The second state is shown in red and corresponds to the voltammogram obtained when PACVA was fully hydrated, after 6 h of immersion in the electrolytic solution. At least 5 cycles were performed for each material. At the partial hydration state, PACVA had an anodic peak at 400 mV, associated with the hydrogel reduction process (peak 1), and two cathodic peaks at  $-200$  mV (peak 2) and  $-500$  mV (peak 3), associated with two hydrogel oxidation processes. In contrast, when PACVA was



**Figure 5** Swelling of PAcVA at different crosslinking degrees **a** 5%, **b** 10%, **c** 20% and pH. Mean and standard deviations between three independent experiments are shown.

fully hydrated, peak 3 decreased and a novel peak appeared at  $-900$  mV. The peak at  $-900$  mV is characteristic of Pt-H desorption from the Pt electrode [36], and its appearance shows that hydrated PAcVA allows ion diffusion across its network. The crosslinking degree altered the electrochemical behavior of the polymers. The intensity of the cathodic peak (peak 1) was lower at 10% GA than at 5% GA, suggesting that higher crosslinking degrees reduced ion diffusion. Also, the intensity of peak 3 (oxidation) decreased as crosslinking increased, probably because of a higher content of acetal bridges (Fig. 2d), which have a lower redox response. These results show that PAcVA is an electro-responsive material in which ionic diffusion can be modulated by GA content. This is a practical advantage for a

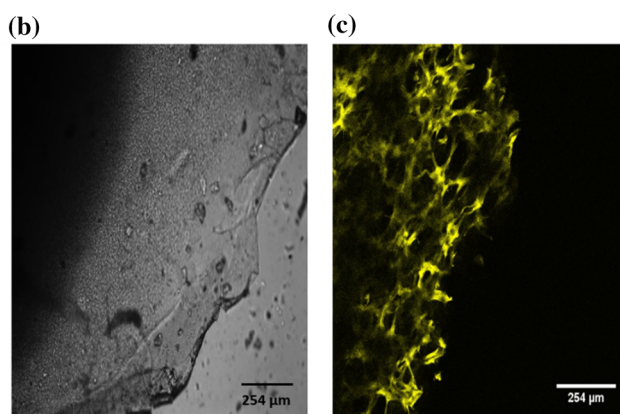
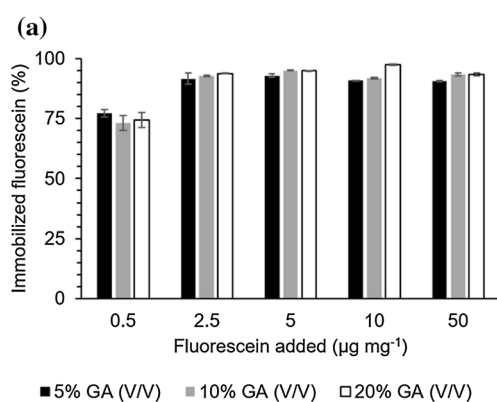
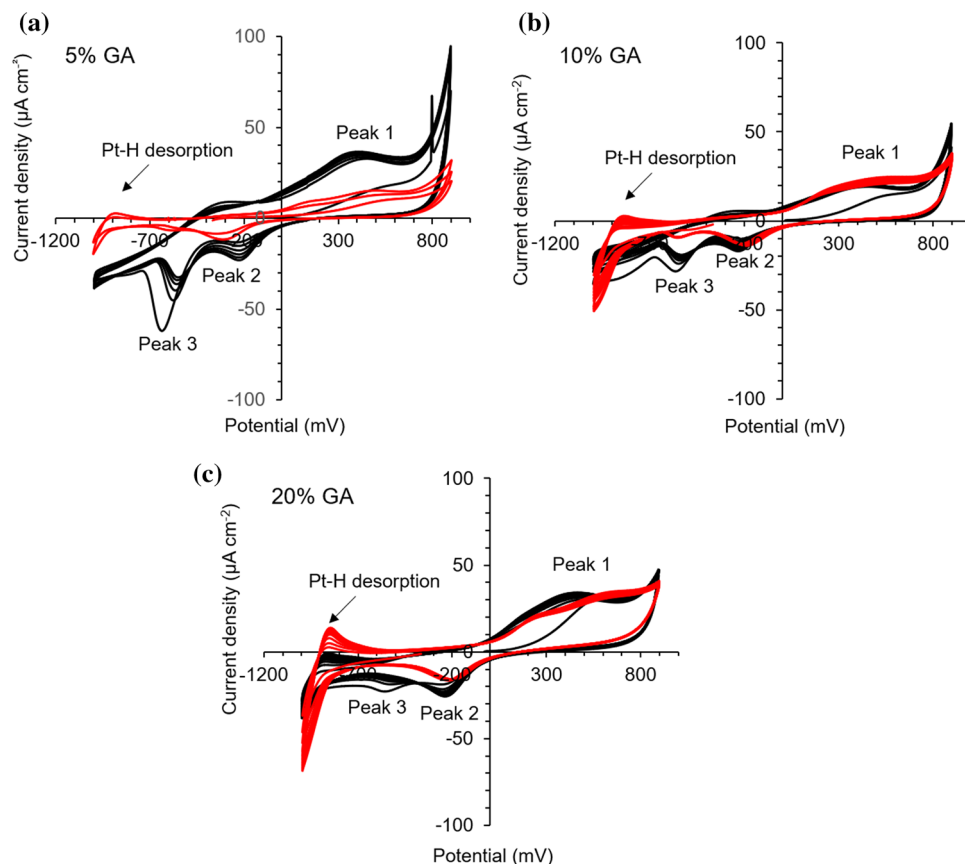
candidate material for tissue engineering, as ion movement is required for intercellular communication [37]. PAcVA has properties that can be easily tuned by chemical means for controlled substance release.

### Model molecule release

We used fluorescein as a model molecule to characterize controlled drug absorption and release from PAcVA films. Similar experiments were performed with gentamicin and heparin, with similar results (data not shown). It was observed that the same fraction of fluorescein was immobilized regardless of the crosslinking degree of PAcVA (Fig. 7a), indicating that no syneresis (liquid expelled from the hydrogel) occurred even at the highest crosslinking degree. The lowest fluorescein amount ( $0.5 \mu\text{g mg}^{-1}$  of PAcVA) resulted in a lower efficiency of fluorescein immobilization (below 80%). At higher fluorescein amounts, immobilization efficiency was higher than 90%. Confocal imaging of PAcVA (Fig. 7b and c) showed that fluorescein was distributed in the hydrogel network as we had previously observed by SEM (Fig. 3). A uniform distribution within PAcVA can be observed.

One of the most important characteristics of tissues is their capacity to respond to external stimuli. Fluorescein release kinetics as a function of crosslinking degrees were studied by measuring absorbance, as described in the materials and methods section (Fig. 8a). The amount of fluorescein released was inversely proportional to the PAcVA crosslinking degree. The maximum release of fluorescein was observed at 5% GA, followed by 10% and 20% GA, which is consistent with Mawad et al. [38], who reported that less physical entrapment of a drug is expected to occur in open network structures. Moreover, a combined effect of steric hindrance in the network and the frictional resistance of the PAcVA matrix (Fig. 3) can explain that a high amount of fluorescein remained entrapped in the network at 20% GA, as Renkin has described for regenerated cellulose, a comparable polymer [39]. In similar experiments, we evaluated the dependence of fluorescein release as a function of temperature. Fluorescein release rates were proportional to temperature, as can be expected from the Arrhenius equation (data not shown).

**Figure 6** Cyclic voltammetry of partially (black) and fully (red) hydrated PACVA states at different crosslinking degrees **a** 5%, **b** 10% and **c** 20%. At least 5 cycles were performed for each condition.



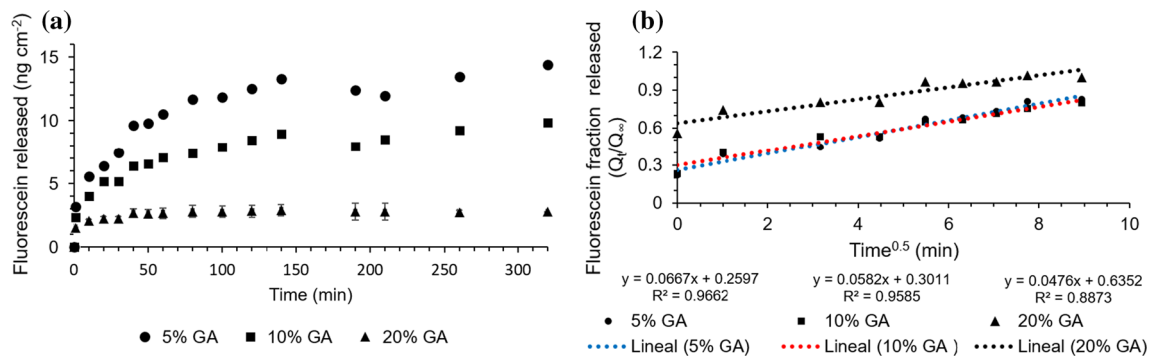
**Figure 7** Immobilization of fluorescein into PACVA polymers. **a** Relative fraction of fluorescein immobilized into PACVA at various crosslinking degrees. Three individual experiments are

shown. Error bars indicate the standard deviation between experiments. **b** Bright field (60X) and **c** confocal imaging of PACVA containing fluorescein.

To describe the kinetics of fluorescein release from hydrogels, several mathematical models have been used [40–42]. Most of the drug release systems can be described by zero-order or first-order kinetics (Table 1). Higuchi's model and the Korsmeyer–Peppas' model represent first-order kinetics [42–45]. These models are described in Table 1.

Data from kinetics of fluorescein release until 100 min (when the equilibrium was reached) were fitted to the models listed in Table 1. Kinetic constants and Pearson's coefficients were compared. Results are shown in Table 2. Based on the Pearson's correlation coefficients, the best fit for fluorescein release for 5 and 10% GA was obtained with the





**Figure 8** **a** Kinetics of fluorescein release from PACVA at different crosslinking degrees. Average and standard deviations from three individual experiments are shown. Error bars indicate the standard deviation between experiments. Some bars are smaller

than the symbols shown. **b** Normalized data averages fitted to the Korsmeyer–Peppas’ model for  $n = 0.5$ . The obtained correlation and Pearson’s correlation coefficients ( $R^2$ ) are shown.

**Table 1** Commonly used kinetic models for drug release

Kinetic model	Equation	Comments
Zero-order	$Q_t = Q_0 + K_0t$	The release rate of a drug is constant and independent of the drug concentration
First-order	$\text{Log } Q_t = \text{Log } Q_0 - K_0t$	The release rate of a drug is proportional to the drug concentration
Higuchi	$Q_t = K_0t^{1/2}$	Describes classical diffusion at early times
Korsmeyer–Peppas	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_0t^n$	It is useful to understand the mechanism of drug release, depending on the “ $n$ ” coefficient

$Q_t$  amount of drug released at the time “ $t$ ,”  $Q_0$  amount of drug released at time zero,  $Q_\infty$  amount of drug released at equilibrium,  $t$  time,  $K_0$  kinetic constant,  $n$  kinetic coefficient related to the mechanism of drug release

Higuchi’s model, which is equivalent to the Korsmeyer–Peppas’ model with  $n = 0.5$ . Fitting to the Korsmeyer–Peppas’ model provides information about the mechanism of drug release. According to Ritger and Peppas [45], the value of  $n$  depends on the overall solute diffusion mechanism. A value of  $n = 0.5$  is obtained when diffusion is Fickian (corresponding to the Higuchi’s model),  $0.5 < n < 1$  corresponds to anomalous (non-Fickian diffusion), a value of 1 is obtained for case II transport, and a value  $> 1$  is obtained for super case II transport. The value of  $n$  was set to these values to determine the mechanism of diffusion (Table 2). For 5 and 10% GA, the best fit was obtained when  $n$  was 0.5 (Table 2, Fig. 8b), indicating that the mechanism of diffusion was Fickian. However, none of the values of  $n$  proposed by Ritger and Peppas [45] was observed at 20% GA. The best fit was obtained at a value of  $n$  of 0.33, which constitutes a case not considered by Peppas. The structural difference observed by SEM (Fig. 3c) between PACVA synthesized at the various GA contents can explain the different diffusion mechanism

at 20% GA. PACVA at 20% GA was a homogeneous polymer (Fig. 3c), without visible pores. Such compact structure can cause fluorescein interactions with PACVA not considered by the Korsmeyer–Peppas’ model. It is possible that fluorescein diffusion is a more complex process at 20% GA, which cannot be described only in terms of porosity and tortuosity. It should be noted that this is the first time that the macromolecular structure of PACVA has been reported as function of GA content and the relation with the diffusion properties of a polymer. The mechanism of diffusion for this condition remains to be investigated.

We determined the effective diffusivity as a function of the crosslinking degree by fitting data shown in Fig. 8 to Eq. 6 (Table 2). The lowest effective diffusivity occurred at 10% GA, four times lower than with 5% GA. Effective diffusivities of fluorescein at 5 and 10% GA are comparable to diffusion coefficients for molecules of comparable size obtained in similar conditions, such as that of ephedrine-HCl released from a hydroxyethyl methacrylate/methacrylic acid

**Table 2** Kinetic parameters of fluorescein release from PACVA at three different crosslinking degrees

GA content (%)	Effective diffusivity ( $\times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	Zero-order		First-order		Higuchi		Korsmeyer–Peppas	
		$K \text{ (ng mL}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$	$R^2$	$K \times 10^{-3} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$R^2$	$K \times 10^{-3} \text{ (min}^{0.5}\text{)}$	$R^2$	$n$	$n$
5	$6.39 \pm 0.48$	$14.6 \pm 1.72$	0.85 ± 0.03	$4.13 \pm 0.33$	0.72 ± 0.05	$184 \pm 19$	0.95 ± 0.01	$0.91 \pm 0.01$	$0.95 \pm 0.01$
10	$1.67 \pm 0.14$	$8.93 \pm 0.57$	0.82 ± 0.06	$3.67 \pm 0.09$	0.71 ± 0.08	$113 \pm 6$	0.95 ± 0.01	$0.89 \pm 0.01$	$0.95 \pm 0.01$
20	$6.94 \pm 5.24$	$1.83 \pm 0.78$	0.64 ± 0.13	$1.70 \pm 0.54$	0.59 ± 0.12	$24 \pm 9$	0.83 ± 0.10	$0.74 \pm 0.14$	$0.83 \pm 0.10$

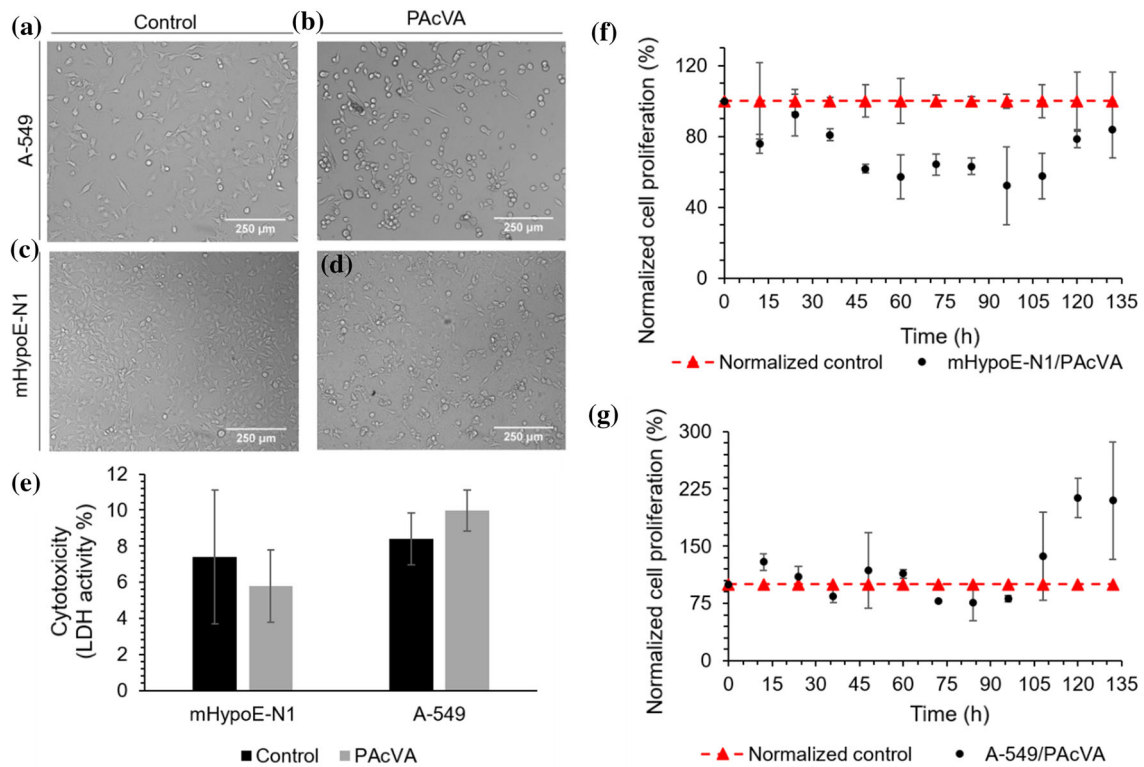
All the experiments were performed at room temperature and pH 7.0

$K$  kinetic constant,  $R^2$  Pearson's correlation coefficient,  $n$  kinetic coefficient

copolymer crosslinked with ethylene glycol dimethacrylate, with a diffusion coefficient of  $1.20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [46]. Calculated effective diffusivities at 20% GA varied widely, and it was not possible to conclude whether crosslinking had an effect at this crosslinking degree using Eq. 5. The “abnormal” diffusion observed at 20% of GA was possibly caused by interactions between fluorescein and the macromolecular mesh size formed at 20% of GA (Fig. 3c) not considered in Eq. 5. Moreover, the reduced swelling observed in Fig. 5, possibly caused by the “screening effect,” can also affect release kinetics. A more detailed study to correlate the PACVA macromolecular structure as function of GA content and its impact in diffusion can be used for the rational design of accurate and effective drug delivery systems for real-life applications.

### PACVA as a scaffold for cell culture

The complete characterization of PACVA showed that it is a hydrogel with several properties suitable for its use as a smart material for cell culture and tissue engineering. Accordingly, we evaluated its potential use in biological systems using cell culture as a first approach. As PACVA synthesized with 10% GA had mechanical properties comparable to those of soft tissues, we selected this material for further evaluation. Before using any synthesized polymer for cell culture, it is necessary to consider the potential toxicity of remnant reactants and intermediaries (shown in Fig. 1d). In this case, aldehyde derivatives were of special concern, as LoPachin and Gavin have reported that short saturated chain aldehydes cause toxicity by forming adducts with hard nucleophiles present in biological systems, e.g., primary nitrogen groups on lysine residues [47]. It has been reported that aldehydes derivatives can impair the functions of enzymes, DNA, structural proteins and other macromolecules, leading to the inhibition of cellular processes and eventual cytotoxicity [48–50]. To prevent this, PACVA disks were exhaustively washed as described in materials and methods and coated with poly-L-lysine to neutralize free aldehyde groups (Lewis acids) present in the semi-polymerized PACVA (Fig. 1d), followed by treatment with laminin. This coating procedure is commonly performed to sustain growth of attached cells. Afterward, PACVA disks were submerged into cell culture medium, to saturate them and prevent nutrient



**Figure 9** Cell growth on PacVA disks (10%GA). mHypoE-N1 grown on **a** cell culture plates without PacVA and **b** on PacVA disks at 48 h of culture. A-549 cells grown on **c** cell culture plates without PacVA and **d** on PacVA disks. **e** Cytotoxicity as

absorption into the PacVA hydrogel, as we have previously observed (data not shown). Cells from two different lineages, lung cells (A-549), from the endoderm, and brain cells (mHypoE-N1), from the ectoderm, were cultured on the hydrogel. Initial experiments with uncoated PacVA showed that cells did not adhere to hydrogel disks (data not shown), but treatment with poly-L-lysine and laminin after cell culture media saturation, resulted in attachment, growth and the formation of characteristic projections of these cells (Fig. 9a–d). Typical normalized cell growth kinetics, measured through metabolic activity, are shown in Fig. 9f, g. Proliferation of mHypoE-N1 cells during the first 60 h was slower on PacVA than in control cultures. Between 60 and 110 h, growth was similar. After 110 h, growth on PacVA was faster than in control cultures, until similar cell concentrations were reached. It is possible that cells adapted to grow on PacVA or that the concentration of autocrine factors that sustained growth increased with time, resulting in better growth at later times. In contrast, no difference on growth of A-549 cells with

measured through LDH activity at 72 h of culture ( $n = 3$ ). **f** and **g** Normalized cell proliferation as an indirect measurement of proliferation ( $n = 2$ ). Error bars represent standard deviations or difference between experiments.

or without PacVA was observed until 110 h of culture. Afterward, cells on PacVA reached cell concentrations two times higher than in control culture plates. No significant difference in the release of lactate dehydrogenase (LDH), a marker of cell death, was observed with or without PacVA (Fig. 9e), indicating that the reduced growth of mHypoE-N1 cells was not caused by cell death and that the developed material is not cytotoxic. No increase in the intracellular level of reactive oxygen species (ROS) was observed in cells cultured on plates or on PacVA disks, indicating that cells were not under oxidative stress (data not shown) at these conditions. Our results contrast with the report by Gough et al. [50], who found that a PVA collagen matrix cross-linked with GA was not compatible with cells. They observed apoptosis in human osteoblasts and discarded residual GA as a cause. Here, GA residues in PacVA were neutralized by poly-L-lysine and laminin, which also provided the positive charge needed for cell attachment, and pre-incubated with cell culture media, solving the limitations observed by

Gough et al. [50]. These results show that PAcVA is a versatile material that can sustain cell growth and therefore can be used for tissue engineering applications.

## Conclusions

The results reported here show that PAcVA is a material with particular properties that make it a good candidate for controlled drug release and for sustaining cell growth. We envision its application as a scaffold in multicellular devices that can restore cellular functions and promote tissue regeneration. We showed that PAcVA has adequate characteristics for the immobilization of bioactive compounds labile to extreme temperatures or pH. The obtained material had unique mechanical and electrical characteristics that resulted in controllable release of the model molecule fluorescein. The obtained material was colorless and translucent, allowing the observation of cells during growth experiments. The content of GA was used to modulate the crosslinking degree, microscopic structure and mechanical and electrical hydrogel properties. pH, temperature and electricity modulated the properties of PAcVA. Mechanical characteristics were similar to those of soft tissues, and therefore ideal for an *in vivo* implant. Drug release was also modulated as a result of the manipulated hydrogel characteristics, resulting in different effective diffusivities. Diffusion was Fickian at 5 and 10% GA, but abnormal at higher GA content, where PAcVA internal structure was more entangled. It was shown for the first time that PAcVA can sustain growth of cells from two different lineages, human lung carcinoma and mouse hypothalamus. Cell attachment and proliferation comparable with control cultures, or even better, were observed. No cytotoxicity or cytolysis caused by trace GA or other reagents was observed. It was possible to predetermine the properties of the material through simple manipulations, in order to design novel medical materials with *à la carte* properties, according to specific patient necessities, expanding the possible applications of PAcVA. Further research will be conducted to explore the potential use of PAcVA for tissue engineering applications.

## Acknowledgements

Research performed thanks to the financial support of the Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IT-200416. F. Villanueva received a scholarship from CONACyT during her graduate studies. We thank Mariana Ramírez Gilly (Facultad de Química UNAM), Melina Tapia Tapia (Instituto de Química UNAM), Manuel Aguilar Franco (Laboratorio Central de Microscopía UNAM), Martha A. Contreras, Ruth Pastor, Vanessa Hernández, Guadalupe Zavala Padilla, Arturo Pimentel Cabrera and the National Laboratory of Advanced Microscopy (LNMA-IBT-UNAM) for technical support.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Electronic supplementary material:** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10853-019-03402-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

## References

- [1] Zhu J, Marchant RE (2011) Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Exp Rev Med Dev* 8:607–626. <https://doi.org/10.1586/erd.11.27>
- [2] El-Sherbiny I, Yacoub M (2013) Hydrogel scaffolds for tissue engineering: progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract* 2013:316–342. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2013.38>
- [3] Kohane DS, Langer R (2008) Polymeric biomaterials in tissue engineering. *Pediatr Res* 63:487–491. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000305937.26105.e7>
- [4] Balint R, Cassidy NJ, Cartmell SH (2014) Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater* 10:2341–2353. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.015>
- [5] Khan F, Tanaka M (2017) Designing smart biomaterials for tissue engineering. *Int J Mol Sci* 19:17. <https://doi.org/10.3390/ijms19010017>
- [6] Furth ME, Atala A, Van Dyke ME (2007) Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 28:5068–5073. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.042>
- [7] Kumar A, Han SS (2017) PVA-based hydrogels for tissue engineering: a review. *Int J Polym Mater Polym Biomater*

- 66:159–182. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190930>
- [8] Rudra R, Kumar V, Kundu PP (2015) Acid catalysed crosslinking of poly vinyl alcohol (PVA) by glutaraldehyde: effect of crosslink density on the characteristics of PVA membranes used in single chambered microbial fuel cells. *RSC Adv* 5:83436–83447. <https://doi.org/10.1039/C5RA16068E>
- [9] Figueiredo KCS, Alves TLM, Borges CP (2009) Poly(vinyl alcohol) Films crosslinked by glutaraldehyde under mild conditions. *J Appl Polym Sci* 111:3074–3080. <https://doi.org/10.1002/app.29263>
- [10] Mansur HS, Sadahira CM, Souza AN, Mansur AAP (2008) FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Mater Sci Eng, C* 28:539–548. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088>
- [11] Fumio U, Hiroshi Y, Kumiko N et al (1990) Swelling and mechanical properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Int J Pharm* 58:135–142. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)0251-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)0251-X)
- [12] Gohil JM, Bhattacharya A, Ray P (2006) Studies on the crosslinking of poly(vinyl alcohol). *J Polym Res* 13:161–169. <https://doi.org/10.1007/s10965-005-9023-9>
- [13] Zhang Y, Zhu PC, Edgren D (2010) Crosslinking reaction of poly(vinyl alcohol) with glyoxal. *J Polym Res* 17:725–730. <https://doi.org/10.1007/s10965-009-9362-z>
- [14] Teramoto N, Saitoh M, Kuroiwa J et al (2001) Morphology and mechanical properties of pullulan/poly(vinyl alcohol) blends crosslinked with glyoxal. *J Appl Polym Sci* 82:2273–2280. <https://doi.org/10.1002/app.2075>
- [15] Chen CT, Chang YJ, Chen MC, Tobolsky AV (1973) Formalized poly(vinyl alcohol) membranes for reverse osmosis. *J Appl Polym Sci* 17:789–796. <https://doi.org/10.1002/app.1973.070170311>
- [16] Jian S, Xiao Ming S (1987) Crosslinked PVA-PS thin-film composite membrane for reverse osmosis. *Desalination* 62:395–403. [https://doi.org/10.1016/0011-9164\(87\)87040-6](https://doi.org/10.1016/0011-9164(87)87040-6)
- [17] Burshe MC, Sawant SB, Joshi JB, Pangarkar VG (1997) Sorption and permeation of binary water-alcohol systems through PVA membranes crosslinked with multifunctional crosslinking agents. *Sep Purif Technol* 12:145–156. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(97\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(97)00042-7)
- [18] Araujo AM, Neves MT Jr, Azevedo WM et al (1997) Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilisation. *Biotechnol Tech* 11:67–70
- [19] Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC (2004) Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* 37:790–796
- [20] Kim KJ, Lee SB, Han NW (1994) Kinetics of crosslinking reaction of PVA membrane with glutaraldehyde. *Korean J Chem Eng* 11:41–47. <https://doi.org/10.1007/BF02697513>
- [21] Hassan CM, Peppas NA (2000) Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. In: *BT—biopolymers · PVA hydrogels, anionic polymerisation nanocomposites*. Springer, Berlin, pp 37–65
- [22] Antonietti M, Caruso RA, Göltner CG, Weissenberger MC (1999) Morphology variation of porous polymer gels by polymerization in lyotropic surfactant phases. *Macromolecules* 32:1383–1389. <https://doi.org/10.1021/ma9812478>
- [23] Ahearne M, Yang Y, El Haj AJ et al (2005) Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *J R Soc Interface* 2:455–463. <https://doi.org/10.1098/rsif.2005.0065>
- [24] Liebschner M, Bucklen B, Wettergreen M (2005) Mechanical aspects of tissue engineering. *Semin Plast Surg* 19:217–228. <https://doi.org/10.1055/s-2005-919717>
- [25] Xia T, Liu W, Yang L (2017) A review of gradient stiffness hydrogels used in tissue engineering and regenerative medicine. *J Biomed Mater Res, Part A* 105:1799–1812. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36034>
- [26] Bas O, Catelas I, De-Juan-Pardo EM, Hutmacher DW (2018) The quest for mechanically and biologically functional soft biomaterials via soft network composites. *Adv Drug Deliv Rev* 132:214–234. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.015>
- [27] Sonker AK, Rathore K, Nagarale RK, Verma V (2018) Crosslinking of polyvinyl alcohol (PVA) and effect of crosslinker shape (aliphatic and aromatic) thereof. *J Polym Environ* 26:1782–1794. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1077-3>
- [28] Peng Z, Li Z, Zhang F, Peng X (2012) Preparation and properties of polyvinyl alcohol/collagen hydrogel. *J Macromol Sci Part B* 51:1934–1941. <https://doi.org/10.1080/0022348.2012.660060>
- [29] Liang XLX, Boppart SA (2010) Biomechanical properties of in vivo human skin from dynamic optical coherence elastography. *IEEE Trans Biomed Eng* 57:953–959. <https://doi.org/10.1109/TBME.2009.2033464>
- [30] van Dommelen JAW, van der Sande TPJ, Hrapko M, Peters GWM (2010) Mechanical properties of brain tissue by indentation: Interregional variation. *J Mech Behav Biomed Mater* 3:158–166. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2009.09.001>
- [31] Soza G, Grosso R, Nimsy C et al (2005) Determination of the elasticity parameters of brain tissue with combined

- simulation and registration. *Int J Med Robot* 1:87–95. <http://doi.org/10.1002/rcs.32>
- [32] Wadhwa R, Lagenaur CF, Cui XT (2006) Electrochemically controlled release of dexamethasone from conducting polymer polypyrrole coated electrode. *J Control Release* 110:531–541. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.10.027>
- [33] Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C et al (2013) Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int* 13:89. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-89>
- [34] Muthukumar M, Edwards SF (1982) Screening concepts in polymer solution dynamics. *Polymer (Guildf)* 23:345–348. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(82\)90333-0](https://doi.org/10.1016/0032-3861(82)90333-0)
- [35] Rusling JF, Suib SL (1994) Characterizing materials with cyclic voltammetry. *Adv Mater* 6:922–930. <https://doi.org/10.1002/adma.19940061204>
- [36] Daubinger P, Kieninger J, Unmüssig T, Urban G (2014) Electrochemical characteristics of nanostructured platinum electrodes—a cyclic voltammetry study. *Phys Chem Chem Phys* 16:8392–8399
- [37] Hille B (2001) *Ion channel excitable membranes*, 3rd edn. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, pp 1–37
- [38] Mawad D, Odell R, Poole-Warren LA (2009) Network structure and macromolecular drug release from poly(vinyl alcohol) hydrogels fabricated via two crosslinking strategies. *Int J Pharm* 366:31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.08.038>
- [39] Renkin EM (1954) Filtration, diffusion and molecular sieving through porous cellulose membranes. *J Gen Physiol* 38:225–243
- [40] Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P (2010) Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* 67:217–223
- [41] Siepman J, Siepman F (2008) Mathematical modeling of drug delivery. *Int J Pharm* 364:328–343. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.004>
- [42] Higuchi T (1963) Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci* 52:1145–1149. <https://doi.org/10.1002/jps.2600521210>
- [43] Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E et al (1983) Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm* 15:25–35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
- [44] Shamaeli E, Alizadeh N (2014) Nanostructured biocompatible thermal/electrical stimuli-responsive biopolymer-doped polypyrrole for controlled release of chlorpromazine: kinetics studies. *Int J Pharm* 472:327–338. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.036>
- [45] Ritger PL, Peppas NA (1987) A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J Control Release* 5:23–36. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4)
- [46] Varshosaz J, Hajian M (2004) Characterization of drug release and diffusion mechanism through hydroxyethyl-methacrylate/methacrylic acid pH-sensitive hydrogel. *Drug Deliv* 11:53–58. <https://doi.org/10.1080/10717540490265298>
- [47] LoPachin RM, Gavin T (2014) Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: a chemical perspective. *Chem Res Toxicol* 27:1081–1091. <https://doi.org/10.1021/tx5001046>
- [48] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81–128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
- [49] Kehrer JP, Biswal SS (2000) The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci* 57:6–15
- [50] Gough JE, Scotchford CA, Downes S (2002) Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *J Biomed Mater Res* 61:121–130. <https://doi.org/10.1002/jbm.10145>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

# *Anexo 2*

1       **Understanding cellular interactions with nanomaterials: Towards a rational**  
2                               **design of medical nanodevices**

3  
4       Francisca Villanueva-Flores<sup>a</sup>, Andrés Castro-Lugo<sup>a</sup>, Octavio T. Ramírez<sup>a</sup>, and  
5       Laura A. Palomares<sup>a\*</sup>

6  
7       a. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ave.  
8       Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México. 62210.

9  
10      \* To whom all correspondence should be addressed.

11  
12      FVF: [fran@ibt.unam.mx](mailto:fran@ibt.unam.mx)

13      ACL: [castroa@ibt.unam.mx](mailto:castroa@ibt.unam.mx)

14      OTR: [tonatiuh@ibt.unam.mx](mailto:tonatiuh@ibt.unam.mx)

15      LAP: [laura@ibt.unam.mx](mailto:laura@ibt.unam.mx), +52 777 3291646

16  
17  
18      **Abstract**

19  
20      Biomedical applications increasingly require new nanomaterials fully characterized.  
21      There is strong evidence showing that nanomaterials not only interact with cells  
22      passively but also actively, mediating essential molecular processes for the  
23      regulation of cellular functions, but we are only starting to understand the  
24      mechanisms of those interactions. Systematic studies about cell behavior as a  
25      response to specific nanoparticle properties are scarce in the literature even when  
26      they are necessary for the rational design of medical nanodevices. Information in  
27      the literature shows that their physicochemical properties determine the bioactivity,  
28      biocompatibility, and safety of nanomaterials. The information available regarding  
29      the interaction and responses of cells to nanomaterials has not been analyzed and  
30      discussed in a single document. Hence, in this review, we present the latest  
31      advances about cellular responses to nanomaterials and integrate the available  
32      information into concrete considerations for the development of innovative,  
33      efficient, specific and, more importantly, safe biomedical nanodevices. We focus on  
34      how physicochemical nanoparticle properties (size, chemical surface, shape,  
35      charge, and topography) influence cell behavior in a first attempt to provide a  
36      practical guide for designing medical nanodevices and to avoid common  
37      experimental omissions that may lead to data misinterpretation. Finally, we  
38      emphasize the importance of the systematic study of nano-bio interactions to  
39      acquire sufficient reproducible information that allows accurate control of cell  
40      behavior based on tuning of nanomaterial properties. This information is useful to  
41      guide the design of specific nanodevices and nanomaterials to elicit desired cell  
42      responses, like targeting, drug delivery, cell attachment, differentiation, etc., or to  
43      avoid undesired side effects.

44  
45      **Keywords:** Nanoparticle, nanomaterial, size, shape, charge, nanodevice, protein  
46      corona, coating, uptake.



48 **Abbreviations:** CNT, carbon nanotubes; IC50, half maximal inhibitory  
49 concentration; MW, multiple walled; NP, nanoparticle; ROS, reactive oxygen  
50 species; SW, single wall.

51

## 52 **1. Introduction**

53

54 Development of nanomaterials has created a new set of tools with unforeseen  
55 applications. Their size (1-100 nm) is in the same order of magnitude than cellular  
56 organelles, allowing a direct interaction of nanomaterials with cells, making them  
57 unique tools for influencing biological pathways and processes. Such interactions  
58 open a whole range of possible applications in biology (Nel et al. 2009). It has been  
59 widely demonstrated that an active interaction between living organisms and  
60 nanomaterials exists and that it impacts cell physiology. Such interactions can elicit  
61 both positive and negative responses. For example, while carbon nanotubes (CNT)  
62 promote differentiation of human embryonic stem cells into neurons (Chao et al.  
63 2009), they also induce oxidative stress, membrane damage and cell death in  
64 transformed murine macrophages RAW 264.7 (Shvedova et al., 2015). Both  
65 favorable and deleterious responses are not fully understood, but it has been  
66 shown that physicochemical properties of CNT affect such interactions (Jiang et al.  
67 2008; Nel et al. 2009, Wang et al. 2018). As the potential of nanomaterial and cell  
68 interactions is more extensively recognized, new materials are being designed with  
69 the specific purpose of interacting with cells. The wide variety and nature of such  
70 materials and the possible range of cell types and responses make it necessary to  
71 summarize the current knowledge of nanomaterial-cell interactions. An analysis of  
72 the state of the art is necessary for the rational design of novel, useful and safe  
73 nanomaterials with applications in medicine.

74

75 Gold nanoparticles (AuNP) are the most widely used nanomaterial for medical  
76 applications due to their chemical stability, easy modification of their surface  
77 chemistry and their tunable optical properties. AuNP have been exploited for  
78 nanobiotechnological applications for the last two decades, and they play essential  
79 roles in the fabrication of nanomedicine tools. In addition, AuNP are easily  
80 functionalized and can be used as drug carriers when functionalized with chemical  
81 groups that target specific cells. Due to the high electron density of Au, they have  
82 been extensively used for enhanced imaging diagnosis (Gao and Tao, 2017;  
83 Chugh et al. 2018; Kalimuthu et al. 2018). Because most of the available  
84 information in the literature is about gold NP, many of the papers discussed here  
85 refer to them. Nevertheless, nanoparticles of other materials are gaining increasing  
86 importance, and are also discussed when relevant.

87

88 In this review, we summarize the efforts, advances, and limitations of the current  
89 knowledge about cellular responses to nanomaterials. This work pretends to be  
90 useful to guide the design of nanodevices to influence cells by specific targeting,  
91 drug delivery, cell attachment promotion, differentiation, etc., while avoiding  
92 undesired side effects, such as oxidative stress, cell death, and unspecific  
93 interactions. Also, we simplified complex mathematical models to predict

94 nanoparticle (NP) uptake, a practical parameter in NP design that could be of  
95 interest of non-mathematical researchers.

96

## 97 **2. Size matters**

98 Nanostructured materials of various shapes and sizes interact with cells in different  
99 ways. Most studies regarding the effect of the size of nanomaterials have been  
100 performed with spherical NP, which are synthesized from the bottom-up, and are  
101 the main topic of discussion in this section. However, it should be considered that  
102 the size of one- or two-dimensional materials can also have critical cellular  
103 interactions. Nanomaterials with non-spherical shapes are discussed in section 3.

104

105 A particular challenge of determining the effect of NP size on the interactions with  
106 cells is that methods to measure size remain to be standardized. NP sizes  
107 measurements are reported by different techniques and each one has its intrinsic  
108 limitations. However, in any method chosen for NP size measurement, NP should  
109 be suspended and measured in the same medium/solvent that will be applied in  
110 the biological experiment. Solvents have different ionic strengths and pH, and  
111 influence NP surface charge, aggregation, stability, but especially the protein  
112 corona formed over the NP surface. Recently it was published that protein corona  
113 formed on NP at contact with serum significantly enlarge the NP hydrodynamic  
114 radius *in vivo* (Haixia et al. 2017; Garcia-Alvarez et al. 2018). Typically, incubation  
115 of nanomaterials with cells in a culture medium results in adsorption of serum  
116 proteins on their surface (Verma and Stellacci 2010) and it has been reported that  
117 protein corona modify NP aggregation and size. The most frequent proteins  
118 involved in protein corona formation are globular albumins, fibronectin,  
119 complement proteins, fibrinogen, immunoglobulins, and apolipoproteins (Cedervall  
120 et al. 2007; Lundqvist et al, 2008). Also, protein corona can provide undesired cell  
121 effects, because the NP surface properties can be masked for the protein corona  
122 and this undesired coating can complicate the relationship between NP chemical  
123 functionality and their biological effects. Recently it was demonstrated that  
124 targeting capacity of ligand-modified NP was lost after incubation with plasma *in*  
125 *vitro* (Zhang et al. 2018). This fact has been widely neglected in the literature and  
126 could hinder important remarks about how NP size influences cellular response or  
127 lead to imprecise conclusions. This should be considered while reading the effects  
128 detailed below.

129

130

### 131 **2.1 Size-dependent toxicity**

132 For a long time, AuNP have been considered as nontoxic, but recently AuNP size-  
133 dependent toxicity has been detected. It is worrisome that the safety of AuNP has  
134 been mostly taken for granted despite the poor understanding of their effect on  
135 cellular physiology. NP with diameters between 1 and 100 nm have been found to  
136 alter processes essential for basic cellular functions, including active and passive  
137 cell death (Jiang et al. 2008). The smallest nanoparticles, with diameters below 2  
138 nm, have been identified in most papers as toxic to cells. Pan et al. (2007)  
139 observed that gold NP of 1.4 nm caused the death of different cells types  
140 (connective tissue fibroblasts, epithelial cells, macrophages, and melanoma cells),

141 with IC50 values from 30 to 56  $\mu$ M. In contrast, in the same study, the authors  
142 observed that AuNP of 15 nm of diameter were nontoxic even at concentrations up  
143 to 100 fold higher (Pan et al. 2007). Similar results have been reported by Tsoli et  
144 al. (2005), who showed that Au55 clusters of 1.4 nm capped with  
145 triphenylphosphine monosulfonate (TPPMS) cause death of metastatic melanoma  
146 (MV3) and nonmalignant cell lines. Three mechanisms have been proposed to  
147 explain the toxicity of Au55 clusters: the first, their perfect fit in the major grooves of  
148 DNA, the second, increased ROS production and the third, blockage of membrane  
149 ion channels (Tsoli et al. 2005; Pan et al., 2009; Leifert et al. 2013).  
150 Sublethal effects upon exposure of nanomaterials are also related to size. Senut et  
151 al. (2016) studied the effect of AuNP of different core sizes (1.5 nm, 4 nm, and 14  
152 nm) on the viability, pluripotency, neuronal differentiation, and DNA methylation of  
153 human embryonic stem cells (hESC). The smallest AuNP were toxic to hESCs,  
154 probably due to their interference with membrane functions, as well as their larger  
155 surface area to volume ratio. Interestingly, AuNP of 4 nm caused a decrease of  
156 more of 20% of DNA methylation in hESC cells, while no toxicity was observed.  
157 Otherwise, AuNP (14 nm) and AuNP (4 nm) did not induce alterations in the  
158 differentiation potential of hESCs at doses of 10  $\mu$ g/mL, and a sublethal dose of 0.6  
159  $\mu$ g/mL for AuNP (1.5 nm), after two weeks of exposure. Also, AuNP of 4 nm or 14  
160 nm do not alter the neuronal differentiation capabilities of hESCs (Senut et al.  
161 2016). Size-dependent toxicity has been also reported for other NP. For example,  
162 the cytotoxic effects of silver nanoparticles (AgNP) of various sizes (10, 40 and 100  
163 nm) were tested on both reproductive and pulmonary cells (CHO-9, the Sertori cell  
164 line 15P-1 and RAW264.7 cells). All AgNP were toxic, but the most toxic were the  
165 smallest (10 nm) (Zápor 2016). These results agree with Kim et al. (2012) who  
166 observed that AgNP (10 nm) have a greater ability to induce apoptosis in  
167 osteoblast precursor cells MC3T3-E1 than larger AgNP (Kim et al. 2012).

168

169 To understand the NP size-dependent cytotoxicity, it is necessary to glance at NP  
170 uptake mechanisms to understand how NP are incorporated into cells. We will  
171 refer to this in the next section.

172

173

## 174 2.2 Size-dependent NP uptake

175

176 The "perfect" size for nanomaterials to be used for drug delivery or cancer therapy  
177 has been the subject of recent discussion. Available evidence shows that there is  
178 not a universal size for optimal NP internalization, as the optimal size is different for  
179 each cell type. Nevertheless, most of the literature has proposed 50 nm as an  
180 adequate size for the efficient internalization of NP, based on diverse experiments  
181 involving hydroxyapatite NP (HAPNs) (45 nm), other AuNP (50 nm) and  
182 polypyrrole nanoparticles (60 nm) (Yuan et al. 2010; Ma et al. 2011). An example  
183 of how this knowledge can be applied to a better design of therapeutic  
184 nanomaterials is the size-dependent anti-tumor activity of HAPNs in human  
185 hepatoma cells HepG2, which had an uptake dependent to size in the following  
186 order: 45 nm > 26 nm > 78 nm > 175 nm. HAPNs ranging from 20 nm to 80 nm  
187 effectively activated caspase-3 and caspase-9, decreased the Bcl-2 protein level,

188 and increased the levels of Bax, Bid and the release of cytochrome c from  
189 mitochondria, with 45 nm HAPNS as the most efficiently internalized.

190

191 Cellular plasma membranes are dynamic and selectively permeable fluids that not  
192 only delimit the cellular perimeter but also control trafficking into the cell. It has  
193 been widely demonstrated that there is a size-dependent interaction between the  
194 NP and the required cell signaling for its entrance into the cell. Mathematical  
195 modeling has demonstrated that there is an optimal NP size for the faster  
196 absorption and release from cells. This optimal size is a result of the competition  
197 between diffusion and thermodynamic driving force. NP with a small hydrodynamic  
198 radius have high diffusion constants but weaker interaction with cells. In contrast,  
199 larger NP have smaller diffusion constant but stronger interactions (Shi et al.  
200 2009). The model's prediction agrees with experimental data, including the uptake  
201 of AuNP (20, 30, 50 and 80 nm) coated with a layer-by-layer approach with nucleic  
202 acids and poly (ethyleneimine) by various mammalian cell lines (CHO, cervical  
203 carcinoma epithelial HeLa, and MCF-7). Reduced uptake was observed as NP size  
204 increased (Elbakry et al. 2012). Also, a size-dependent accumulation of AuNP was  
205 observed in an ex vivo tumor model. Smaller AuNP (2-6 nm) were able to  
206 penetrate deeply into tumor spheroids, even reaching the cell nucleus, whereas 15  
207 nm nanoparticles could not penetrate (Huang et al. 2012). Chithrani et al. (2006)  
208 studied the size-dependent AuNP intracellular kinetic and saturation  
209 concentrations. They exposed HeLa cells to AuNP of three sizes: 14 nm, 50 nm,  
210 and 74 nm. The authors found that AuNP of 50 nm had the highest cell uptake,  
211 followed by AuNP of 14 nm, and finally, AuNP of 74 nm. Three types of AuNP were  
212 internalized via the receptor-mediated endocytosis pathway (RME). Authors  
213 speculated that nonspecific adsorption of serum proteins mediates the NP uptake  
214 half-life, rate and amount of internalized AuNP (Chithrani et al. 2006). In a later  
215 work, they studied the uptake of AuNP of the same sizes by MCF-7 and HeLa cells  
216 in normoxic and hypoxic conditions. Interestingly, they found that AuNP absorption  
217 was higher in hypoxic conditions, similar to those present in a tumor. These results  
218 highlight the AuNP potential to be used as a cancer therapeutic agent (Neshatian  
219 et al. 2014).

220

221 In a systematic study, Shang et al. (2014) evaluated the cellular uptake of a wider  
222 size range of AuNP (3.3–100 nm) by confocal disk microscopy. They found that a  
223 minimal quantity of small NP on the plasma membrane is required to initiate  
224 cellular internalization. NP with diameters of 10 nm accumulated on the plasma  
225 membrane before being internalized by cells. Thus, an individual small NP is not  
226 capable of triggering endocytosis by itself. In contrast, larger AuNP ( $\approx$ 100 nm) are  
227 immediately endocytosed without prior accumulation at the plasma membrane,  
228 independently of their surface charge. Authors discussed that this size-dependent  
229 uptake requires a sufficiently strong local interaction of the NP with the endocytic  
230 machinery to trigger subsequent internalization (Shang et al. 2014). Interestingly,  
231 Cho et al. showed that NP accumulation in the cell membrane and their  
232 consequent uptake is influenced by NP sedimentation. In that work, authors  
233 measured the number of AuNP internalized by cells in upright and inverted  
234 configurations. In the upright configuration, human breast cancer cells SK-BR-3

235 were cultured in a coverslip and placed at the bottom of the well, as is usually  
236 performed. In the inverted configuration, the coverslip was suspended above cells,  
237 facing upside down. The surrounding medium contained the NP. They observed  
238 that in the upright configuration, where NP settled because of gravity, NP uptake  
239 by cells was higher, due to the increment of the concentration of NP near the cell  
240 surface. The opposite effect was observed in the inverted configuration. It is worth  
241 mentioning that these results were independent of NP size, shape, density and  
242 surface coating (Cho et al. 2011). In contrast, Toy et al. (2011) evaluated the effect  
243 of size (60-130 nm) and density (1-19 g/mL) of different types of NP (liposomes or  
244 metallic) in their margination on vessel walls in an *in vitro* model of microcirculation  
245 at a physiologically relevant flow rate. Interestingly, their results showed that NP  
246 density was more relevant than size (Toy et al. 2011). Taken together, these  
247 reports invite researchers to be careful with interpreting their results when studying  
248 the influence of NP physical properties and their impact on cell behavior and to  
249 take care when extrapolating *in vitro* results to *in vivo* models.

250  
251 Not only NP size matters, also cell size plays an important role. In another  
252 interesting work, the role of the mechanical cell state in AuNP uptake was  
253 investigated. The size of human mesenchymal stem cells (hMSCs) was controlled  
254 by culturing them on micropatterned surfaces with microdots of different diameters.  
255 Then cells were exposed to AuNP (50 nm) capped with poly(ethylene glycol)  
256 (PEG) to improve biocompatibility and to avoid protein adsorption. Experimental  
257 data showed that larger cells had a higher total AuNP uptake, but lower uptake per  
258 cellular unit area, than smaller cells. These observations can be explained by the  
259 presence of two opposite effects. First, large cell sizes favor uptake due to the  
260 larger contact area with AuNP. However, larger cell sizes also result in an  
261 increment of membrane tension, requiring a high wrapping energy for engulfing  
262 AuNP and reducing uptake (Wang et al. 2016). When a minimal quantity of NP  
263 accumulate in the cell periphery, NP-cell interactions modify the associated energy  
264 landscapes. For NP wrapping, it is necessary to curve the intrinsically curved cell  
265 membrane, which increases membrane tension. To overcome this tension, all the  
266 forces (electrostatic, van der Waals, hydrophobic interactions, ligand-receptor  
267 binding, etc.) have a role in endocytosis.

268  
269

### 270 2.3 Directed NP delivery: Effect of size

271  
272 NP-cell interaction can be directed to target cells by coating them with specific  
273 ligands. Experimental data have shown that NP size restricts the molecular  
274 dynamics of molecules attached to the NP surface, impacting ligand binding. This  
275 is particularly relevant for antibodies conjugated to NP. Jiang et al. (2008) coated  
276 AuNP and AgNP (2-100 nm) with a monoclonal antibody (Herceptin) and evaluated  
277 their interaction with SK-BR-3 breast cancer cells. Results showed a significant  
278 increase of the uptake of NP coated with the antibody, in comparison with NP.  
279 Also, authors found that NP with diameters between 40-50 nm were optimal for  
280 NP-antibody internalization, probably due to the balance between multivalent  
281 crosslinking of membrane receptors and the process of membrane wrapping

282 involved in RME. The antibody density and the number of available Herceptin  
283 binding sites on the NP depend on the surface area. Thus, the higher surface area  
284 of smaller NP restricts the relative orientation between ligands and receptors.  
285 Moreover, the authors observed that the dissociation constant increased as NP  
286 size decreased. These observations are very important because an early release  
287 of the NP-antibody complex can interfere with its therapeutic function. Therefore, a  
288 sufficiently big NP is needed to provide appropriate conformational freedom to the  
289 bound antibody, but not enough to cause early release (Jiang et al. 2008).

290

291 The effect of size on directed NP delivery can be summarized as follows:

292

293 1) *Internalization rate*: specific interactions (ligand-receptor mediated) introduce a  
294 delay, as wrapping requires that receptors diffuse to the binding sites. In contrast,  
295 in non-specific interactions binding spontaneously initiates the internalization,  
296 driving forces when NP are close to the cell membrane (Gao et al. 2005).

297

298 2) *Interferences with NP surface imperfections*: NP fractures or surface  
299 imperfections interfere with specific receptor recognition (Terdalkar et al. 2010).

300

301 3) *Translational entropy increment*: Receptor density on NP remains statistically  
302 uniform to maximize entropy, but receptors can cluster if free energy is reduced.  
303 Thus, a high concentration of receptors has an entropic penalty (Freund and Lin  
304 2004; Yuan and Zhan 2010). Related experimental data have demonstrated that  
305 smaller NP are wrapped faster, but require a higher ligand density to overcome a  
306 greater membrane bending energy (owing to the higher curvature of smaller  
307 particles) than larger NP (Lane et al. 2015).

308

309 How can we design a NP with the optimal size and number of ligands to obtain an  
310 efficient vehicle for cell targeting?

311

312 As a first approach to answer this question, we will consider the simplest case, a  
313 spherical NP with non-specific interactions with the cell membrane. In this case,  
314 the balance of adhesion energy and membrane deformation energy determines the  
315 lower NP radius ( $R_{min}$ ) that cannot be endocytosed (Eq. 1) (Lane et al. 2015).  
316 Mathematical procedures to obtain this and further equations can be consulted in  
317 the references.

318

319 
$$R_{min} = \sqrt{\frac{2B}{\alpha_{ns} - \sigma}} \quad (\text{Eq. 1})$$

320

321 In Eq. 1,  $B$  is the membrane bending stiffness,  $\alpha_{ns}$  is the adhesion strength and  $\sigma$   
322 is the membrane tension. Notice that NP smaller than  $R_{min}$  can still enter cells by  
323 other pathways, for example by simple diffusion.

324 Gao et al. (2005) proposed a mathematical model for NP receptor-mediated  
325 endocytosis. Their model considers that there is a threshold particle radius ( $R_{th}$ )  
326 for endocytosis to occur (15 nm and 30 nm for cylindrical and spherical NP,

327 respectively). It has been postulated that there is an optimal particle radius ( $R_{opt}$ ),  
 328 associated with the shortest wrapping time ( $\tau_w$ ), for NP endocytosis. However, this  
 329 work does not consider non-specific interactions arising from electrostatic and  
 330 osmotic (steric stabilization) forces, which play a fundamental role in cell adhesion  
 331 (Bell et al. 1984). In a further study, Decuzzi and Ferrari (2007) included both the  
 332 influence of specific and non-specific interactions in receptor-mediated endocytosis  
 333 of NP, obtaining two quantitative and more general expressions. The first one  
 334 relates the minimum density of receptor bound pairs for NP endocytosis and  $R_{th}$   
 335 (Eq. 2) (Decuzzi and Ferrari 2007). Both equations are very useful to guide in  
 336 designing NP with controlled endocytic performances.

337

$$338 \quad R_{th} = \sqrt{\frac{E}{2m_b C}} \quad \text{Eq. 2.}$$

339

340 Where E=bending energy factor = 20 (10-20); C=binding factor 15 (5-35). These  
 341 values are reference data of the cell-particle system used in their numerical  
 342 calculations.  $m_b = \frac{m_r^0}{\tilde{m}}$ , where  $m_r^0$  is the receptor density at time zero ( $10^2$   
 343 units/ $\mu\text{m}^2$ ) and  $\tilde{m}$  is the molecule density ratio ( $10^{-4}$ - $10^{-1}$ ). Physiological ranges of  
 344 variation for the dimensionless governing parameters were used in the numerical  
 345 calculations.

346

347 The next equations can be used to estimate the time required for the membrane  
 348 wrap around the NP (Eq. 3) (Decuzzi and Ferrari 2007).

349

$$350 \quad \tau_w = \frac{1}{M} \left( \frac{\pi R}{2\alpha} \right)^2 \quad \text{Eq. 3.}$$

351

352 Where  $\tau_w$  is the wrapping time defined as the time needed to wrap half of the  
 353 particle surface; R is the particle radius;  $\alpha$  is a velocity factor and M is a mobility  
 354 coefficient for cell receptors diffusing through the membrane (Decuzzi and Ferrari  
 355 2007). Similar equations have been obtained to estimate the optimal radius of both  
 356 viruses and NP to be uptaken via clathrin-mediated endocytosis, which result in a  
 357 value close to 60 nm (Banerjee et al. 2016).

358 Mathematical models are of special clinical significance because they provide  
 359 information that can contribute to the rational design of more effective targeted  
 360 therapeutic and diagnostic systems. However, the comparison of theoretical  
 361 optimal size (and other NP sizes reported in the literature) for cellular uptake with  
 362 experimental data should be performed carefully, because of the recent data that  
 363 show that there are other parameters which influence NP size. One of them is the  
 364 protein corona formed over NP at contact with serum, which significantly enlarges  
 365 NP size (Garcia-Alvarez et al. 2018). This fact has been ignored in the most of  
 366 literature.

367

368

369 2.4 Size-dependent NP endocytosis pathways

370

371 Elucidation of the endocytic pathway involved in NP uptake is of crucial relevance  
 372 for enhancing total NP uptake by cells, manipulating their intracellular trafficking  
 373 and minimizing possible toxic effects (Huang et al. 2002). Cells internalize  
 374 molecules through various endocytic pathways. These pathways can be classified  
 375 as specific and non-specific. Specific pathways include a) Endocytosis clathrin-  
 376 and caveolin-mediated: an energy-dependent process by which cells internalize  
 377 molecules. b) Phagocytosis (mannose receptor-, complement receptor-, FcY  
 378 receptor-, and scavenger receptor-mediated). Phagocytosis is an actin-dependent  
 379 endocytic process by which phagocytes engulf particles with sizes larger than 0.5  
 380  $\mu\text{m}$ . Moreover, non-specific endocytosis pathways include a) Macropinocytosis, a  
 381 process by which cells internalize fluids and particles together, and large vesicles  
 382 (0.2-5  $\mu\text{m}$ ) are formed. b) Pinocytosis, a process by which cells absorb  
 383 extracellular fluids, small molecules and small vesicles ( $\approx 100\text{ nm}$ ) are formed (Kou  
 384 et al. 2013).

385 Each of these mechanisms depends on the cell type and differentiation state but it  
 386 has been recently demonstrated by systematic addition of biochemical inhibitors  
 387 that different pathways are also activated depending on NP size with which cells  
 388 interact. Some of the most relevant works are summarized in table 1 and Fig. 2.

389  
 390

**Table 1.** Relevant studies related to size-dependent NP endocytosis.

NP	Cell line	Endocytosis pathway	Additional observations	Reference
Au (13 and 45 nm)	Human dermal fibroblasts CF-31	45 nm: clathrin-mediated endocytosis. 13 nm: mostly phagocytosis.	AuNP cause reversible cytoskeleton filament disruption. Toxicity of different sized AuNP does not depend on total Au intracellular concentration.	(Mironava et al. 2010)



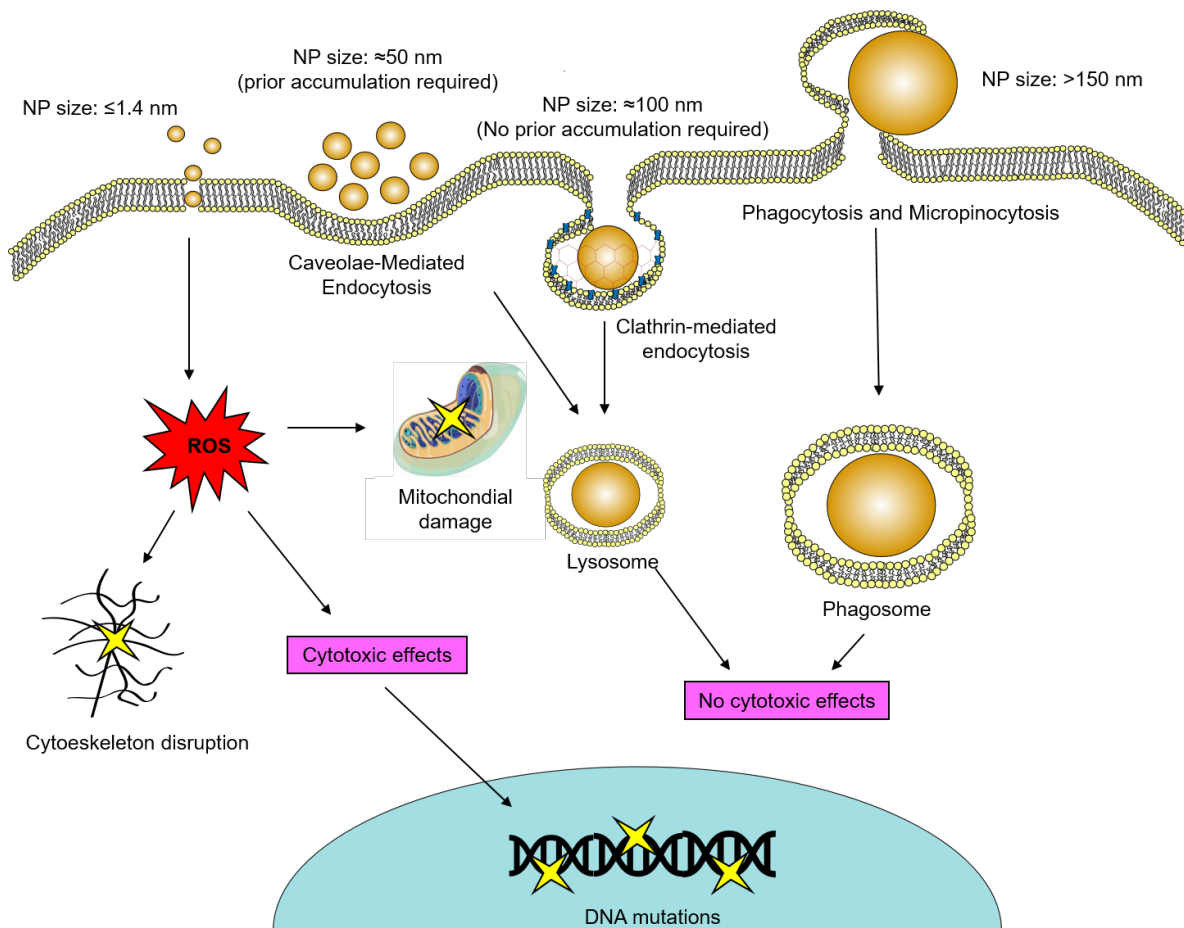
Au–cysteine conjugates labeled with amine-reactive Cy5 dye.	HeLa	4.5 nm: caveolae-mediated endocytosis.	Most NP were localized in intracellular endocytic vesicles in the perinuclear region.	(Hao et al. 2012)
Calcein-loaded [Zr <sub>6</sub> O <sub>4</sub> (OH) <sub>4</sub> ] (UiO-66) with 1,4-benzenedicarboxylate (BDC) ligands (150 and 260 nm).	HeLa	150 nm: clathrin-mediated endocytosis. 260 nm: a combination of clathrin- and caveolae mediated endocytosis pathway.	Uptake mechanism of NP should be considered for the design of efficient drug delivery systems.	(Orellana-Tavra et al. 2016)
Carboxylated polystyrene (40 and 150 nm).	HeLa and MCF-7	40 nm: clathrin-mediated endocytosis pathway. 150 nm: caveolae-mediated endocytosis.	NP of 150 nm were preferentially in exosomes in comparison with NP of 40 nm, indicating that they were exocytosed.	(Wang et al. 2017)
Fluorescent latex (500-1000 nm).	Non-phagocytic B16 cells (melanoma).	<200 nm: Internalization of microspheres involved clathrin-coated pits. 500 nm: caveolae-mediated endocytosis.	Rate of internalization of smaller NP was higher than that of larger NP.	(Rejman et al. 2004)

Green fluorescent non-functionalized polystyrene particles with diameters of 0.9, 1.9, 2.3, 3.0, 4.3, 5.7 and 9.0 $\mu\text{m}$ .	Continuous alveolar rat macrophage cells NR8383, murine peritoneal macrophages J774 and human spleen macrophages.	Particles of 2-3 $\mu\text{m}$ exhibited maximal phagocytosis and attachment.	Internalization rate not affected by particle size, but the internalization pathway was affected. Relevant for selecting the appropriate size for phagocytosis.	(Champion et al. 2008)
Poly-lactide-co-polyethylene glycol (100 nm).	HeLa	100 nm: Clathrin-mediated endocytosis pathway.	Negatively charged NP entered the cells through a pathway different to endocytosis.	(Harush-Frenkel et al. 2007)
Cationic cross-linked poly(ethylene glycol) hydrogel. Cubic-shaped particles (cubic side length 2 $\mu\text{m}$ , 3 $\mu\text{m}$ and 5 $\mu\text{m}$ ). Cylindrical-shaped particles with identical length and diameters of 0.5 $\mu\text{m}$ or 1 $\mu\text{m}$ . Cylindrical-shaped NP (diameters 200 nm, 100 nm, 150 nm).	HeLa	Clathrin-mediated and caveolae-mediated endocytosis and, to a lesser extent, macropinocytosis are involved with nano- and micro-particle internalization, but these mechanisms play a larger role in the internalization of smaller NP (150-nm and 200-nm).	NP charge relevant for cellular internalization. Positively charged NP were internalized in 84% of cells after 1 h, while the identical negatively charged particles were not significantly internalized.	(Gratton et al. 2008)
Mesoporous silica NP conjugated with fluorescein isothiocyanate (100 nm).	Human mesenchymal stem cells (hMSCs) and adipocytes (3T3-L1).	Clathrin-mediated endocytosis.	Inhibition of caveola-coated pit endocytosis by filipin did not affect NP uptake	(Huang et al. 2005)

Hydroxyapatite (20 nm, 80 nm and 12 $\mu$ m).	Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).	20 and 80 nm: clathrin- and caveolin-mediated endocytosis.  12 $\mu$ m: macropinocytosis.	Exposure to NP suppressed the angiogenic ability of HUVECs.	(Shi et al. 2017)
Oleoyl alginate ester.	Heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2)	50-120 nm: clathrin-mediated endocytosis. 420 nm: caveolae-mediated endocytosis. 730 nm: macropinocytosis.	Smaller NP showed the highest the cellular uptake and permeability.	(Q. Li et al. 2015)

391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404

Taken together, results in table 1 highlight that the underlying mechanisms that mediate internalization of non-targeted NP are not fully understood. In most of the cases, experimental data show that  $\approx$ 100 nm-sized NP are preferably internalized via clathrin-mediated endocytosis. The other endocytosis pathways used were highly dependent on the cell and material types, but it is possible to distinguish common NP uptake mechanisms, which are schematized in Fig. 1 It is worth highlighting that current knowledge suggests that NP size is not the only factor that determines NP uptake mechanism, and that several endocytic pathways have a synergistic role in NP internalization. To understand how one endocytic pathway is preferred over another, it is crucial to design efficient medical nanodevices to enhance the efficiency of internalization, accurate targeting, etc. and ultimately to avoid undesirable side effects.



405  
 406 Fig. 1. Size-dependent NP uptake mechanisms and cytotoxicity. Figure  
 407 summarizes observations regarding the role of NP size on cellular internalization  
 408 mechanism. Small NP ( $\leq 1.4$  nm) have been typically reported as cytotoxic due to  
 409 oxidative stress induction (ROS) that impacts on cytoskeleton disruption and  
 410 mitochondrial and DNA damage. Intermediate NP-sized ( $\approx 50$ - $100$  nm) can be  
 411 internalized by Caveolae-Mediated or Clathrin-mediated endocytosis depending on  
 412 the cell line and NP material, and finally bigger NP ( $150$ - $500$  nm) can be  
 413 internalized by macropinocytosis. In the case of intermediate- and big-sized Au  
 414 nanospheres, no cytotoxic effects have been observed. It should be considered  
 415 that both NP material and the cell line influence internalization.

416  
 417

### 3. NP surface

418  
 419

420 NP surface is the first part with which cells interact. Interactions cause intentional  
 421 or unintentional biological effects due to NP charge, dipole-dipole interactions, van  
 422 der Waals forces, solvation, electrostatic forces, solvophobic effects, and depletion  
 423 forces, etc. (Nel et al. 2009). An excellent review was published by Makarucha et  
 424 al. about the use of computational techniques to study theoretical interactions  
 425 between nanomaterials and biological systems (Makarucha et al. 2011).

426

### 427 3.1. Electric charge

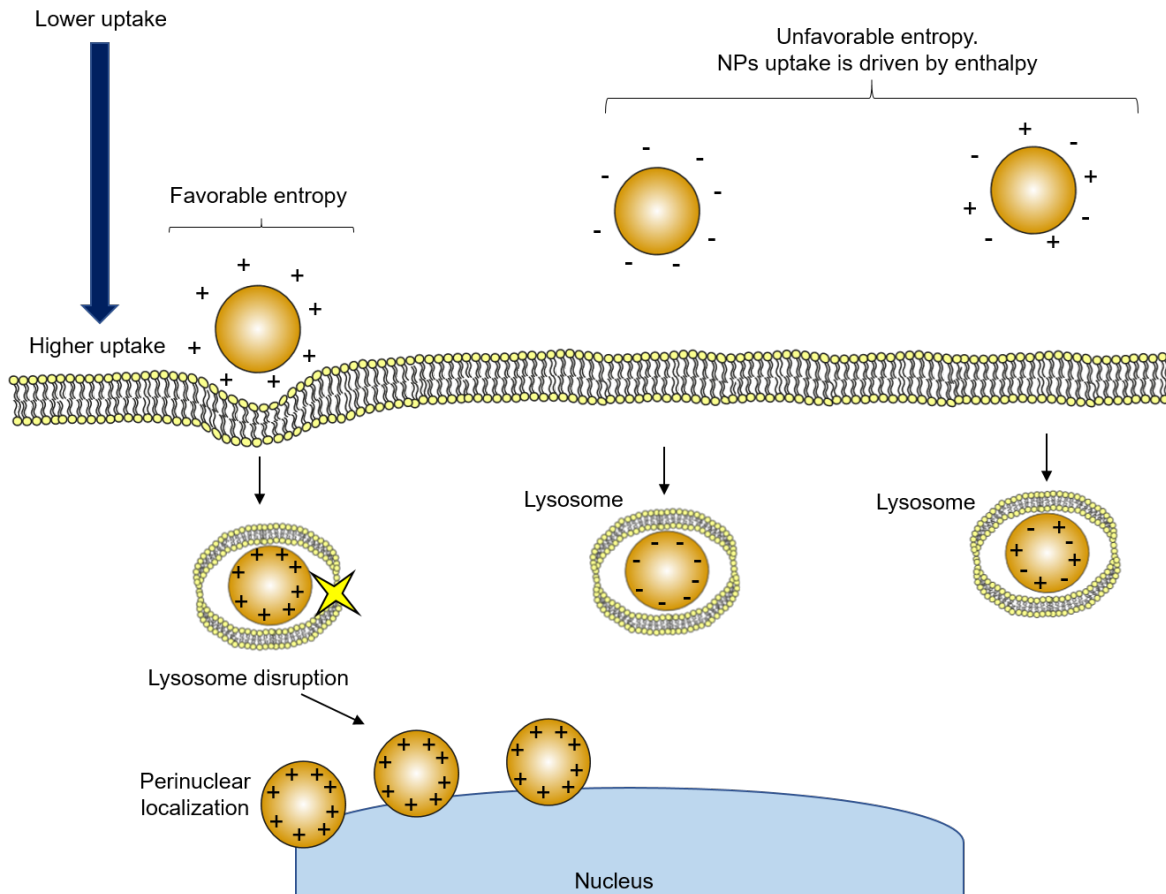
428

429 Electric charge plays an important role in the NP adsorption and translocation  
430 across the cell membrane. *In silico* studies with positive- and negative- charged  
431 and uncharged NP interacting with an uncharged phospholipid bilayer have been  
432 performed by coarse-grained molecular dynamics. This data showed that  
433 electrostatic attraction improves the adhesion of charged NP to the membrane.  
434 An increasing electrostatic energy results in an almost full wrapping of the  
435 charged NP. Adsorption of cationic NP induces local disordered transitions in the  
436 membrane favoring an entropy increment. Otherwise, negative-charged NP  
437 induced the formation of the highly ordered regions in fluid bilayers which is  
438 entropically unfavorable, thus NP internalization is driven by enthalpy (Fig. 3) (Li  
439 and Gu, 2010). This data agrees with experimental observations in red blood  
440 cells. Red blood cells do not have any phagocytic receptors on their membrane  
441 surface, and no actinmyosin system being incapable of endocytosis. For this  
442 reason, it is a popular model to study uptake of passive particles uptake across  
443 cell membranes. Using fluorescence microscopy, it has been observed that  
444 zwitterionic quantum dots penetrate through the membrane of red blood cells  
445 membranes. Also, by infrared spectra analysis, an enhanced lipid bilayer flexibility  
446 has been observed whereas membrane structure remained intact (Wang et al.  
447 2012). This strategy can be applied for designing medical nanodevices for direct  
448 drug delivery into the cytosol by passive NP uptake.

449

450 Moreover, it has been found that positively charged AuNP attached to a negatively  
451 charged cell surface induce an increment of the fluidity of the cell membrane,  
452 increasing the cellular uptake rate. In this case, positively charged hydrogel NP  
453 were internalized in 84% of cells after 1 h of incubation in HeLa cells, while  
454 identically shaped and negatively charged AuNP were not significantly internalized  
455 (Gratton et al. 2008). This can be explained by the mechanisms that the cell has to  
456 maintain the charge of the membrane, including the removal of attached AuNP  
457 through endocytosis or other pathways. During this process, the cell membrane  
458 would probably lose its rigidity, and its morphology would change, increasing  
459 membrane permeability (Cho et al. 2009). This could explain why the cellular  
460 uptake of various types of positively charged nanomaterials has resulted in higher  
461 uptake rates and efficiency in diverse cell types (Wilhelm et al. 2003; Yue et al.  
462 2011; Fröhlich, 2012; Salatin et al. 2015). However, coating NP with cationic  
463 ligands might not be a viable strategy to improve cellular uptake. There is  
464 experimental data that shows that cationic NP can disrupt the cellular membrane,  
465 resulting in a cytotoxic effect by changing the cell membrane potential and  
466 intracellular concentration of calcium ions (Nel et al. 2009). In addition, Yue et al.  
467 synthesized chitosan-based NP with different surface charge but keeping other  
468 characteristics identical, such as size, shape, matrix, and mechanical properties to  
469 minimize the influence of other factors. They tested the effects of NP surface  
470 charge on cellular uptake and intracellular trafficking of those NP on eight different  
471 cell lines. Intracellular trafficking indicates that some of the positively charged NP  
472 could escape from lysosomes after being internalized and exhibited perinuclear  
473 localization, whereas the negatively and neutrally charged NP preferred to

474 colocalize in lysosomes (Yue et al. 2011). These results demonstrate that NP  
 475 surface charge also influences its fate inside cells (Fig. 2).  
 476



477  
 478 Figure 2. Surface charge-dependent NP uptake and cellular trafficking. Positively  
 479 charged NP exhibited higher cell uptake. Adsorption of cationic NP induces local  
 480 disordered transitions in the adhering region of the membrane, which increases  
 481 entropy. Negatively and neutral-charged NP are poorly internalized. Negative-  
 482 charged NP induced the formation of highly ordered membrane regions that are  
 483 entropically unfavorable, but their entrance is driven by enthalpy.  
 484

485 NP surface charge does not only influence cell uptake and intracellular trafficking, it  
 486 has also been demonstrated that it can influence the cellular phenotype of  
 487 differentiated cells. A very interesting example was using chemically modified  
 488 carbon nanotubes (CNT) as a substrate for cultured neurons. It has been shown in  
 489 neuronal cultures that longer neurites and more elaborate branching were  
 490 observed on positively charged carbon nanotubes substrates. Authors highlight  
 491 that by manipulating the charge carried by functionalized carbon nanotubes it is  
 492 possible to control the outgrowth and branching pattern of neuronal processes (Hu  
 493 et al. 2004). In the case of undifferentiated cells, first attempts to control  
 494 differentiation through NP addition have been carried out. AuNP functionalized with  
 495 an amine (-NH<sub>2</sub>) and carboxylic acid (-COOH) moieties exposed to human bone  
 496 marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). Pristine unfunctionalized AuNP

497 do not inhibit osteogenesis. Moreover, AuNP-COOH reduced alkaline phosphatase  
498 (ALP) activity and calcium deposition but upregulated expression of TGF- $\beta$  and  
499 FGF-2, promoting cell proliferation over osteogenic differentiation in hMSCs. These  
500 findings suggest that by understanding in a better way the underlying mechanisms  
501 in the nano-bio interface it is possible to control cell behavior by just modulating NP  
502 physical properties, which has a tremendous technological and biomedical  
503 potential (J.J. Li et al. 2015).

504

### 505 3.2. Hydrophobicity

506

507 Another parameter to consider is NP hydrophobicity because it is closely related to  
508 cell membrane properties. Coarse-grained molecular dynamics simulations have  
509 shown that hydrophobicity enhances the penetration ability of NP into cell  
510 membranes and nuclear pores through hydrophobic interaction, whereas a semi-  
511 hydrophilic nanoparticles are only found adsorbed on the membrane (Li et al.  
512 2008). NP hydrophobicity is a property that has been explored to improve current  
513 gene therapies. Niikura et al. (2014) synthesized a bifurcated ligand possessing  
514 hydrophobic and hydrophilic arms as a surface ligand for AuNP to allow small  
515 interfering RNA (siRNA) delivered into HeLa cells. Their results showed that the  
516 bifurcated ligand is not only related to the promotion of cellular uptake but also  
517 involves the enhancement of AuNP permeation into the cytosol from the  
518 endosomes, leading to effective gene silencing. This work highlights how changing  
519 hydrophobic/hydrophilic forces make it possible to control NP cell internalization to  
520 manipulate cell metabolism (Niikura et al. 2014). Similar hydrophobic effects were  
521 observed for poly(L-lactide) functionalized NP in HeLa cells, which suggest the  
522 great potential to develop new cancer therapies in the future (Samadi Moghaddam  
523 et al. 2015). In addition, the hydrophobicity of NP surface can be affected  
524 unintentionally by non-specific interactions with the NP surface, like protein corona.  
525 This is important because it has been observed that charged and/or hydrophobic  
526 NP have fewer cellular interactions once they are fouled with unspecific proteins.  
527 Once fouled, NP may associate with cells through unpredicted interactions. Y? cuál  
528 es la conclusion?

529

### 530 3.3 Protein corona

531

532 Protein corona is a very important and vast issue that has gained interest in recent  
533 research. Many and very good reviews about it have been recently published  
534 (Capjak et al. 2017; Jain et al. 2017; Charbgoon et al. 2018). Because of that, in this  
535 review we will only mention a couple of examples to explain the relevance of the  
536 protein corona effect for designing nanomedical devices. Protein corona is a layer  
537 formed on the NP surface upon exposure to high protein concentrations, as in  
538 biological fluids. Walkey et al. (2014) have identified protein corona fingerprints  
539 formed around a library of 105 surface-modified AuNP. Their results suggest that  
540 hyaluronan receptors are the major mediators of nanoparticle-cell interactions. An  
541 example of the impact of this is the development of novel medical nanodevices that  
542 act like nanocarriers for subcellular- and organelle- level targeting, which are  
543 referred as the third generation of nanomedicines (Yameen et al. 2014). Kou et al.

544 (2013) have reviewed some strategies based on nanotechnology for specific  
545 organelle targeting. In that work, authors remarked that the main strategy for NP  
546 cell targeting remains to be biochemical ligand-coating (Kou et al. 2013). However,  
547 there is evidence that shows that unpredicted NP-protein corona interactions can  
548 induce conformational changes on the coated ligands on the NP surface, leading to  
549 the exposure of new unexpected epitopes. This interaction affects NP properties,  
550 including cell targeting (Nguyen and Lee, 2017). Otherwise, as we previously  
551 mentioned, protein corona influences NP size and shape, but it has also been  
552 recently demonstrated that size per sé influences the NP protein corona due to  
553 curvature effects (Lundqvist et al. 2017). This finding emphasizes the interaction  
554 between NP size and the protein corona. The interaction between NP size and the  
555 protein corona is poorly understood, even when it has a great impact on the  
556 performance of nanodevices and the consequent cellular response.

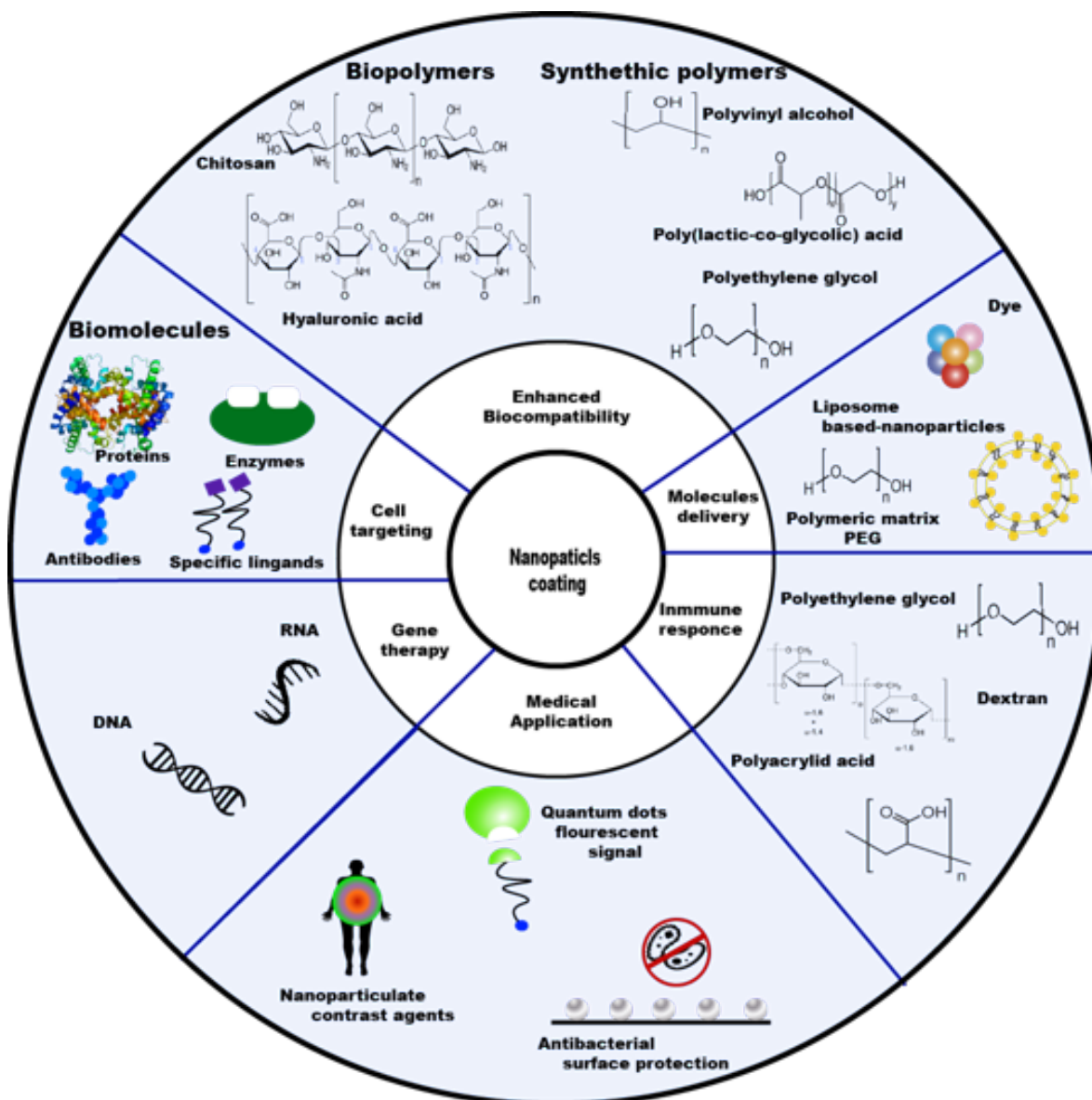
557

### 558 3.4 NP coating

559

560 NP have been widely coated with different molecules depending on the purpose for  
561 which they were designed. For example, to enhance their biocompatibility, NP  
562 have been coated with biopolymers such as chitosan, and hyaluronic acid; or  
563 synthetic polymers such as poly(vinyl alcohol), poly(lactic-co-glycolic) acid, PEG,  
564 among others. Regarding molecules delivery, NP have been coated with dyes,  
565 liposome based-nanoparticles, or PEG which facilitates the entrance to cell. To  
566 avoid immune response, NP have been coated with PEG or polyacrylic acid. For  
567 diverse medical applications, NP have also been coated with quantum dots due to  
568 their fluorescence properties, contrasting agents, and antibacterial compounds.  
569 Moreover, for gene therapy NP have been coated both with DNA and RNA. For cell  
570 targeting, NP have been coated with a wide variety of biomolecules such as  
571 specific ligands, and proteins, including antibodies and enzymes. Recently  
572 Scaffaro et al. (2018) published an excellent review about this topic (Scaffaro et al.  
573 2018). A summary of NP coating strategies is presented in Figure 3.





574  
575 Figure 3. Common NP coating strategies for specific medical purposes.  
576

577 The most common strategy for cell targeting is to attach ligands to the NP surface,  
578 such as monoclonal antibodies or peptides. This strategy has been proposed for  
579 cancer nanotherapies (Leila et al. 2004; Peiris et al. 2018). The main parameter to  
580 consider in the early NP coating design is, of course, the use of the appropriate  
581 ligand for a specific receptor. But also, it is important to consider ligand number,  
582 density, and length. There are many efforts in the literature to design NP with the  
583 optimal number and length of ligand coating, as we discussed previously based on  
584 the work of (Decuzzi and Ferrari, 2007).

585 In this context, according to (Yuan and Zhang 2010), there exists an optimal  
586 combination of size and ligand density at which the endocytic times are minimized  
587 and some mathematical models have been proposed to estimate the optimal  
588 number of ligands to be attached to a NP (Zhan et al. 2015). A recent study of  
589 statistical dynamics showed that cellular internalization of NP strongly depends on

590 ligand distribution and the cellular uptake efficiency of NP was higher when ligand  
591 distribution was uniform. These results also indicate that the optimal ligand  
592 distribution associated with highest cellular uptake efficiency depends slightly on  
593 the distribution pattern of ligands and density of receptors, and the optimal  
594 distribution becomes uniform when receptor density is sufficiently large. Although  
595 this study is restricted because the cylindrical shape of the NP and membrane  
596 surface tension were not considered, interestingly this work proposes that an  
597 efficient NP coating strategy can be inspired in the homogeneous ligand  
598 distribution of enveloped viruses to achieve infection (Li et al. 2017). It is worth  
599 highlighting that none of the current mathematical models considers  
600 simultaneously NP size, shape (anisotropy), NP dynamics, and ligand distribution  
601 to provide a guide for NP ligand-coating to achieve a more efficient cell targeting.  
602 This lack of knowledge has encouraged many groups to work on it currently.

603

#### 604 **4. Shape**

605

606 Shape is another important factor that determines the structural, physical, and  
607 chemical properties of NP. Different NP shapes affect the electronic, optical, and  
608 magnetic properties. Recently, nanotechnology has skyrocketed developing  
609 innovative methodologies to produce a wide catalog of different NP shapes (P.  
610 Zhang et al. 2018), such as a lotus leaf-like structure (Hao et al. 2017), a flower-  
611 like structure with wrinkled edges (Kang et al. 2016), scroll-like cylindrical NP (Avivi  
612 et al. 199), ellipsoids (Ulrich et al. 2016), rod-shaped (Ng et al. 2012), octahedra,  
613 2D-triangles, dumbbells, belts, hexagons (Zhang et al. 2007), etc. Simple tuning of  
614 solvent composition or synthesis conditions can result in alterations of NP shape,  
615 offering possibilities of designing a wide variety of NP shapes for diverse  
616 applications. These technological advances on NP synthesis could undoubtedly  
617 enlarge the spectrum of solutions to improve the function and targeting of  
618 nanodevices, but also to add extra degrees of freedom to the problem of  
619 understanding NP-cell interactions and moreover, to elicit the desired cellular  
620 responses by manipulating NP physical properties. Decuzzi et al. (2008) raised the  
621 question if NP geometry really matters in systemic drug delivery. If so, is geometry  
622 equally relevant at different length scales (vascular, cellular and subcellular levels).  
623 Nowadays there is a lot of theoretical and experimental evidence that shows that  
624 the shape of NP can potentially be manipulated for specific nanomedical devices,  
625 affecting particle margination and interaction with various cells types (Jurney et al.  
626 2017). For example, a recent and interesting study showed that gold nanoflowers  
627 possess the most promising non-cytotoxic mammalian cell behavior with the  
628 greatest shape-dependent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, in  
629 contrast with their spherical counterpart (Fig. 5) (Penders et al. 2017). Another  
630 study showed that cytotoxicity of AuNP is also shape-dependent. Au nanospheres  
631 and nanorods proved to be more toxic than Au nano-star, flower and prism gold  
632 nanostructures in human embryonic kidney cells HEK293T and HeLa cells  
633 exposed to concentrations of NP of 32, 100 and 300  $\mu\text{M}$  for 72 h (Woźniak et al.  
634 2017).

635 To take advantage of this knowledge for better medical nanodevices, it is crucial to  
636 understand how NP geometry impacts cellular internalization, intracellular  
637 trafficking, and cell cytotoxicity, etc.

638

#### 639 4.1 Cytotoxicity NP shape-dependent

640

641 Recently, experimental evidence has shown that NP shape also influences their  
642 toxicity. Oh et al. exposed human lung fibroblast (IMR90) and mouse alveolar  
643 macrophage (J774A.1) to NP made of the conductive polymer poly (3,4-ethylene  
644 dioxythiophene) (PEDOT) of different shapes. Authors found that cellular oxidative  
645 stress is dependent on the shape and concentration of the PEDOT NP. And  
646 moreover, proinflammatory cytokines (interleukin-1 and interleukin-6) and tumor  
647 necrosis factor  $\alpha$  from macrophages, are induced by PEDOT NP-treated cells (Oh  
648 et al., 2010). These findings were recently supported by B. Zhang et al. (2017)  
649 using poly (lactic-co-glycolic acid)-PEG NP (PLGA-PEG NP) which is an FDA  
650 approved material for biomedical applications. They exposed the human liver  
651 cancer cell line HepG2, to spherical and needle-shaped PLGA-PAG NP. Needle-  
652 shaped induced significant cytotoxicity measured by MTT assay, LDH release and  
653 caspase 3 activity as an apoptotic marker. Their study evidenced that the  
654 cytotoxicity of needle-shaped NP was induced through the lysosome enlargement.  
655 Lysosome disruption activated the signaling pathways of caspase 3 for cell  
656 apoptosis and eventually caused DNA fragmentation and apoptotic cell death.  
657 Interestingly, in contrast to spherical-shaped PLGA-PEG NP no cytotoxicity was  
658 detected (B. Zhang et al. 2017). Taken together these findings suggest that  
659 cytotoxicity and apoptosis increase with the decreasing NP aspect ratio. However,  
660 it should be considered that sharp edges of anisotropic structures can be  
661 responsible for the injury of blood vessels (Vácha et al. 2011). Further research is  
662 needed to elucidate the biophysical mechanism by which NP shape influences cell  
663 metabolism. These findings emphasize that shape is an important parameter to  
664 consider for efficient and safe medical nanodevices. Depending on the NP  
665 application desired we can choose a specific NP shape. For example, spheric-,  
666 star- and flower-shaped AuNP are highly efficient in internalization experiments  
667 and could be applied for designing delivery nanosystems. Otherwise larger AuNP  
668 with a high superficial area and strong absorption in the visible and near-infrared  
669 regions of the electromagnetic spectra, make anisotropic AuNP an excellent tool in  
670 hyperthermia and laser for cancer therapy (Jindal, 2017).

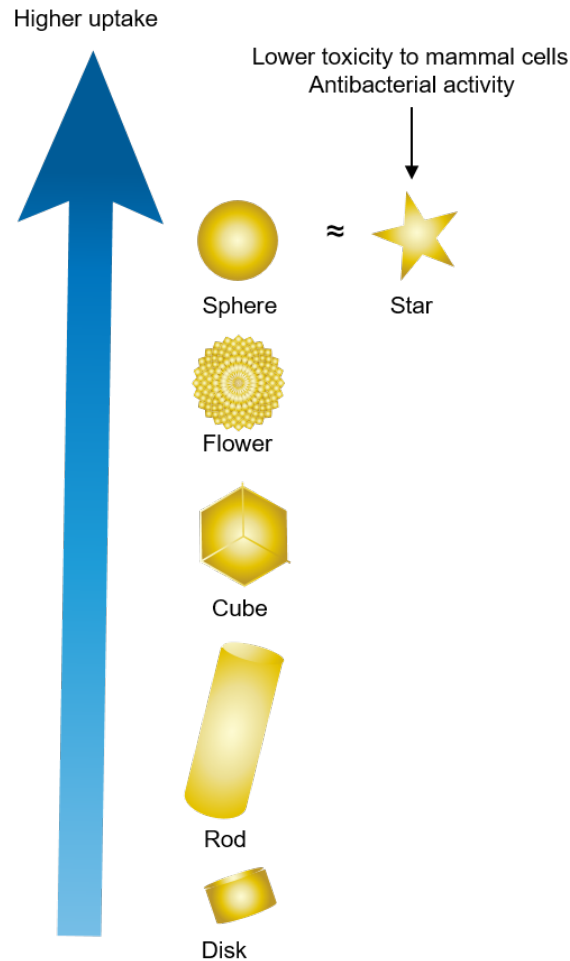
671

#### 672 4.2 Internalization NP shape-dependent

673

674 It is not trivial to relate a NP shape to a specific cell internalization mechanism. It  
675 has been proposed that NP internalization is a complex manifestation of three  
676 shape- and size-dependent parameters: a) particle surface-to-cell membrane  
677 contact area, i.e., particle-cell adhesion, b) strain energy for membrane  
678 deformation, and c) sedimentation or local particle concentration at the cell  
679 membrane particle-cell adhesion (Agarwal et al. 2013). These parameters  
680 influence the probability (limited for the shear stress and the optimal NP size) of the  
681 NP to be internalized. Deccuzi et al. (2008) showed that NP with extremely low or

682 high aspect ratio could not be endocytosed and as the aspect ratio should be  
683 within the range suitable for complete wrapping of particles by the cell membrane  
684 (Decuzzi et al. 2008). In this context, it has been demonstrated that oblated shapes  
685 adhere more effectively to the biological substrate than classical spherical particles  
686 of the same volume, which can improve the therapeutic efficacy (Decuzzi and  
687 Ferrari, 2006). In another study, it was shown by molecular dynamic analysis that  
688 spherocylindrical NP are more efficiently endocytosed than spherical-shaped NP.  
689 Cells were unable to uptake cylindrical particles due to their sharp ends. It was  
690 suggested that NP shape-dependent endocytosis depends on the different surface  
691 adhesion energy of each shape (Vácha et al. 2011). These results are supported  
692 by the observations of Agarwal et al. (2013) that showed that disk-like negatively  
693 charged NP of high aspect ratios have higher cell uptake than nanorods and lower  
694 aspect-ratio nanodisks in mammalian epithelial and immune cells (Agarwal et al.  
695 2013). It was attributed that nanodisks needed less strain energy for bending of  
696 cells around the particles as compared to nanorods, therefore exhibiting higher  
697 cellular uptake. In a later work, Li et al. (2015) observed that cellular uptake of  
698 nanoparticles was found to be in the order of sphere > cube > rod > disk, probably  
699 due to the ease of bending of the cell membrane around the particles. Authors also  
700 find that star-shaped NP can be quickly wrapped by the cell membrane, similar to  
701 their spherical counterparts (Fig. 4) (Li et al. 2015).  
702



703  
 704 Figure 4. Shape-dependent NP uptake. NP with diverse shapes exhibit different  
 705 uptake rates, probably due to ease of bending of cell membrane around the  
 706 particles. Gold nanostars emerge as an interesting NP shape for novel medical  
 707 nanodevices due to their higher uptake rate, lower cytotoxicity, and antibacterial  
 708 activity.

709  
 710 Dasgupta et al. investigated the role of nanoparticle shape and size, as well as  
 711 membrane bending rigidity and tension on membrane wrapping and cellular  
 712 uptake. According to their results, rod-like NP were observed in stable endocytic  
 713 states with small and high wrapping fraction. Interestingly, for high aspect ratios  
 714 and round tips, the particles enter side-first with their long edge parallel to the  
 715 membrane. In contrast, for small aspect ratios and flat tips, NP enter tip-first. This  
 716 work highlights the relevance of NP orientation for interacting with cells (Dasgupta  
 717 et al. 2014). In this context, it has been demonstrated that the shape-dependent  
 718 NP uptake differs from dynamic uptake experiments. Journey et al. (2017) exposed  
 719 endothelial cells to negatively charged, non-spherical PEG hydrogel particles. Cells  
 720 were cultured in a microchannel system with physiologically relevant shearing flow  
 721 rate and were compared with a static culture. Their results show that larger rod-  
 722 and disk-shaped NP had a higher uptake compared with the smaller ones, in

723 contrast with the size effect observed for spherical NP in a flow. Moreover, authors  
724 showed that the NP uptake varies on the dynamic and the static culture system  
725 (Jurney et al. 2017). Microfluidic simulations have shown that non-spherical NP  
726 have more complex motions, with tumbling and rolling even in typical capillary  
727 hydrodynamic conditions. For non-spherical NP in the absence of gravity, a  
728 combined effect of three factors has been observed: particle non-spherical shape,  
729 its inertia, and particle-wall hydrodynamic interactions. In these conditions, lateral  
730 drifting velocity is directly related to the aspect ratio, with a maximum between the  
731 two extremes: sphere and disk with aspect ratios of 1 and infinity, respectively  
732 (Gavze, 1998). This means that increasing rotational and tumbling motions of  
733 larger-size non-spherical NP in the flow, play a dominant role in NP margination  
734 and cell interaction, compared to Brownian motion, gravity, and cell membrane  
735 deformation energy. Moreover, according with computational simulations of Li et  
736 al., NP rotation is one of the most important mechanisms that regulate the  
737 competition between ligand-receptor binding and membrane deformation. Due to  
738 the strong ligand-receptor binding energy, the NP membrane invagination is  
739 featured by the rotation of NP to maximize their contact area with the cell  
740 membrane. Thus, rotation of is one of the most important mechanisms for the  
741 endocytosis of NP having shape anisotropy. The kinetics of wrapping are mainly  
742 dominated by the orientation of NP that interacts with the membrane, i.e., the part  
743 of the NP with the largest local mean curvature at which the membrane is most  
744 strongly bent. This study also demonstrated that the shape anisotropy of NP  
745 generates a heterogeneous membrane curvature distribution that induces an  
746 asymmetric endocytosis (Li et al. 2012). In phagocytosis NP orientation is also  
747 pretty important according with Champion and Mitragotri. Local particle shape,  
748 measured by tangent angles, at the point of initial contact dictates whether  
749 macrophages initiate phagocytosis or simply spread on particles (Champion and  
750 Mitragotri 2006). Taken together these results can explain the different uptake  
751 observed in static versus dynamic cultures exposed to NP with different shapes.  
752 Also, these findings invite researchers to take care when extrapolating their results  
753 of NP shape-dependent uptake in static cultures to dynamic *in vivo* models.

#### 754 755 4.3 Intracellular trafficking shape-dependent

756  
757 It has been suggested in some theoretical works that NP shape is a critical factor in  
758 determining the translocation of NP across a lipid bilayer (Yang and Ma, 2010;  
759 Ding et al. 2012) but just a few articles relate NP shape with the intracellular  
760 trafficking. In a pretty systematic study, Chu et al. demonstrated the role of the  
761 morphological features in determining the cellular translocation dynamics but also  
762 the fate of the NP. Authors found that NP with sharp shapes, regardless of their  
763 surface chemistry, size, or composition, could pierce the membranes of  
764 endosomes that carried them into the cells and escape to the cytoplasm, which in  
765 turn significantly reduced the cellular excretion rate of the NP (Chu et al. 2015). In  
766 this context, Muro et al. (2008) showed the importance of understanding the  
767 mechanisms underlying the NP intracellular trafficking. They designed polystyrene  
768 nano and microparticles to assist specific therapeutic needs. Authors observed that  
769 spherical polystyrene NP in the nanometer size (100 nm) targeted to enter the cell

770 via cell adhesion molecule-mediated endocytosis showed a more efficient transport  
771 to lysosomes than spherical or elliptical disk polystyrene particles at the micro-size  
772 that remained for more time in prelysosomal compartments. Taking advantage of  
773 these observations, authors functionalized micron-size particles with catalase, an  
774 enzyme that converts hydrogen peroxide into water and oxygen. The particles  
775 were endocytosed and reside for a prolonged time at pre-lysosomal compartments  
776 where they exerted its activity and protected the cell from oxidative damage.  
777 Otherwise nano-sized polystyrene particles were functionalized with acid  
778 sphingomyelinase and efficiently delivered to lysosomes as an enzyme  
779 replacement therapy for attenuation of accumulated sphingomyelin, a lysosomal  
780 storage disorder. This work highlighted that just by varying the size of particles  
781 different subcellular destinations can be achieved (Muro et al. 2008).

782

783 4.4 Shape-dependent NP cellular response interpretation: Curvature makes the  
784 difference

785

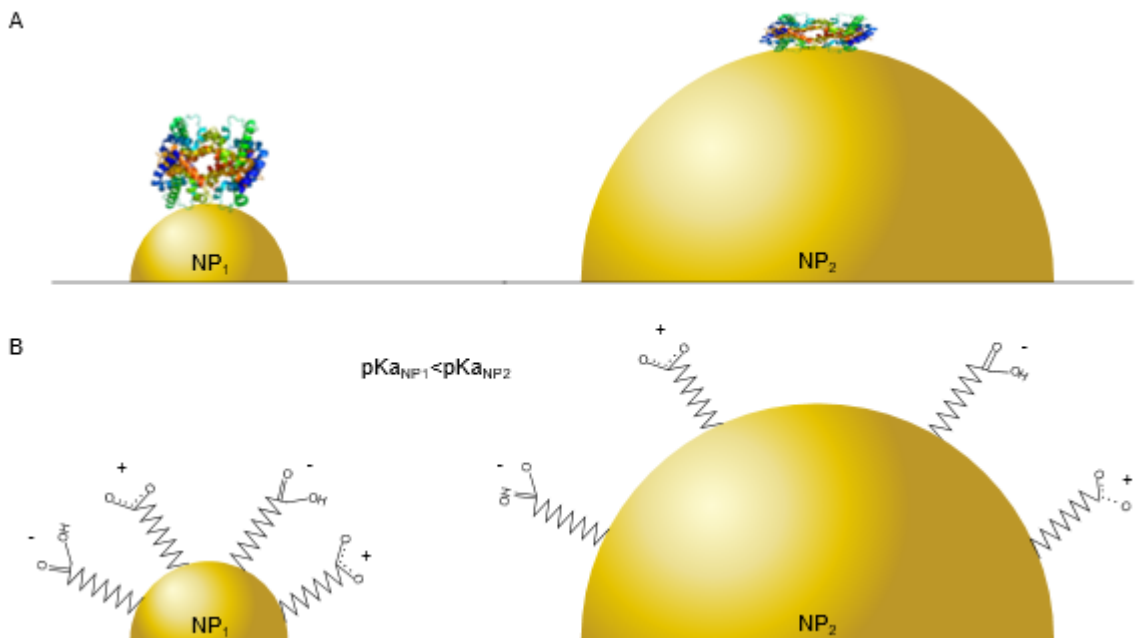
786 Anisotropic NP exhibit very complex morphologies with regions of high and low  
787 curvatures. It has been shown that temperature, ligands coating, the presence of  
788 certain ions, and even protein corona formation can induce a change in NP shape  
789 toward more stable structures (Takeda, 2011; Fang et al. 2017; Jana et al. 2017).  
790 This fact remains poorly understood and it has also been widely neglected in the  
791 literature. Such a geometrical change resulting from a simple external stimulus  
792 could have broad implications for the design of medical nanodevices but also  
793 interpret shape-related cellular responses.

794 NP curvature modifies the NP coating (Fig. 6). NP curvature influences the  
795 conformational changes induced in protein binding on NP surface (Fig. 6A).  
796 Lundqvist et al. showed that differences in silica NP curvatures (6, 9, and 15 nm of  
797 diameters) strongly perturbed the secondary structure of a human carbonic  
798 anhydrase attached. NP with a longer diameter allow the formation of larger  
799 particle-protein interaction surfaces and cause larger perturbations of the protein's  
800 secondary structure upon interaction (Lundqvist et al. 2004).

801 In addition, it has been shown that NP local curvature elicits a different ionization  
802 state of an adsorbed molecular layer in two major opposite NP curvatures leading  
803 different charges on the NP surface especially when acidic ligands are used (Fig.  
804 6B). The heterogeneity of ligand density immobilized on anisotropic NP surface  
805 also influences their dissociation. This means that the apparent acid dissociation  
806 constant (pKa) of two NP with the same coating but different curvatures might be  
807 different (Wang et al. 2011).

808

809



810  
811 Fig. 6. Influence of NP curvature in their coating. NP curvature determines A) the  
812 conformational changes induced in bound proteins and B) the apparent acid  
813 dissociation constants (pKa).

814  
815  
816 Many studies have evidenced the heterogeneity of ligands coated density on non-  
817 spherical NP. Studies of the spatially-dependent kinetics of protein corona  
818 formation around Ag nanocubes showed that there are significant differences in  
819 protein adsorption at edges compared with corners at short incubation times  
820 (Miclăuș et al. 2014). The knowledge about NP coating preference for a specific  
821 curvature opens the possibility for generating charge patterns that guide the  
822 attachment of NP, proteins or other biomolecules or even for designing NP self-  
823 assembled clusters, as Walker and coworkers demonstrated (Walker et al. 2013).  
824 The shape-dependent influence of NP reactivity can be easily misattributed to a  
825 particular cellular response. However, the real causal relation is possibly the  
826 different surface reactivity, rather than any geometrical property (Kinnear et al.  
827 2017). It is really challenging to separate a cell response from specific physical  
828 consequences of NP anisotropy. In this context, theoretical approaches could  
829 significantly improve our understanding of the influence of NP shape on membrane  
830 interaction, and ligand coating alterations, but due to the complex interactions  
831 between size, shape, coating, protein corona, flows, charges, etc. all these  
832 theoretical approaches should be supported by strong experimental evidence to  
833 associate more accurately a specific cell behavior.

## 834 5 Additional considerations

### 835 5.1 Rigidity

836  
837  
838



839 Jiashu et al. demonstrated that stiffness is also an important parameter for  
840 designing NP. According to their results, an increment of the NP rigidity, while  
841 keeping the same NP chemical composition, size and surface properties, a higher  
842 uptake is favored due to the easier membrane deformation. In contrast, softer NP  
843 are trapped in the membrane (Jiashu et al. 2015). These works show for the very  
844 first time that tuning the rigidity of NP is an appealing way to improve therapeutic  
845 efficiency especially for applications like drug delivery. Otherwise, it has been  
846 observed that ovarian cancer cells' nuclear rigidity increases due to the presence  
847 of AuNP. These interesting results are being the research focus of several groups,  
848 as the nuclear rigidity of the cell largely decreases cell migration and could  
849 potentially inhibit cancer cell invasion (Ali et al. 2017). Similar results were obtained  
850 in mesenchymal stem cells cultured in the presence of silica NP. This suggests  
851 that the effects of silica-based NP may result in the structural reorganization of  
852 cortical cytoskeleton with subsequent stiffness increase and concomitant F-actin  
853 content decrease (Ogneva et al. 2014).  
854 Recently an excellent review was published by Septiadi et al. (2018) about the  
855 interaction between NP and cells from the point of view of bionanomechanics, i. e.,  
856 the ability of intracellular and extracellular NP to impair cell adhesion, cytoskeletal  
857 organization, stiffness, and migration are discussed (Septiadi et al. 2018).

858  
859

## 860 5.2 Nanopatterning

861

862 Although plenty of evidence has been gathered the exact mechanism of  
863 topography-induced cellular behavior has not been fully elucidated.  
864 Stem cell differentiation modulated by biophysical cues present on nanomaterials,  
865 such as nanopatterning and stiffness has become a fast-growing field with very  
866 important implications in regenerative medicine. Cells are capable of sensing  
867 nanoscaled topographical features and elasticity of the extracellular matrix that  
868 surrounds them. These physical cues are transduced via mechanical forces to  
869 signaling pathways that ultimately lead to cell differentiation. Teo et al. used hMSC  
870 and polydimethylsiloxane (PDMS) nano graftings. It was found that cells growing  
871 on patterned PDMS of 250 nm widths differentiated into a neuronal lineage, a  
872 phenomenon not seen when growing on unpatterned PDMS. Moreover, it was  
873 observed that nano grafting width could regulate focal adhesion (FA) spatial  
874 organization that led to changes in the actin cytoskeleton resulting in differential  
875 gene expression. FA are multicomponent protein complexes that bridge the  
876 cytoskeleton network to the extracellular matrix, it was demonstrated that focal  
877 adhesion kinase (FAK) had a crucial role as a signaling molecule to transduce  
878 topography signals to the nucleus triggering a series of downstream pathways for  
879 neuronal differentiation. It was also proved that although nanopatterning can  
880 induce cell differentiation by itself a synergistic effect is seen when combined with  
881 biochemical cues (Teo et al 2013). In addition, Chen et al. (2013) also have  
882 demonstrated that carboxylated MWCNTs can induce and maintain neural  
883 differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMMSCs)  
884 without any exogenous differentiating factors, as evidenced by the protein  
885 expression. According to the authors' proposal, MWCNTs can promote hBMMSC

886 neural differentiation, including up-regulating the neural growth factors; and  
887 trapping these neural growth factors to create a suitable environment for long-term  
888 neural differentiation (Chen and Hsiue, 2013).  
889 Otherwise, Kim et al. (2015) prepared a series of micropatterned geometries of  
890 nanosized graphene oxide (NGO) to guide stem cell differentiation. They found that  
891 human adipose-derived mesenchymal stem cells (hADMSC) growing in presence  
892 of an osteogenic medium in a linear patterning promoted osteogenesis with high  
893 levels of calcification, an indicator of bone regeneration. They observed that  
894 biochemical signals, patterning and the physicochemical properties of nanosized  
895 GO synergically promoted osteoblast differentiation. Meanwhile, a grid GO pattern  
896 facilitated neurogenesis with the highest conversion efficiency reported so far of  
897 30%, a good value since it has been difficult to transform human adipose-derived  
898 mesenchymal stem cells (hADMSCs) into ectodermal neuronal cells. This  
899 enhanced neuronal differentiation was attributed to the grid-like pattern that mimics  
900 the elongated and interconnected neuronal network (Kim et al. 2015).

901

### 902 5.3 Cell cycle phase

903

904 Another interesting parameter to be considered for a more accurate interpretation  
905 of data is the cell cycle phase in which nanoparticle internalization occurs. Some  
906 studies have shown that the accumulation of NP in human lung carcinoma cells  
907 (A549) incubated with carboxyl-functionalized polystyrene nanoparticles (PS-  
908 COOH, 40 nm of diameter) with an overall negative  $\zeta$ -potential ( $-34 \pm 1$  mV in  
909 PBS/ $-2 \pm 1$  mV in complete minimal essential medium, cMEM). Their results  
910 indicated that cells in different phases -of the cell cycle internalized NP at similar  
911 rates, after 24 h the concentration of NP in the cells could be ranked according to  
912 the different phases: G2/M>S>G0/G1. Internalized nanoparticles were not exported  
913 from cells but were split between daughter cells when the parent cell divides (Kim  
914 et al. 2011).

915 Besides, many NP types have been reported with the capacity to arrest cells in a  
916 specific cell cycle phase. Some of them have been reviewed by Mahmoudi et al.  
917 (2011). In this review, authors concluded that the various effects on the cell cycle  
918 may depend on the intracellular location of the NP (Mahmoudi et al. 2011).

919 In a later work, Patel et al. (2016) exposed the human epidermal carcinoma cell  
920 line A431 to ZnO NP. Their data demonstrated that ZnO NP did not induce cell  
921 cycle arrest in S and G2/M phase. Moreover, they observed cell cycle-dependent  
922 cellular uptake of ZnO NP. The higher uptake was observed in G2/M phase  
923 compared with other phases (Patel et al. 2016). This work is one of the few pieces  
924 of evidence that shows how NP uptake is also influenced by the cell cycle phase.  
925 Further research about it is needed to elucidate how cell cycle phase could NP  
926 uptake, trafficking and metabolism and ultimately safety.

927

## 928 6. Conclusions

929

930 There is not an "adequate" size for the optimal NP internalization. However, the  
931 size most of the literature has proposed is approximately 50 nm. NP size  
932 influences the endocytic pathway to be internalized by cells. Most of the

933 experimental data shows that  $\approx 100$  nm-sized NP are preferably internalized via  
934 clathrin-mediated endocytosis. Otherwise, the rest of the endocytosis pathways  
935 were highly dependent on cell- and material type. NP with diverse shapes exhibit  
936 different uptake rates as follows: spherical-, star- and flower-shaped AuNP > cube  
937 > rod > disk, probably due to ease of bending of cell membrane around the  
938 particles. This knowledge can be useful for designing cellular delivery systems.  
939 Gold nanostars have emerged as an interesting NP shape for novel medical  
940 nanodevices due to their higher uptake rate, lower cytotoxicity to mammalian cells  
941 and antibacterial activity. Shape-dependent NP reactivity can be easily  
942 misattributed to shape-dependent cell responses, when the real causal relation is  
943 the different NP surface reactivity due to the local NP curvature with which they  
944 interact with cells. Shape-dependent endocytosis of NP depends on the different  
945 surface adhesion energy of each shape but also on the orientation with which they  
946 interact with the cell.

947

948 Anisotropic NP have different surface reactivity (including heterogeneous ligand  
949 coating), which can lead to misattributions about shape-dependent cell response.  
950 NP internalization is a complex manifestation of three shape- and size-dependent  
951 parameters: a) particle surface-to-cell membrane contact area, b) strain energy for  
952 membrane deformation, and c) sedimentation or local particle concentration at the  
953 cell membrane particle-cell adhesion. In dynamic experiments with NP, rotational  
954 and tumbling motions of larger-size non-spherical NP in the flow play a dominant  
955 role in NP margination and cell interaction, compared to Brownian motion, gravity,  
956 and cell membrane deformation energy. The protein corona formed on NP at  
957 contact with serum significantly enlarges the NP hydrodynamic radius and changes  
958 the NP shape. This could hinder important remarks about how NP size influences  
959 cellular response or lead to imprecise conclusions. Positively charged NP have  
960 resulted in higher uptake rates and efficiency in diverse cell types. NP charge and  
961 hydrophobic/hydrophilic properties might influence cell trafficking and NP fate  
962 inside cells. Cytotoxicity and apoptosis increase with the decreasing NP aspect  
963 ratio. It has been proposed that an efficient NP coating strategy could be inspired  
964 in the homogeneous ligand distribution of enveloped viruses to achieve infections.  
965 The intricate relationship between NP size, shape and protein corona, and how to  
966 influence one on the other especially in presence of ligands on NP surface remains  
967 poorly understood. Rotation of is one of the most important mechanisms for  
968 anisotropic NP endocytosis and phagocytosis. Shape anisotropy of NP generates a  
969 heterogeneous membrane curvature distribution that induces an asymmetric  
970 endocytosis. Increasing the NP rigidity, a larger uptake is favored due to the easier  
971 membrane deformation. Cell cycle phase is another important parameter that  
972 influences cell response to NP, such as NP uptake rate. But also, NP exposure can  
973 affect the cell cycle, for example, arresting cells in a specific cycle phase.

974

## 975 **7. Future perspectives**

976

977 Understanding the nano-bio interactions is a non-trivial aim, due to the physics of  
978 the nanomaterials being between the frontiers of classical and quantic physics in a  
979 kind of limbo named "mesoscopic scale". Unlike quantic and macroscopic physics,

980 in the mesoscopic scale, the averaged behaviors exist but are highly affected by  
981 fluctuations which have a deterministic origin. Currently, in the state of the art, we  
982 have developed a powerful pool of scientific theories, technologies and techniques  
983 that allow us to synthesize a wide variety of nanomaterials a la carte with  
984 unforeseen applications. There is no doubt these advances could enlarge the  
985 spectrum of solutions to improve nanodevices' applications but also add extra  
986 degrees of freedom to the the current understanding of NP-cell interactions and  
987 moreover, to elicit the desired cell response by manipulating NP physical  
988 properties. How far are we from having a good enough understanding of cell  
989 response mediated for NP interactions for a rational development of safe and  
990 effective biomedical nanodevices? First, we must emphasize that there is a lack of  
991 systematic reports accounting for the influence of NP properties apart from size  
992 and dose. And second, further research is needed to elucidate the influence of NP  
993 on the cell response globally, i. e. the synergy between shape, local curvature, cell  
994 cycle phase, protein corona, orientation, rigidity, surface coating, etc. to avoid  
995 misattributing a cell behavior to the inappropriate NP property. In this context,  
996 theoretical approaches can be very useful. For more accurate results possible  
997 synergic effects should be considered and supported by experimental data for a  
998 more accurate understanding.

999

1000

#### 1001 **Funding**

1002 Research performed thanks to the financial support of the Programa UNAM-  
1003 DGAPA-PAPIIT IT-200416. F. Villanueva received a scholarship from CONACyT  
1004 during her graduate studies.

1005

1006

#### 1007 **References**

- 1008 Agarwal, R., Singh, V., Journey, P., Shi, L., Sreenivasan, S. V., Roy, K., 2013.  
1009 Mammalian cells preferentially internalize hydrogel nanodiscs over nanorods  
1010 and use shape-specific uptake mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110,  
1011 17247–17252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305000110>
- 1012 Ali, M.R.K., Wu, Y., Ghosh, D., Do, B.H., Chen, K., Dawson, M.R., Fang, N.,  
1013 Sulchek, T.A., El-Sayed, M.A., 2017. Nuclear Membrane-Targeted Gold  
1014 Nanoparticles Inhibit Cancer Cell Migration and Invasion. *ACS Nano* 11,  
1015 3716–3726. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08345>
- 1016 Avivi, S., Mastai, Y., Hodes, G., Gedanken, A., 1999. Sonochemical Hydrolysis of  
1017 Ga<sup>3+</sup> Ions: Synthesis of Scroll-like Cylindrical Nanoparticles of Gallium Oxide  
1018 Hydroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 4196–4199.  
1019 <https://doi.org/10.1021/ja9835584>
- 1020 Banerjee, A., Berezhkovskii, A., Nossal, R., 2016. Kinetics of cellular uptake of  
1021 viruses and nanoparticles via clathrin-mediated endocytosis. *Phys. Biol.* 13,  
1022 016005. <http://doi.org/10.1088/1478-3975/13/1/016005>.
- 1023 Bell, G.I., Dembo, M., Bongrand, P., 1984. Cell adhesion. Competition between

- 1024 nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.* 45, 1051–1064.  
1025 [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(84\)84252-6](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(84)84252-6)
- 1026 Capjak, I., Goreta, Š.S., Jurašin, D.D., Vrček, V.I., 2017. How protein coronas  
1027 determine the fate of engineered nanoparticles in biological environment.  
1028 *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 68, 245-253. [https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-](https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-3054)  
1029 3054
- 1030 Cedervall, T., Lynch, I., Foy, M., Berggård, T., Donnelly, S.C., Cagney, G., Linse,  
1031 S., Dawson, K.A., 2007. Detailed Identification of Plasma Proteins Adsorbed  
1032 on Copolymer Nanoparticles. *Angew. Chemie Int. Ed.* 46, 5754–5756.  
1033 <https://doi.org/10.1002/anie.200700465>
- 1034 Champion, J.A., Mitragotri, S., 2006. Role of target geometry in phagocytosis.  
1035 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4930 –4934.  
1036 <http://doi.org/10.1073/pnas.0600997103>
- 1037 Champion, J.A., Walker, A., Mitragotri, S., 2008. Role of particle size in  
1038 phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm. Res.* 25, 1815–1821.  
1039 <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9562-y>
- 1040 Chao, T.-I., Xiang, S., Chen, C.-S., Chin, W.-C., Nelson, A.J., Wang, C., Lu, J.,  
1041 2009. Carbon nanotubes promote neuron differentiation from human  
1042 embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 426–430.  
1043 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.157>
- 1044 Charbgoon, F., Nejabat, M., Abnous, K., Soltani, F., Taghdisi, S.M., Alibolandi, M.,  
1045 Thomas Shier, W., Steele, T.W.J., Ramezani, M., 2018. Gold nanoparticle  
1046 should understand protein corona for being a clinical nanomaterial. *J. Control.*  
1047 *Release* 272, 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.002>
- 1048 Chen, Y.-S., Hsiue, G.-H., 2013. Directing neural differentiation of mesenchymal  
1049 stem cells by carboxylated multiwalled carbon nanotubes. *Biomaterials* 34,  
1050 4936–4944. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.063>
- 1051 Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C.W., 2006. Determining the size and  
1052 shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano*  
1053 *Lett.* 6, 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>
- 1054 Cho, E.C., Xie, J., Wurm, P.A., Xia, Y., 2009. Understanding the role of surface  
1055 charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing  
1056 gold nanoparticles on the cell surface with a I<sub>2</sub>/KI etchant. *Nano Lett.* 9,  
1057 1080–1084. <https://doi.org/10.1021/nl803487r>
- 1058 Cho, E.C., Zhang, Q., Xia, Y., 2011. The effect of sedimentation and diffusion on  
1059 cellular uptake of gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* 6, 385-391.  
1060 <http://doi.org/10.1038/nnano.2011.58>
- 1061 Chu, Z., Zhang, S., Zhang, B., Zhang, C., Fang, C.-Y., Rehor, I., Cigler, P., Chang,  
1062 H.-C., Lin, G., Liu, R., Li, Q., 2015. Unambiguous observation of shape effects

1063 on cellular fate of nanoparticles. *Sci. Rep.* 4, 4495.  
1064 <https://doi.org/10.1038/srep04495>

1065 Chugh, H., Sood, D., Chandra, I., Tomar, V., Dhawan, G., Chandra, R., 2018. Role  
1066 of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine. *Artif. Cells,*  
1067 *Nanomedicine, Biotechnol.* 1–11.  
1068 <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1449118>

1069 Dasgupta, S., Auth, T., Gompper, G., 2014. Shape and Orientation Matter for the  
1070 Cellular Uptake of Nonspherical Particles. *Nano Lett.* 14, 687–693.  
1071 <https://doi.org/10.1021/nl403949h>

1072 Decuzzi, P., Ferrari, M., 2007. The role of specific and non-specific interactions in  
1073 receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. *Biomaterials* 28, 2915–2922.  
1074 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.02.013>

1075 Decuzzi, P., Ferrari, M., 2006. The adhesive strength of non-spherical particles  
1076 mediated by specific interactions. *Biomaterials* 27, 5307–5314.  
1077 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.024>

1078 Decuzzi, P., Pasqualini, R., Arap, W., Ferrari, M., 2008. Intravascular Delivery of  
1079 Particulate Systems: Does Geometry Really Matter? *Pharm. Res.* 26, 235.  
1080 <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9697-x>

1081 Ding, H., Tian, W., Ma, Y., 2012. Designing Nanoparticle Translocation through  
1082 Membranes by Computer Simulations. *ACS Nano* 6, 1230–1238.  
1083 <https://doi.org/10.1021/nn2038862>

1084 Elbakry, A., Wurster, E., Zaky, A., Liebl, R., Schindler, E., Bauer-Kreisel, P., Blunk,  
1085 T., Rachel, R., Goepferich, A., Breunig, M., 2012. Layer-by-Layer Coated Gold  
1086 Nanoparticles: Size-Dependent Delivery of DNA into Cells. *Small* 8, 3847–  
1087 3856. <https://doi.org/doi:10.1002/sml.201201112>

1088 Fang, X., Ren, H., Zhao, H., Li, Z., 2017. Ultrasensitive visual and colorimetric  
1089 determination of dopamine based on the prevention of etching of silver  
1090 nanoprisms by chloride. *Microchim. Acta* 184, 415–421.  
1091 <https://doi.org/10.1007/s00604-016-2024-z>

1092 Freund, L.B., Lin, Y., 2004. The role of binder mobility in spontaneous adhesive  
1093 contact and implications for cell adhesion. *J. Mech. Phys. Solids* 52, 2455–  
1094 2472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmps.2004.05.004>

1095 Fröhlich, E., 2012. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of  
1096 medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine.* 7, 5577-5591.  
1097 <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>

1098 Gao, H., Shi, W., Freund, L.B., 2005. Mechanics of receptor-mediated endocytosis.  
1099 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9469–9474.  
1100 <https://doi.org/10.1073/pnas.0503879102>

1101 Gao, L.N., And, Tao, B.Z., 2017. Gold Nanoparticles: Promising Agent to Improve  
1102 the Diagnosis and Therapy of Cancer. *Curr. Drug Metab.* 18, 1055-1067.  
1103 <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/1389200218666170925122513>

1104 Garcia-Alvarez, R., Hadjidemetriou, M., Sanchez-Iglesias, A., Liz-Marzan, L.M.,  
1105 Kostarelos, K., 2018. In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles.  
1106 The effect of their size and shape. *Nanoscale* 10, 1256–1264.  
1107 <https://doi.org/10.1039/C7NR08322J>

1108 Gavze, E., 1998. Motion of inertial spheroidal particles in shear flow near a solid  
1109 wall with special application to aerosol transport in microgravity, *Journal of*  
1110 *Fluid Mechanics.* 371, 59-79 <https://doi.org/10.1017/S0022112098002109>

1111 Gratton, S.E.A., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E.,  
1112 DeSimone, J.M., 2008. The effect of particle design on cellular internalization  
1113 pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 11613–11618.  
1114 <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>

1115 Haixia, W., Youhui, L., Karin, N., Ulrich, N.G., 2017. The protein corona on  
1116 nanoparticles as viewed from a nanoparticle-sizing perspective. *Wiley*  
1117 *Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* 0, e1500.  
1118 <https://doi.org/10.1002/wnan.1500>

1119 Hao, N., Chorsi, H.T., Zhang, J.X.J., 2017. Hierarchical Lotus Leaf-Like  
1120 Mesoporous Silica Material with Unique Bilayer and Hollow Sandwich-Like  
1121 Folds: Synthesis, Mechanism, and Applications. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5,  
1122 2044–2049. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02893>

1123 Hao, X., Wu, J., Shan, Y., Cai, M., Shang, X., Jiang, J., Wang, H., 2012. Caveolae-  
1124 mediated endocytosis of biocompatible gold nanoparticles in living Hela cells.  
1125 *J. Phys. Condens. Matter* 24, 164207. [https://doi.org/10.1088/0953-](https://doi.org/10.1088/0953-8984/24/16/164207)  
1126 [8984/24/16/164207](https://doi.org/10.1088/0953-8984/24/16/164207)

1127 Harush-Frenkel, O., Debotton, N., Benita, S., Altschuler, Y., 2007. Targeting of  
1128 nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem. Biophys.*  
1129 *Res. Commun.* 353, 26–32.  
1130 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.135>

1131 Hu, H., Ni, Y., Montana, V., Haddon, R.C., Parpura, V., 2004. Chemically  
1132 Functionalized Carbon Nanotubes as Substrates for Neuronal Growth. *Nano*  
1133 *Lett.* 4, 507–511. <https://doi.org/10.1021/nl035193d>

1134 Huang, D.-M., Hung, Y., Ko, B.-S., Hsu, S.-C., Chen, W.-H., Chien, C.-L., Tsai, C.-  
1135 P., Kuo, C.-T., Kang, J.-C., Yang, C.-S., Mou, C.-Y., Chen, Y.-C., 2005. Highly  
1136 efficient cellular labeling of mesoporous nanoparticles in human mesenchymal  
1137 stem cells: implication for stem cell tracking. *FASEB J.* 19, 2014–2016.  
1138 <https://doi.org/10.1096/fj.05-4288fje>

1139 Huang, K., Ma, H., Liu, J., Huo, S., Kumar, A., Wei, T., Zhang, Xu, Jin, S., Gan, Y.,

- 1140 Wang, P.C., He, S., Zhang, Xiaoning, Liang, X.-J., 2012. Size-Dependent  
1141 Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells,  
1142 Multicellular Spheroids, and Tumors in Vivo. *ACS Nano* 6, 4483–4493.  
1143 <https://doi.org/10.1021/nn301282m>
- 1144 Huang, M., Ma, Z., Khor, E., Lim, L.-Y., 2002. Uptake of FITC-Chitosan  
1145 Nanoparticles by A549 Cells. *Pharm. Res.* 19, 1488–1494.  
1146 <https://doi.org/10.1023/A:1020404615898>
- 1147 Jain, P., Pawar, R.S., Pandey, R.S., Madan, J., Pawar, S., Lakshmi, P.K.,  
1148 Sudheesh, M.S., 2017. In-vitro in-vivo correlation (IVIVC) in nanomedicine: Is  
1149 protein corona the missing link? *Biotechnol. Adv.* 35, 889–904.  
1150 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.08.003>
- 1151 Jana, S., de Frutos, M., Davidson, P., Abécassis, B., 2017. Ligand-induced twisting  
1152 of nanoplatelets and their self-assembly into chiral ribbons. *Sci. Adv.* 3,  
1153 e1701483. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1701483>
- 1154 Jiang, W., Kim, B.Y.S., Rutka, J.T., Chan, W.C.W., 2008. Nanoparticle-mediated  
1155 cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* 3, 145–150.  
1156 <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>
- 1157 Jiashu, S., Lu, Z., Jiuling, W., Qiang, F., Dingbin, L., Qifang, Y., Dongyan, X., Yujie,  
1158 W., Baoquan, D., Xinghua, S., Xingyu, J., 2015. Tunable Rigidity of (Polymeric  
1159 Core)–(Lipid Shell) Nanoparticles for Regulated Cellular Uptake. *Adv. Mater.*  
1160 27, 1402–1407. <https://doi.org/doi:10.1002/adma.201404788>
- 1161 Jindal, A.B., 2017. The effect of particle shape on cellular interaction and drug  
1162 delivery applications of micro- and nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 532, 450–465.  
1163 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.028>
- 1164 Journey, P., Agarwal, R., Singh, V., Choi, D., Roy, K., Sreenivasan, S. V, Shi, L.,  
1165 2017. Unique size and shape-dependent uptake behaviors of non-spherical  
1166 nanoparticles by endothelial cells due to a shearing flow. *J. Control. Release*  
1167 245, 170–176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.033>
- 1168 Kalimuthu, K., Lubin, B.-C., Bazylevich, A., Gellerman, G., Shpilberg, O.,  
1169 Luboshits, G., Firer, M.A., 2018. Gold nanoparticles stabilize peptide-drug-  
1170 conjugates for sustained targeted drug delivery to cancer cells. *J.*  
1171 *Nanobiotechnology* 16, 34. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0362-1>
- 1172 Kang, J.S., Lim, J., Rho, W.-Y., Kim, J., Moon, D.-S., Jeong, J., Jung, D., Choi, J.-  
1173 W., Lee, J.-K., Sung, Y.-E., 2016. Wrinkled silica/titania nanoparticles with  
1174 tunable interwrinkle distances for efficient utilization of photons in dye-  
1175 sensitized solar cells. *Sci. Rep.* 6, 30829. <http://doi.org/10.1038/srep30829>.
- 1176 Kim, J.A., Åberg, C., Salvati, A., Dawson, K.A., 2011. Role of cell cycle on the  
1177 cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nat.*  
1178 *Nanotechnol.* 7, 62–68. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.191>



- 1179 Kim, T.-H., Shah, S., Yang, L., Yin, P.T., Hossain, M.K., Conley, B., Choi, J.-W.,  
1180 Lee, K.-B., 2015. Controlling Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells  
1181 Using Combinatorial Graphene Hybrid-Pattern Arrays. *ACS Nano* 9, 3780–  
1182 3790. <https://doi.org/10.1021/nn5066028>
- 1183 Kim, T., Kim, M., Park, H., Shin, U.S., Gong, M., Kim, H., 2012. Size-dependent  
1184 cellular toxicity of silver nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 100A,  
1185 1033–1043. <https://doi.org/doi:10.1002/jbm.a.34053>
- 1186 Kinneer, C., Moore, T.L., Rodriguez-Lorenzo, L., Rothen-Rutishauser, B., Petri-  
1187 Fink, A., 2017. Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its  
1188 Implications for Nanomedicine. *Chem. Rev.* 117, 11476–11521.  
1189 <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00194>
- 1190 Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., He, Z., 2013. The endocytosis and intracellular fate of  
1191 nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J. Pharm. Sci.* 8, 1–10.  
1192 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001>
- 1193 Lane, L.A., Qian, X., Smith, A.M., Nie, S., 2015. Physical Chemistry of  
1194 Nanomedicine: Understanding the Complex Behaviors of Nanoparticles in  
1195 Vivo. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 66, 521–547. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040513-103718>
- 1197 Leifert, A., Pan, Y., Kinkeldey, A., Schiefer, F., Setzler, J., Scheel, O., Lichtenfeld,  
1198 H., Schmid, G., Wenzel, W., Jahnen-Dechent, W., Simon, U., 2013.  
1199 Differential hERG ion channel activity of ultras-small gold nanoparticles. *Proc.*  
1200 *Natl. Acad. Sci.* 110, 8004–8009. <http://doi.org/10.1073/pnas.1220143110>
- 1201 Leila, N., Franz, B., Robert, G., Eric, A., 2004. Current methods for attaching  
1202 targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 93, 1980–  
1203 1992. <https://doi.org/doi:10.1002/jps.20098>
- 1204 Li, J.J., Kawazoe, N., Chen, G., 2015. Gold nanoparticles with different charge and  
1205 moiety induce differential cell response on mesenchymal stem cell  
1206 osteogenesis. *Biomaterials* 54, 226–236.  
1207 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.03.001>
- 1208 Li, L., Zhang, Y., Wang, J., 2017. Effects of ligand distribution on receptor-  
1209 diffusion-mediated cellular uptake of nanoparticles. *R. Soc. Open Sci.* 4,  
1210 170063. <https://doi.org/10.1098/rsos.170063>
- 1211 Li, Q., Liu, C.-G., Yu, Y., 2015. Separation of monodisperse alginate nanoparticles  
1212 and effect of particle size on transport of vitamin E. *Carbohydr. Polym.* 124,  
1213 274–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.007>
- 1214 Li, Y., Chen, X., Gu, N., 2008. Computational investigation of interaction between  
1215 nanoparticles and membranes: Hydrophobic/hydrophilic effect. *J. Phys. Chem.*  
1216 *B* 112, 16647–16653. <https://doi.org/10.1021/jp8051906>
- 1217 Li, Y., Gu, N., 2010. Thermodynamics of charged nanoparticle adsorption on

- 1218 charge-neutral membranes: A simulation study. *J. Phys. Chem. B* 114, 2749–  
1219 2754. <https://doi.org/10.1021/jp904550b>
- 1220 Li, Y., Kroger, M., Liu, W.K., 2015. Shape effect in cellular uptake of PEGylated  
1221 nanoparticles: comparison between sphere, rod, cube and disk. *Nanoscale* 7,  
1222 16631–16646. <https://doi.org/10.1039/C5NR02970H>
- 1223 Li, Y., Yue, T., Yang, K., Zhang, X., 2012. Molecular modeling of the relationship  
1224 between nanoparticle shape anisotropy and endocytosis kinetics. *Biomaterials*  
1225 33, 4965–4973.  
1226 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.044>
- 1227 Lundqvist, M., Augustsson, C., Lilja, M., Lundkvist, K., Dahlbäck, B., Linse, S.,  
1228 Cedervall, T., 2017. The nanoparticle protein corona formed in human blood or  
1229 human blood fractions. *PLoS One* 12, e0175871.  
1230 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175871>
- 1231 Lundqvist, M., Sethson, I., Jonsson, B.-H., 2004. Protein Adsorption onto Silica  
1232 Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature  
1233 and the Protein Stability. *Langmuir* 20, 10639–10647.  
1234 <https://doi.org/10.1021/la0484725>
- 1235 Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., Dawson, K.A., 2008.  
1236 Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with  
1237 possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105,  
1238 14265–14270. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>
- 1239 Ma, X., Wu, Y., Jin, S., Tian, Y., Zhang, X., Zhao, Y., Yu, L., Liang, X.J., 2011.  
1240 Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-  
1241 dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment. *ACS Nano* 5,  
1242 8629–8639. <https://doi.org/10.1021/nn202155y>
- 1243 Mahmoudi, M., Azadmanesh, K., Shokrgozar, M.A., Journeay, W.S., Laurent, S.,  
1244 2011. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chem. Rev.* 111, 3407–  
1245 3432. <https://doi.org/10.1021/cr1003166>
- 1246 Makarucha, A.J., Todorova, N., Yarovsky, I., 2011. Nanomaterials in biological  
1247 environment: A review of computer modelling studies. *Eur. Biophys.* 40, 103-  
1248 115. <https://doi.org/10.1007/s00249-010-0651-6>
- 1249 Miclăuș, T., Bochenkov, V.E., Ogaki, R., Howard, K.A., Sutherland, D.S., 2014.  
1250 Spatial Mapping and Quantification of Soft and Hard Protein Coronas at Silver  
1251 Nanocubes. *Nano Lett.* 14, 2086-2093. <https://doi.org/10.1021/nl500277c>
- 1252 Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M., Jurukovski, V., Rafailovich, M.H., 2010.  
1253 Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration  
1254 and exposure time. *Nanotoxicology* 4, 120–137.  
1255 <https://doi.org/10.3109/17435390903471463>
- 1256 Muro, S., Garnacho, C., Champion, J.A., Leferovich, J., Gajewski, C., Schuchman,

- 1257 E.H., Mitragotri, S., Muzykantov, V.R., 2008. Control of Endothelial Targeting  
 1258 and Intracellular Delivery of Therapeutic Enzymes by Modulating the Size and  
 1259 Shape of ICAM-1-targeted Carriers 16, 1450–1458.  
 1260 <https://doi.org/10.1038/mt.2008.127>
- 1261 Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M. V., Somasundaran, P.,  
 1262 Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., 2009. Understanding  
 1263 biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat. Mater.* 8, 543–  
 1264 557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>
- 1265 Neshatian, M., Chung, S., Yohan, D., Yang, C., Chithrani, D.B., 2014. Determining  
 1266 the Size Dependence of Colloidal Gold Nanoparticle Uptake in a Tumor-like  
 1267 Interface (Hypoxic). *Colloids Interface Sci. Commun.* 1, 57–61.  
 1268 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colcom.2014.07.004>
- 1269 Ng, K.C., Udagedara, I.B., Rukhlenko, I.D., Chen, Y., Tang, Y., Premaratne, M.,  
 1270 Cheng, W., 2012. Free-Standing Plasmonic-Nanorod Superlattice Sheets.  
 1271 *ACS Nano* 6, 925–934. <https://doi.org/10.1021/nn204498j>
- 1272 Nguyen, V.H., Lee, B.-J., 2017. Protein corona: a new approach for nanomedicine  
 1273 design. *Int. J. Nanomedicine* 12, 3137–3151.  
 1274 <https://doi.org/10.2147/IJN.S129300>
- 1275 Niikura, K., Kobayashi, K., Takeuchi, C., Fujitani, N., Takahara, S., Ninomiya, T.,  
 1276 Hagiwara, K., Mitomo, H., Ito, Y., Osada, Y., Ijro, K., 2014. Amphiphilic gold  
 1277 nanoparticles displaying flexible bifurcated ligands as a carrier for siRNA  
 1278 delivery into the cell cytosol. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 22146–22154.  
 1279 <https://doi.org/10.1021/am505577j>
- 1280 Ogneva, I. V, Buravkov, S. V, Shubenkov, A.N., Buravkova, L.B., 2014. Mechanical  
 1281 characteristics of mesenchymal stem cells under impact of silica-based  
 1282 nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 284. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-284>
- 1284 Oh, W., Kim, S., Yoon, H., Jang, J., 2010. Shape-Dependent Cytotoxicity and  
 1285 Proinflammatory Response of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)  
 1286 Nanomaterials. *Small* 6, 872–879. <https://doi.org/doi:10.1002/sml.200902074>
- 1287 Orellana-Tavra, C., Mercado, S.A., Fairen-Jimenez, D., 2016. Endocytosis  
 1288 Mechanism of Nano Metal-Organic Frameworks for Drug Delivery. *Adv.*  
 1289 *Healthc. Mater.* 5, 2261–2270. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600296>
- 1290 Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W.,  
 1291 Simon, U., Jahnen-Dechent, W., 2009. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm  
 1292 trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small* 5, 2067–  
 1293 2076. <https://doi.org/10.1002/sml.200900466>
- 1294 Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G.,  
 1295 Brandau, W., Jahnen-Dechent, W., 2007. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold

- 1296 Nanoparticles. *Small* 3, 1941–1949. <https://doi.org/10.1002/smll.200700378>
- 1297 Patel, P., Kansara, K., Senapati, V.A., Shanker, R., Dhawan, A., Kumar, A., 2016.  
1298 Cell cycle dependent cellular uptake of zinc oxide nanoparticles in human  
1299 epidermal cells. *Mutagenesis* 31, 481–490.
- 1300 Peiris, P.M., He, F., Covarrubias, G., Raghunathan, S., Turan, O., Lorkowski, M.,  
1301 Gnanasambandam, B., Wu, C., Schiemann, W.P., Karathanasis, E., 2018.  
1302 Precise targeting of cancer metastasis using multi-ligand nanoparticles  
1303 incorporating four different ligands. *Nanoscale* 10, 6861–6871.  
1304 <https://doi.org/10.1039/C8NR02513D>
- 1305 Penders, J., Stolzoff, M., Hickey, D.J., Andersson, M., Webster, T.J., 2017. Shape-  
1306 dependent antibacterial effects of non-cytotoxic gold nanoparticles. *Int. J.*  
1307 *Nanomedicine* 12, 2457–2468. <https://doi.org/10.2147/IJN.S124442>
- 1308 Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D., 2004. Size-dependent  
1309 internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated  
1310 endocytosis. *Biochem. J.* 377, 159–169. <https://doi.org/10.1042/bj20031253>
- 1311 Salatin, S., Maleki Dizaj, S., Yari Khosroushahi, A., 2015. Effect of the surface  
1312 modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. *Cell Biol. Int.*  
1313 39, 881–890. <https://doi.org/10.1002/cbin.10459>
- 1314 Samadi Moghaddam, M., Heiny, M., Shastri, V., 2015. Enhanced cellular uptake of  
1315 nanoparticles by increasing the hydrophobicity of poly(lactic acid) through  
1316 copolymerization with cell-membrane-lipid components. *Chem. Commun.* 51,  
1317 14605–14608. <https://doi.org/10.1039/C5CC06397C>
- 1318 Scaffaro, R., Lopresti, F., Marino, A., Nostro, A., 2018. Antimicrobial additives for  
1319 poly(lactic acid) materials and their applications: current state and  
1320 perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7739–7756.  
1321 <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9220-1>
- 1322 Schubert, J., Chanana, M., 2018. Coating Matters: Review on Colloidal Stability of  
1323 Nanoparticles with Biocompatible Coatings in Biological Media, Living Cells  
1324 and Organisms. *Curr. Med. Chem.* 25, 4553–4586.  
1325 <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/0929867325666180601101859>
- 1326 Senut, M.-C., Zhang, Y., Liu, F., Sen, A., Ruden, D.M., Mao, G., 2016. Size-  
1327 dependent Toxicity of Gold Nanoparticles on Human Embryonic Stem Cells  
1328 and Their Neural Derivatives. *Small* 12, 631–646.  
1329 <https://doi.org/10.1002/smll.201502346>
- 1330 Septiadi, D., Crippa, F., Moore Thomas, L., Rothen-Rutishauser, B., Petri-Fink, A.,  
1331 2018. Nanoparticle–Cell Interaction: A Cell Mechanics Perspective. *Adv.*  
1332 *Mater.* 30, 1704463. <https://doi.org/doi:10.1002/adma.201704463>
- 1333 Shang, L., Nienhaus, K., Jiang, X., Yang, L., Landfester, K., Mailänder, V., Simmet,  
1334 T., Nienhaus, G.U., 2014. Nanoparticle interactions with live cells: Quantitative

- 1335 fluorescence microscopy of nanoparticle size effects. *Beilstein J. Nanotechnol.*  
1336 5, 2388–2397. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.248>
- 1337 Shi, W., Wang, J., Fan, X., Gao, H., 2009. Size and shape effects on diffusion and  
1338 absorption of colloidal particles near a partially absorbing sphere: Implications  
1339 for uptake of nanoparticles in animal cells, *Physical review. E, Statistical,*  
1340 *nonlinear, and soft matter physics.* 78, 061914.  
1341 <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.78.061914>
- 1342 Shi, X., Zhou, K., Huang, F., Wang, C., 2017. Interaction of hydroxyapatite  
1343 nanoparticles with endothelial cells: internalization and inhibition of  
1344 angiogenesis in vitro through the PI3K/Akt pathway. *Int. J. Nanomedicine* 12,  
1345 5781–5795. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140179>
- 1346 Shvedova, T.O., Khaliullin, A., Fatkhutdinova, L., Zalyalov, R., Kisin, E., Murray, A.,  
1347 2015. In vitro toxic effects of different types of carbon nanotubes. *IOP Conf.*  
1348 *Ser. Mater. Sci. Eng.* 98, 12021. [https://doi.org/10.1088/1757-](https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012021)  
1349 [899X/98/1/012021](https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012021)
- 1350 Takeda, H.Y. and K.M. and Y.K. and H.K. and S.S. and M.H. and S., 2011.  
1351 Temperature-Dependent Change in Shape of Platinum Nanoparticles  
1352 Supported on CeO<sub>2</sub> during Catalytic Reactions. *Appl. Phys. Express* 4,  
1353 65001. <https://doi.org/10.1143/APEX.4.065001>
- 1354 Teo, B.K.K., Wong, S.T., Lim, C.K., Kung, T.Y.S., Yap, C.H., Ramagopal, Y.,  
1355 Romer, L.H., Yim, E.K.F., 2013. Nanotopography Modulates  
1356 Mechanotransduction of Stem Cells and Induces Differentiation through Focal  
1357 Adhesion Kinase. *ACS Nano* 7, 4785–4798.  
1358 <https://doi.org/10.1021/nn304966z>
- 1359 Terdalkar, S.S., Huang, S., Yuan, H., Rencis, J.J., Zhu, T., Zhang, S., 2010.  
1360 Nanoscale fracture in graphene. *Chem. Phys. Lett.* 494, 218–222.  
1361 [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.05.090](https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.05.090)
- 1362 Toy, R., Hayden, E., Shoup, C., Baskaran, H., Karathanasis, E., 2011. Effect of  
1363 Particle Size, Density and Shape on Margination of Nanoparticles in  
1364 Microcirculation. *Nanotechnology* 22, 115101. [http://doi.org/10.1088/0957-](http://doi.org/10.1088/0957-4484/22/11/115101)  
1365 [4484/22/11/115101](http://doi.org/10.1088/0957-4484/22/11/115101)
- 1366 Tsoli, M., Kuhn, H., Brandau, W., Esche, H., Schmid, G., 2005. Cellular Uptake  
1367 and Toxicity of Au<sub>55</sub> Clusters. *Small* 1, 841–844.  
1368 <https://doi.org/10.1002/sml.200500104>
- 1369 Ulrich, S., Hirsch, C., Diener, L., Wick, P., Rossi, R.M., Bannwarth, M.B., Boesel,  
1370 L.F., 2016. Preparation of ellipsoid-shaped supraparticles with modular  
1371 compositions and investigation of shape-dependent cell-uptake. *RSC Adv.* 6,  
1372 89028–89039. <https://doi.org/10.1039/C6RA19861A>
- 1373 Vácha, R., Martínez-Veracochea, F.J., Frenkel, D., 2011. Receptor-Mediated

- 1374 Endocytosis of Nanoparticles of Various Shapes. *Nano Lett.* 11, 5391–5395.  
1375 <https://doi.org/10.1021/nl2030213>
- 1376 Verma, A., Stellacci, F., 2010. Effect of surface properties on nanoparticle-cell  
1377 interactions. *Small.* 6, 12-21. <https://doi.org/10.1002/sml.200901158>
- 1378 Walker, D.A., Leitsch, E.K., Nap, R.J., Szleifer, I., Grzybowski, B.A., 2013.  
1379 Geometric curvature controls the chemical patchiness and self-assembly of  
1380 nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* 8, 676.  
1381 <http://doi.org/10.1038/nnano.2013.158>
- 1382 Walkey, C.D., Olsen, J.B., Song, F., Liu, R., Guo, H., Olsen, D.W.H., Cohen, Y.,  
1383 Emili, A., Chan, W.C.W., 2014. Protein corona fingerprinting predicts the  
1384 cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano* 8, 2439–2455.  
1385 <https://doi.org/10.1021/nn406018q>
- 1386 Wang, D., Nap, R.J., Lagzi, I., Kowalczyk, B., Han, S., Grzybowski, B.A., Szleifer,  
1387 I., 2011. How and Why Nanoparticle's Curvature Regulates the Apparent pKa  
1388 of the Coating Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 2192–2197.  
1389 <https://doi.org/10.1021/ja108154a>
- 1390 Wang, J., Tian, L., Chen, N., Ramakrishna, S., Mo, X., 2018. The cellular response  
1391 of nerve cells on poly-l-lysine coated PLGA-MWCNTs aligned nanofibers  
1392 under electrical stimulation. *Mater. Sci. Eng. C* 91, 715–726.  
1393 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.06.025>
- 1394 Wang, T., Bai, J., Jiang, X., Nienhaus, G.U., 2012. Cellular uptake of nanoparticles  
1395 by membrane penetration: A study combining confocal microscopy with FTIR  
1396 spectroelectrochemistry. *ACS Nano* 6, 1251–1259.  
1397 <https://doi.org/10.1021/nn203892h>
- 1398 Wang, T., Wang, Lu, Li, X., Hu, X., Han, Y., Luo, Y., Wang, Z., Li, Q., Aldalbahi, A.,  
1399 Wang, Lihua, Song, S., Fan, C., Zhao, Y., Wang, M., Chen, N., 2017. Size-  
1400 Dependent Regulation of Intracellular Trafficking of Polystyrene Nanoparticle-  
1401 Based Drug-Delivery Systems. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 18619–18625.  
1402 <https://doi.org/10.1021/acsami.7b05383>
- 1403 Wang, X., Hu, X., Li, J., Russe, A.C.M., Kawazoe, N., Yang, Y., Chen, G., 2016.  
1404 Influence of cell size on cellular uptake of gold nanoparticles. *Biomater. Sci.* 4,  
1405 970–978. <https://doi.org/10.1039/C6BM00171H>
- 1406 Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J.N., Bacri, J.C., Gazeau, F., 2003.  
1407 Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function  
1408 of their surface coating. *Biomaterials* 24, 1001–1011.  
1409 [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00440-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00440-4)
- 1410 Woźniak, A., Małankowska, A., Nowaczyk, G., Grześkowiak, B.F., Tuśnio, K.,  
1411 Słomski, R., Zaleska-Medynska, A., Jurga, S., 2017. Size and shape-  
1412 dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications.

1413 J. Mater. Sci. Mater. Med. 28, 92. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5902-y>

1414 Yameen, B., Choi, W. Il, Vilos, C., Swami, A., Shi, J., Farokhzad, O.C., 2014.  
1415 Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J. Control.*  
1416 *Release* 190, 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.038>

1417 Yang, K., Ma, Y.-Q., 2010. Computer simulation of the translocation of  
1418 nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nat. Nanotechnol.* 5,  
1419 579-583. <http://doi.org/10.1038/nnano.2010.141>

1420 Yuan, H., Zhang, S., 2010. Effects of particle size and ligand density on the  
1421 kinetics of receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.*  
1422 96, 033704-033704-3. <https://doi.org/10.1063/1.3293303>

1423 Yuan, Y., Liu, C., Qian, J., Wang, J., Zhang, Y., 2010. Size-mediated cytotoxicity  
1424 and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2  
1425 cells. *Biomaterials* 31, 730–740.  
1426 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.088>

1427 Yue, Z.G., Wei, W., Lv, P.P., Yue, H., Wang, L.Y., Su, Z.G., Ma, G.H., 2011.  
1428 Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-  
1429 based nanoparticles. *Biomacromolecules* 12, 2440–2446.  
1430 <https://doi.org/10.1021/bm101482r>

1431 Zapór, L., 2016. Effects of silver nanoparticles of different sizes on cytotoxicity and  
1432 oxygen metabolism disorders in both reproductive and respiratory system  
1433 cells. *Arch. Environ. Prot.* 42, 32–47. <https://doi.org/10.1515/aep-2016-0038>

1434 Zhang, B., Sai Lung, P., Zhao, S., Chu, Z., Chrzanowski, W., Li, Q., 2017. Shape  
1435 dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Sci. Rep.*  
1436 7, 7315. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07588-9>

1437 Zhang, H., Wu, T., Yu, W., Ruan, S., He, Q., Gao, H., 2018. Ligand Size and  
1438 Conformation Affect the Behavior of Nanoparticles Coated with in Vitro and in  
1439 Vivo Protein Corona. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 9094–9103.  
1440 <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16096>

1441 Zhang, J., Liu, H., Wang, Z., Ming, N., 2007. Shape-Selective Synthesis of Gold  
1442 Nanoparticles with Controlled Sizes, Shapes, and Plasmon Resonances. *Adv.*  
1443 *Funct. Mater.* 17, 3295–3303. <https://doi.org/10.1002/adfm.200700497>

1444 Zhang, P., Xia, J., Luo, S., 2018. Generation of Well-Defined Micro/Nanoparticles  
1445 via Advanced Manufacturing Techniques for Therapeutic Delivery. *Mater.*  
1446 (Basel). 11, E623. <https://doi.org/10.3390/ma11040623>

1447 Zhang, S., Gao, H., Bao, G., 2015. Physical Principles of Nanoparticle Cellular  
1448 Endocytosis. *ACS Nano* 9, 8655–8671.  
1449 <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b03184>

1450



# Submission Confirmation



Thank you for your submission

**Submitted to** Nanotechnology

**Manuscript ID** NANO-122048

**Title** Understanding cellular interactions with nanomaterials: Towards a rational design of medical nanodevices

**Authors** Villanueva-Flores, Francisca  
Castro-Lugo, Andres  
Ramirez, Octavio  
Palomares, Laura

**Date Submitted** 14-May-2019



---

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2019. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

**From:** Nanotechnology onbehalfof@manuscriptcentral.com  
**Subject:** Your submission to Nanotechnology: NANO-122048  
**Date:** May14, 2019 at 09:04  
**To:** fran@ibt.unam.mx, castroa@ibt.unam.mx, tonatiuh@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx



Dear Professor Palomares,

Re: "Understanding cellular interactions with nanomaterials: Towards a rational design of medical nanodevices" by Villanueva-Flores, Francisca; Castro-Lugo, Andres; Ramirez, Octavio; Palomares, Laura  
Article reference: NANO-122048

Thank you for submitting your Topical Review, which will be considered for publication in Nanotechnology. The reference number for your article is NANO-122048. Please quote this number in all future correspondence regarding this manuscript.

As the submitting author, you can follow the progress of your article by checking your Author Centre after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/nano-iop> Once you are signed in you will be able to track the progress of your article, read the referee reports and send us your electronic files.

This journal makes manuscripts available to readers on the journal website within 24 hours of acceptance. Please be aware that if you did not tick the relevant opt-out box on the submission form, the accepted version of your manuscript will be visible on the journal's website before it is proof-read and formatted to our house style.

If you are planning any press activity for your article, or are currently engaging in an IP or patent application, you may wish to opt-out of making your accepted manuscript immediately available online. If you do not wish to make the accepted version of your manuscript immediately visible to readers, and have not ticked the opt-out box during submission, please let us know as soon as possible.

Please do not hesitate to contact us if we can be of assistance to you.

Yours sincerely

On behalf of the IOP peer review team:

Editor: Philip Semple

Associate Editors: Tom Farrell, Miriam Howland, Georgia Longstaff, Lucy Evans and Antonia Pingree

Editorial Assistants: Abbie Tozer, Marshall Ingham, Alex Gravells and Jo Bewley

Production Editors: Samuel Turner and Andrew Rego

Want to find out what is happening to your submission right now? Track your article here:

[https://publishingsupport.iopscience.iop.org/track-my-article/?utm\\_source=Track%20my%20article&utm\\_medium=Email](https://publishingsupport.iopscience.iop.org/track-my-article/?utm_source=Track%20my%20article&utm_medium=Email)

[nano@iop.org](mailto:nano@iop.org)

Editor-in-Chief: Professor R LaPierre

Publisher: Freddy White

IOP Publishing

Temple Circus, Temple Way, Bristol

BS1 6HG, UK

[www.iopscience.org/nano](http://www.iopscience.org/nano)

2017 Impact Factor: 3.404

Letter reference: SAu05



# *Anexo 3*

# 1 Low-cost Poly(vinyl formal) for Heavy Removal in a Polluted Mexican River

2  
3 Francisca Villanueva-Flores<sup>1</sup>, Octavio T. Ramírez<sup>1</sup>, and Laura A. Palomares<sup>1\*</sup>

4  
5 1. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ave.  
6 Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México. 62210.

7 \* To whom all correspondence should be addressed. Tel: +52 777 3291646. E-  
8 mail: [laura@ibt.unam.mx](mailto:laura@ibt.unam.mx).

## 9 10 11 **Abstract**

12  
13 Heavy metal pollution in drinking and ground water represents serious risks on the  
14 public health. This problem is more serious in developing countries due to the high  
15 costs of water purification. The Atoyac river is located in the Metropolitan area of  
16 Puebla, Mexico and it has been widely reported as a dangerous pollution focus. At  
17 this time no concrete solutions have been proposed. One alternative is the use of  
18 Polymer enhanced ultrafiltration (PEUF) which has become a promising alternative  
19 to remove (and to recover) heavy metals from wastewater. In this work,  
20 membranes of poly(vinyl formal) (PFA) as result of the condensation between  
21 poly(vinyl alcohol) (PVA) with different content of formaldehyde (FA) and  
22 hydrochloric acid (HCl) as catalyst have been synthesized. Mass transport  
23 phenomena (absorption, permeation and desorption) of PFA membranes were  
24 characterized as function of the FA or HCl content, pH, temperature and pressure.  
25 High water absorption is needed for PEUF applications. The maximum water  
26 absorption of PFA was found at 1% HCl and 20% FA which reached a water  
27 content of 75% and a maximum swelling degree of 325%. pH had no effect in the  
28 PFA swelling dynamics which suggest an advantage of PFA under rough acidic  
29 environmental conditions where a consistent performance of the polymer is  
30 required for wastewaters treatment. Otherwise, water permeation was inversely  
31 proportional to the HCl or FA content and directly proportional to an applied  
32 pressure. Regarding desorption, on one hand at higher HCl content desorption rate  
33 of a model molecule (heparin) were lower, but at higher FA content, it increased.  
34 Mechanism of diffusion was also analyzed. We found that at lower HCl and all FA  
35 content tested, heparin was released according to a non-Fickian (anomalous)  
36 diffusion but at 30 to 40% HCl the mechanism diffusion followed a Super Case II.  
37 Also, PFA mechanical properties were analyzed as function of the HCl content. We  
38 showed that an increase of HCl trigger an increase of tensile strength, strain stress  
39 and Young's modulus and a decrease of the elastic deformation.  
40 In this work, it was demonstrated that PFA adsorbs heavy metals with an efficiency  
41 inversely proportional to the HCl content in a range of 1 to 5% V/V with high  
42 adsorption capacities ( $Q_e$ ) even in the presence of multiple metals simultaneously.  
43 PFA at 1% HCl and 20% FA showed a high efficiency for heavy metal removal  
44 even in complex real-life water samples from the polluted Mexican river "Atoyac" as  
45 model without any previous treatment. It worth highlight that one single step of  
46 purification with PFA membranes was enough to reduce Pb, Fe and Mn until  
47 acceptable levels for drinking water according to the Mexican standards. Even As

48 and TI levels were reduced under the limit of detection of the inductively coupled  
49 plasma mass spectrometry (ICP-MS).

50 Taking together, because of the PFA properties as its chemical stability, safety,  
51 simple synthesis and handling and low-cost production, PFA membranes are  
52 proposed as a material for heavy metal removal in real-life samples of polluted  
53 waters.

54

55 **Key words:** Heavy metal removal, poly(vinyl formal), waste water treatment,  
56 ground water remediation, adsorption.

57

58

## 59 **Introduction**

60

61 After the industrial revolution, demand and the consequent emission of metals to  
62 the environment skyrocketed (Bussey 1996). Heavy metals accumulate in living  
63 organisms and persist in the environment due to their recalcitrant properties and  
64 non-biodegradability (Fu and Wang 2011). Principal hazardous elements  
65 commonly found in ground waters are arsenic (As), lead (Pb), thallium (TI), Copper  
66 (Cu), among others. Then two examples regarding As and Pb exposure in Mexican  
67 population are discussed below.

68 On the one hand, As exposure is associated with the development of skin cancer,  
69 spontaneous abortions, DNA damage, gastrointestinal problems, vascular  
70 diseases, cognitive impairment, among others. Long-term exposure to As, mainly  
71 through drinking-water and food, can lead to chronic arsenic poisoning, skin  
72 lesions and skin cancer (Centeno et al. 2002, Smeester and Fry 2018). In Mexico,  
73 several aquifers and adjacent soils with high concentrations of As have been  
74 reported (Razo Soto et al. 2004, Wyatt J. et al. 1998, Piñón-Miramontes, M., et al.  
75 2003, Hurtado-Jiménez and Gardea-Torresdey 2006, Armienta and Segovia 2008).  
76 These levels have shown a significative impact on the Mexican children health.  
77 García-Rico et al. (2019) have analyzed urine samples of 306 children from 13  
78 villages living in the most important agricultural areas in the Yaqui and Mayo  
79 valleys in Sonora, Mexico. Their results showed that drinking water exhibit As  
80 concentrations between 2.7 and 98.7 µg/L, and the average of As excreted in urine  
81 was 31.7 µg/L. These hazardous As concentrations increase the risk of developing  
82 chronic diseases exposure (García-Rico et al. 2019).

83 On the other hand, Pb is a heavy metal which human exposure has been  
84 associated with anemia, hypertension, kidney dysfunction, immunotoxicity and  
85 central nervous system alterations, especially in children. In Mexico, blood Pb  
86 levels of children as function of the distance from their school to a local foundry  
87 have been studied. It was found that the percentage of children with blood lead  
88 values that exceed the 15 µg/dL was 92%, 84.9% and 6.8%, correlating with a  
89 greater distance from their school to the foundry. This could impact on the  
90 Intellectual Coefficient (IQ) of children according to Schwartz 1994 who  
91 demonstrated that blood levels of lead between 10 to 20 µg/dL are associated with  
92 a decrement of 2.6 points of IQ. In other work, it has been found that values of lead  
93 in blood of adults from Coahuila are around 9.3 µg/dL, the value been associated  
94 with a decrement in sperm quality and an increment of alterations in chromatin

95 found in this population, which could lead to reproductive alterations or cancer  
96 predisposition (Garcia-Vargas et al. 2001, Hernández-Ochoa I., et al 2005).  
97 The major way of heavy metals poisoning is through drinking water. Heavy metals  
98 are incorporated to the food chain through leaching from the soil to the water tables  
99 which are then used to irrigate crops and feed the cattle (Hejna et al. 2018). In  
100 Mexico, groundwater supplies 75% of the drinking water. Several studies have  
101 shown that diverse Mexican aquifers and adjacent soils contains high  
102 concentrations of heavy metals (Armienta and Segovia 2008, Romieu et al. 1995,  
103 Sargent, Dalton, and Roda 1999).

104 Conventional procedures for removing heavy metals from wastewater are  
105 flocculation, adsorption, ion exchange, electrochemical deposition and  
106 precipitation, the latter being the most commonly used (Demirbas 2008). Heavy  
107 metal precipitation is one of the most applied methods to treat waste waters, but it  
108 is only effective for metal concentrations around 1000 mg/L (Kurniawan et al.  
109 2006). Otherwise, another disadvantages of the precipitation method are the  
110 production of sludges, the low precipitation rates, poor sedimentation, aggregation  
111 of metallic sediments which in the long-term have tremendous environmental  
112 impact (Stover et al. 1976).

113 Another effective methodology for heavy metals removal is the ion exchange  
114 (Dąbrowski et al. 2004). This methodology consists in that an electrically charged  
115 solid which interacts with the surrounding metal cations in the water and adsorb  
116 them by electric interactions selectively or non-selectively (Hegazi 2013). In this  
117 context, synthetic negative charged polymers seem as promising candidates for  
118 water treatment through an ion exchange mechanism. Unlike other materials,  
119 synthetic polymers have many advantages as their low cost, tunable  
120 physicochemical properties, great absorptive capacity and good mechanical  
121 properties. These advantageous properties have led to the development of a new  
122 technique called "polymer-enhanced ultrafiltration" (PEUF) (Crini et al. 2017).  
123 Nowadays PEUF has become a promising alternative to remove and recover  
124 heavy metals from wastewaters, which are generally found in real-life at low  
125 concentrations and precipitation of heavy metals is non-viable (Geckeler and  
126 Volchek 1996, Crini et al. 2017). Even PEUF have demonstrated be effective to  
127 remove radioactive toxic waste (Kulyukhin et al. 2014, Norton, DiGiano, and Hallen  
128 1997).

129 PVA is an attractive material for the development of new membranes for PEUF. Its  
130 promising characteristics include biodegradability, hydrophilicity, thermal  
131 resistance, stability to different solvents and pH conditions, high antifouling  
132 potential and high water permeability (Bolto et al. 2009). However, PVA is a water-  
133 soluble substance so it requires become insoluble by crosslinking to make it  
134 suitable for water treatment strategies. Many methods have been reported to  
135 crosslink PVA. In this work we chose a chemical crosslinking of PVA using FA and  
136 HCl to obtain PFA, due its high water permeability, tolerance to high pressures of  
137 work in desalinization assays by reverse osmosis and its high stability in acid and  
138 alkaline conditions as it has been previously reported (Sanderson et al. 1993,  
139 Işıklan and Şanlı 2005, Chen et al. 1973). Based on these works, we hypothesized  
140 PFA can be an interesting candidate for water treatment. Moreover, derived of the  
141 understanding of the most probable reaction mechanism which occurs when a pair

142 of electrons of the hydroxyl group of PVA attacks to the formaldehyde carbocation  
143 (favored at low pH) by a nucleophilic addition to form a hemiacetal. Then, the  
144 hemiacetal loses a molecule of water and a new hydroxyl of the alcohol is then  
145 added to form an acetal. This mechanism is followed consecutively until to obtain  
146 the final polymerization product. Derived from an incomplete polymerization, we  
147 also hypothesized that there is a synthesis condition in which PVA get crosslinked,  
148 loses solubility but the matrix formed still contains some hydroxyl and aldehyde  
149 free groups which could act as ionic exchanger for heavy metals cations in polluted  
150 waters.

151 Otherwise, it has been widely studied that mechanical properties, water uptake and  
152 transport phenomena through polymeric systems depend of their crosslinking  
153 degrees (Krumova et al. 2000, Nielsen 1969). So, the challenge is to find a  
154 crosslinking condition for the optimum ionic exchange but maintaining adequate  
155 physical properties of the polymer to make it suitable for real-life applications under  
156 environmental conditions.

157 In this work we characterized the mass transport phenomena (absorption,  
158 permeation and desorption), mechanical properties and heavy metal removal  
159 capacity of PFA at different FA (crosslinker) or HCl (catalyst) content.

160 There is extensive literature about different polymers used for heavy metal removal  
161 in laboratory under laboratory conditions, but just few works have tested real-life  
162 samples. Unlike laboratory-made solutions, real-life samples from polluted water  
163 are more complex containing a wide variety of ions, inorganic and organic  
164 substances, microorganisms, etc, which together could affect the polymeric  
165 membranes performance. Therefore, we decided to test the capability of PFA  
166 membranes for heavy metal removal in real-life samples from the polluted Mexican  
167 river "Atoyac". Atoyac River is a Mexican river located in the middle of Mexico  
168 (parallels 19° 06' and 19° 40' north latitude and meridians 97° 58' and 98° 031'  
169 west longitude) in the Metropolitan area between Puebla and Tlaxcala. This region  
170 was selected because it receives multiple discharges of wastewater from urban,  
171 agricultural and industrial sources. Recently, alarming levels of contamination of  
172 this river have been reported, and the danger to human health and ecotoxicological  
173 impact on aquatic and terrestrial organisms has been documented in local  
174 communication media. Atoyac river is considered a source of infection for  
175 neighboring populations which had associated to cases of hepatitis, cancer and  
176 cholera (Damián-Jiménez, 2010). Now, no concrete solutions have been proposed.  
177 So, in this work the feasibility and limitations to use PFA in a PEUF process for  
178 heavy metal removal are discussed.

179

## 180 **Materials and methods**

181

### 182 **PVA membranes synthesis**

183

184 PVA (Aldrich, 11773 Mowiol® 20-98, Mw 125,000) was dissolved in deionized  
185 water at 10% w/v in a water bath at 80° C with magnetic stirring. This solution was  
186 mixed with different amounts of FA (Sigma, 252549) and HCl (Sigma, 320331).  
187 The reaction was carried out for 36 h at 25° C followed by a subsequent thermal  
188 treatment for 6 h at 45° C.



189

## 190 **Characterization of PFA**

191

### 192 **FTIR**

193

194 Thin films of PFA were synthesized in 24 flat well plates (Costar®, 2548). 0.1 mL of  
195 PVA 10% v/v were added to different ratios of FA (Sigma, 252549) and HCl  
196 (Sigma, 320331). The mix was incubated for 36 h at 25° C followed by a  
197 subsequent thermal treatment for 6 h at 45° C. Films were dried in a desiccator in  
198 presence of MgSO<sub>4</sub> (Merck, 106067) for 7 days or until the dry weight remained  
199 constant. Fourier-transform infrared (FTIR) spectra were obtained in a range of 400  
200 to 4000 cm<sup>-1</sup>, using a Perkin-Elmer Spectrum GX spectrometer in in attenuated  
201 total reflectance mode (ATR).

202

203

### 204 **Scanning electron microscopy (SEM)**

205

206 PFA films were dried in a desiccator in presence of MgSO<sub>4</sub> (Merck, 106067) until  
207 the dry weight remained constant. Dried films were coated with carbon. SEM  
208 (scanning electron microscopy) images were obtained with a JSM 5600-LV  
209 microscope.

210

211

## 212 **Mass transport phenomena**

213

### 214 **Absorption: Water content**

215

216 PFA films were dried in a desiccator in presence of MgSO<sub>4</sub> (Merck, 106067) for 7  
217 days or until the dry weight remained constant. Fully dehydrated PFA films were  
218 weighed and then placed in doubly deionized water until the weight of the hydrated  
219 polymer remained constant. Water content at equilibrium was estimated using Eq.  
220 1 (Fumio U., et al. 1990).

221

222 **Water content** (%) =  $\left(\frac{W_d}{W_h}\right) * 100$  Eq. 1.

223

224 Where  $W_d$  is the weight of the water in the dehydrated polymer and  $W_h$  is the  
225 weight of the water in the hydrated polymer.

226

### 227 **Swelling degree**

228

229 Completely dry and pre-weighed PFA disc-shaped films were placed in 5 mL of  
230 deionized water. At time intervals, polymer discs were removed from water and  
231 weighed after blotting with a filter paper to remove unabsorbed liquid. Data  
232 presented are the mean values of 3 independent samples. Swelling degrees ( $D_s$ )  
233 (%) were calculated using Eq. 2, as reported by Boruah et al. 2015.

234  $Ds (\%) = \left( \frac{W_h - W_d}{W_d} \right) \times 100$  (Eq. 2)

235 where  $W_h$  and  $W_d$  are the weights of hydrated and dehydrated polymers,  
236 respectively. Data presented are the mean values of four independent samples.

237

238

### 239 **Permeation: molecular diffusion**

240

241 PFA membranes of 1.0 mm of thickness were placed in a stirred ultrafiltration cell  
242 (Amicon Millipore, Cat. 5121, Model 8010) filled with 10 mL of deionized water. The  
243 applied pressure was controlled with a manometer (Silverline, DC-A2020R). Water  
244 flux by measuring the volume of water eluted over time.

245

246

### 247 **Molecular Desorption**

248

249 400  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of heparin were immobilized in PFA membranes as was described by  
250 Li et al. 2005. Afterwards, PFA membranes were washed three times with  
251 deionized water to discard un-adsorbed heparin. Then, 200  $\mu\text{L}$  of deionized water  
252 were added and heparin release kinetics were followed by measuring heparin  
253 released by the toluidine blue method described by Kang et al. 1996 in a  
254 microplate reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, USA). Desorption of PFA  
255 membranes at different HCl and FA content, and temperature were evaluated.

256

257

### 258 **Mechanical properties**

259

260 The tensile strength, Young's modulus, yield stress and elastic deformation were  
261 determined by uniaxial compression of the hydrated PAcVA network at 24° C and  
262 65% of relative humidity with a mechanical testing machine (MTS, model Sintech  
263 1/S, USA). A cylindrical flat tip (25 mm diameter) at a constant velocity of 100 mm  
264  $\text{min}^{-1}$  with a cell nominal load of 500 N (353.45 N of effective charge) was used.  
265 Tensile strength was calculated according to the maximum strength in graphs of  
266 strength vs time. Young's modulus was calculated from the slopes of the strain ( $\sigma$ )  
267 vs deformation ( $\epsilon$ ) graphs, as follows (Eq. 3 and 4):

268 Young's modulus =  $\frac{\Delta\sigma}{\Delta\epsilon}$  (Eq. 3)

269  $\Delta\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$  (Eq. 4)

270 Where  $\Delta\epsilon$  is the ratio between the change of length ( $\Delta l$ ) over the initial length,  $l_0$ .

271 Yield stress was calculated from the maximum strain in graphs of strain vs  
272 deformation. Elastic deformation was the deformation at the maximum yield strain.

273

### 274 **Metal quantification**

275

276 The adsorption of metals and metalloids in PFA membranes was performed at  
277 room temperature (25° C) in batch experiments. 10 mL of the metallic salt solutions  
278 (25 mM) were filtered through nylon membranes with a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$

279 (Sigma, WHA7404004) and were added to PFA membranes for 24 h. Metallic salt  
280 used were:  $K_2Cr_2O_7$  (Sigma, 209244),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (Sigma, M8054),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$   
281 (J. T. Baker, 1996-01),  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (Mallinckodt, UN2802),  $ZnCl_2$  (Sigma, Z0173).  
282 After 24 interacting metallic salt solutions with PFA membranes, solutions were  
283 collected, acidified with 1%  $HNO_3$  (Sigma, 695025) and analyzed by inductively  
284 coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in a Thermo Scientific iCAP Qc  
285 model spectrometer. In the case of the samples of the Atoyac river, the procedure  
286 was the same. The samples of the Atoyac river were collected in the spring of 2017  
287 when flow is lower. The instrument was optimized prior to the analysis of the  
288 samples, with an aqueous certified solution of the brand High Purity Standards  
289 which contains a wide range of masses (Li, Co, In, Ba, Bi, Ce and U of 1  $\mu g/L$   
290 respectively). For the analysis of metals, a calibration curve was performed with 16  
291 points (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 and 500  $\mu g/L$ ),  
292 from a multi-element mother solution (High-purity standards, QCS-26). The  
293 instrumental drift was corrected with an Indium internal standard (In of 10  $\mu g/L$ ).  
294 Limits of detection were calculated following the Eq. 5.

$$295$$
$$296 \quad L. D. = \frac{3(SD \text{ int } BCO)(conc \text{ STD})}{(int \text{ STD} - prom \text{ int } BCO)} \quad (\text{Eq. 5})$$
$$297$$

298 Where *SD int BCO*: Standard deviation of blank intensity. *conc STD*: Concentrations  
299 of the standard solution. *int STD*: Intensity of the standard solution. *prom int BCO*:  
300 Average of the blank intensity

### 303 **Statistical analysis**

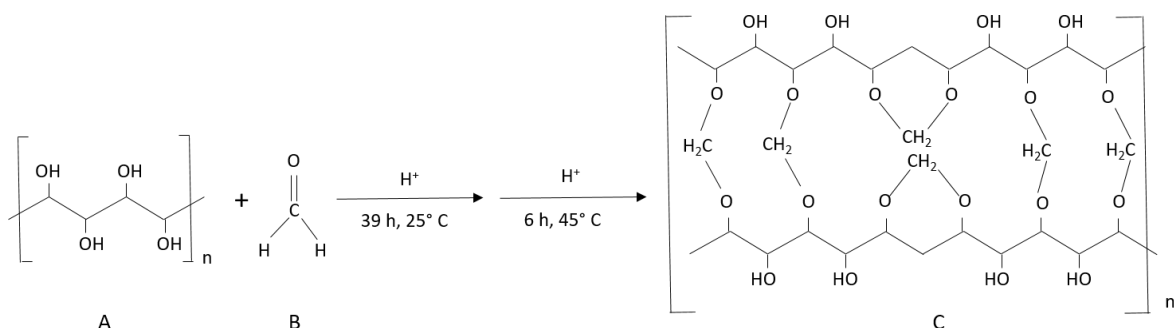
304 All measurements reported are expressed as the average  $\pm$  standard deviation of  
305 at least 3 independent experiments. Statistical significances were calculated by a  
306 two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test.

## 309 **Results**

### 311 **Synthesis and characterization**

312  
313 To synthesize the PFA membranes, PVA was condensed with FA and HCl as  
314 catalyst as previously have been reported by (Ogata, Okano, and Ganke 1956)  
315 (Fig. 1). We speculated that reaction might occurs when an electrons pair of the  
316 hydroxyl group of the alcohol (Fig. 1A) attacks to the formaldehyde (Fig. 1B)  
317 carbocation, which is favored at low pH by a nucleophilic addition to form a  
318 hemiacetal. Then, the hemiacetal loses a molecule of water and a new hydroxyl of  
319 the alcohol is then added to form an acetal. This mechanism is followed  
320 consecutively until to obtain the final polymerization product (Fig. 1C).

321

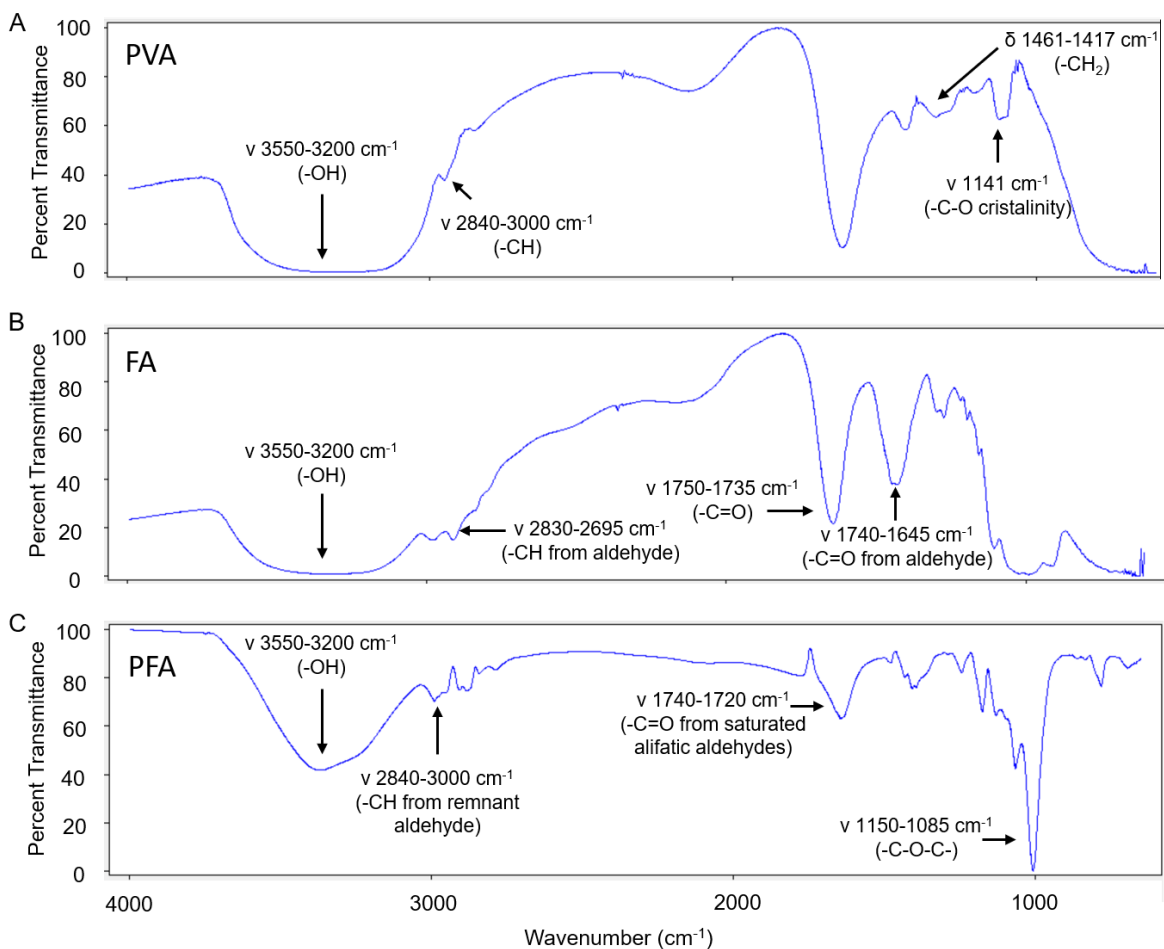


**Fig. 1.** Polymerization reaction between PVA (A) and FA (B) in acid conditions to form the network of cyclic acetals that constitute PFA (C). Temperature and time of reaction are indicated above.

## Structure

### Molecular structure: FTIR spectroscopy

Reactants and polymerization product were analyzed by FTIR. FTIR spectra is shown in Fig. 2 where principal peaks have been highlighted. In Fig. 2A, the spectrum of PVA is shown. We can notice, for example, the wide band between 3350-3200 cm<sup>-1</sup> that represents the stretching vibration of the intramolecular and intermolecular hydroxyl groups (-OH), a peak at 2840-3000 cm<sup>-1</sup> which correspond to the stretching vibration of PVA alkyl groups (-CH), a peak at 1461-1417 cm<sup>-1</sup> which correspond to the bending vibration of PVA methylene groups (-CH<sub>2</sub>) and a peak at 1141 cm<sup>-1</sup> which correspond to -C-O bonds and it indicates the PVA crystallinity. In Fig. 2B, the spectrum of FA is shown. We can also notice, the wide band between 3350-3200 cm<sup>-1</sup> that represents the stretching vibration of the intramolecular and intermolecular hydroxyl groups (-OH) due to remnant water, a doublet at 2830-2695 cm<sup>-1</sup> which correspond to the stretching vibration of alkyl groups from aldehydes (-CH), a peak at 1750-1735 cm<sup>-1</sup> which correspond to the stretching vibration of carbonyl groups and a peak at 1740-1645 cm<sup>-1</sup> which correspond to the stretching vibration of carbonyl groups from aldehydes. Finally, in Fig. 2C, the spectrum of the polymerization product is shown. We can also notice, the wide band between 3350-3200 cm<sup>-1</sup> that represents the stretching vibration of the intramolecular and intermolecular hydroxyl groups (-OH) probably due to remnant water and remnant -OH groups from PVA, a peak at 2830-3000 cm<sup>-1</sup> which correspond to the stretching vibration of -CH groups from remnant aldehyde, a peak at 1740-1720 cm<sup>-1</sup> which correspond to the stretching vibration of -C=O groups from saturated aliphatic aldehydes and a peak at 1150-1085 cm<sup>-1</sup> which correspond to the stretching vibration of acetal bonds (-C-O-C-) stretching vibrations at around 1087 cm<sup>-1</sup>. In this case the peak due to -C-O-C- group is shifted to higher frequencies in the spectrum which indicates the formation of -C-O-C- both acetal and ether bonds (Smith 1995). The obtained spectrum was similar to the reference spectrum reported by Pan et al. 2014 for PFA, indicating that synthesis was successful.

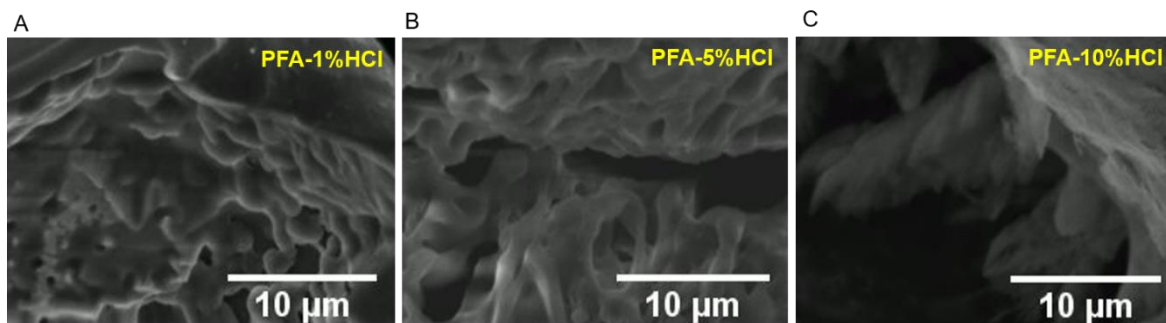


361  
 362  
 363  
 364  
 365  
 366  
 367  
 368  
 369  
 370  
 371  
 372

**Fig. 2.** FTIR analysis of reactants and products of the polymerization reaction between to form PFA. Spectrum of A) PVA. B) FA. C) PFA (79% PVA, 20% FA and 1% HCl V/V). Principal peaks are highlighted in the figure.

### Microscopic structure: SEM

To characterize the microscopic structure of PFA at various HCl (%) content, SEM was used (Fig. 3). The synthesized material resulted in a homogeneous polymeric phase. Cross-sectional views show microporous into the polymeric matrix.



**Fig. 3.** Cross-sectional views of SEM images of PFA membranes at different HCl content A) 1%. B) 5%. C) 10%.

### Mass transport

It has been widely studied that crosslinking degree affects the physicochemical properties of the polymers such as their mechanical properties, water uptake and mass transport phenomena through the matrix (Krumova et al. 2000, Nielsen 1969). Characterizing these parameters are very important for applications, like desalination, drug delivery, heavy metal removal, and all of them where mass transport phenomena are involved.

Mass transport through polymer membranes is usually described in terms of a “solution-diffusion” mechanism. It consists of the following steps: 1) *Absorption* of small molecules into the membrane at the side of higher potential, 2) *Permeation(or molecular diffusion)* in or through the polymer and 3) *Desorption* of the diffused molecules from the solution at the opposite side into the phase at lower potential (Flory 1985). In this work we characterized these steps for PFA membranes as we it will be described next.

### Absorption

To evaluate the polymers capacity of the polymers to absorb small molecules, typically swelling properties and water content are studied. In this case we analyzed water absorption as function of the amount of crosslinker added: HCl or FA and also, varying pH at a specific crosslinking degree (Fig. 4).

According to our results, no significative difference of the water content for PFA membranes at 1 to 20% of HCl was observed, but at higher HCl contents water content decreased. Swelling degree was not affected at 1 to 10% of HCl, but at higher HCl contents it decreased (Fig. 4A). Likewise, the percent of water content for PFA at different amount of FA added was similar at 5 to 40% of FA, but at higher FA contents water content decreased (Fig. 4B).

The crosslinking degree influences many of the polymer network properties including swelling (Fumio et al. 1990, Gohil, Bhattacharya, and Ray 2006). So, the influence of HCl and FA content in the maximum swelling of PFA membranes was studied. According to our results, PFA showed a very high swelling, because of the presence of hydrophilic groups such as hydroxyls from PVA or remnant aldehydes

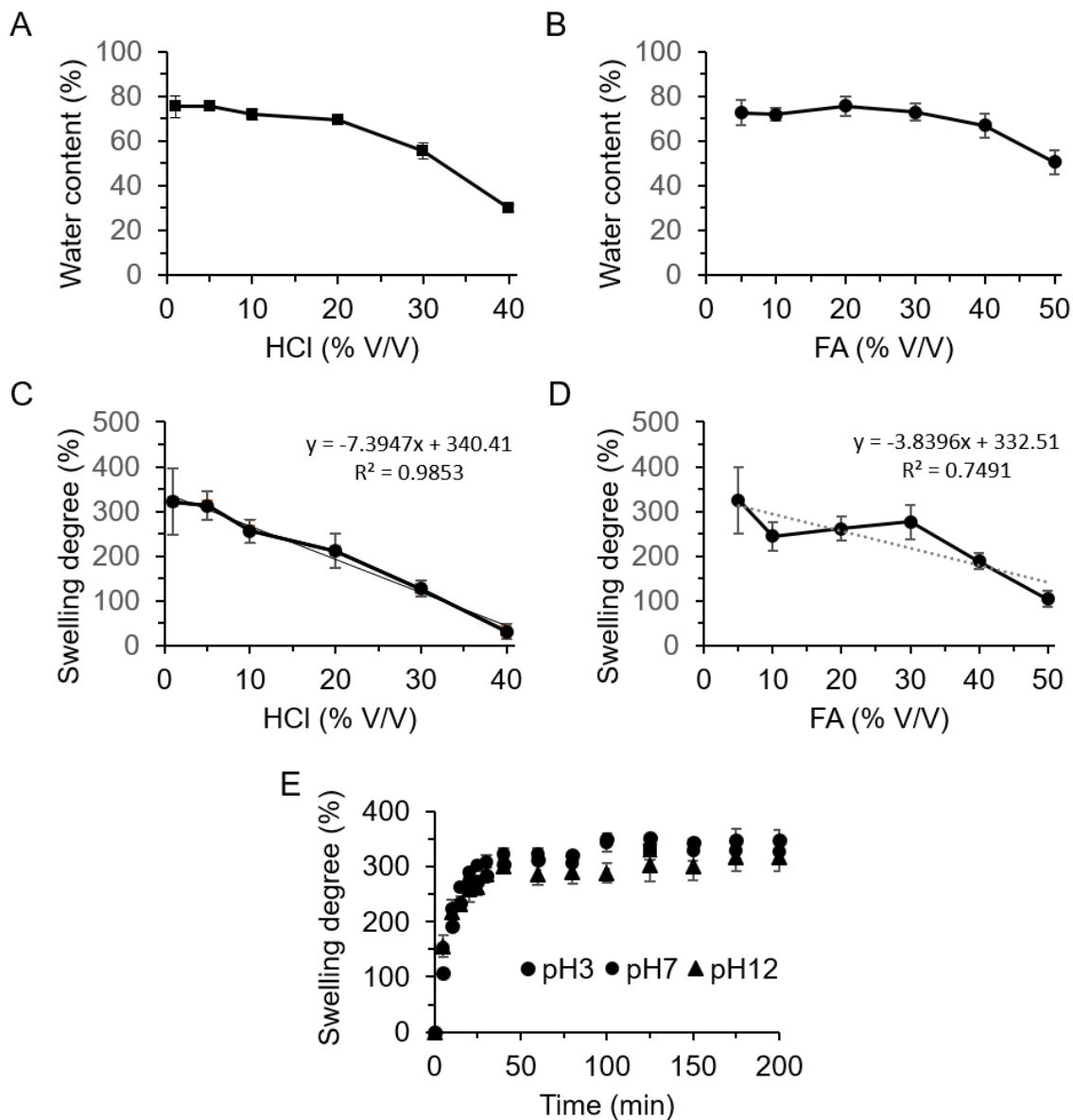
412 groups from an incomplete polymerization which facilitates the water uptake into the  
413 PFA network. Thus, as the amount of crosslinking increased (HCl or FA content)  
414 the maximum swelling reached decreased, because of more hydrophobic acetals  
415 groups in the network are formed (Figs. 4C-D). It worth highlight that the amount of  
416 HCl added affected the PFA maximum swelling linearly (Fig. 4C); unlike FA with  
417 which no differences were observed with 5 to 30% added and had no linear  
418 relation (Fig. 4D). These results can be explained because an excess of non-  
419 polymerized FA could trigger the “screening effect”, as it was reported by  
420 Muthukumar and Edwards 1982.

421 Otherwise, we evaluated the influence of pH in the PFA swelling dynamics. The  
422 obtained results for PFA (1%HCl and 20%FA) are shown in Fig. 4E where no  
423 significant differences were found at pH3, pH7 either pH12. Similar results were  
424 obtained for other PFA crosslinking degrees (data not shown).

425 Polymeric structures with hydrophilic groups are susceptible to be protonated and  
426 deprotonated depending on the acidity of the surrounded media which might  
427 induce some movement of the polymer network due to the attraction or repulsion  
428 between polymeric chains and ultimately affecting the network swelling dynamics.  
429 On one hand, PFA contains multiple hydroxyl groups ( $pK_a \approx 17$ ) which can suffer  
430 protonation-deprotonation in acid or alkaline conditions, respectively. On the other  
431 hand, the process of chemical crosslinking and the consequent cyclic acetal  
432 formation increase the rigidity of the polymer chains what restricts its movement  
433 (Fig. 7C), which explain why we did not observe changes in the swelling dynamic  
434 of PFA at different pH conditions.

435 The independence of pH and the swelling dynamics of PFA membranes because,  
436 commonly ground waters could show pH variations. For example, acid rain  
437 averages about pH 4, but values between pH 2.1 and 5 have been reported,  
438 whereas that the occurrence of  $Ca(OH)_2$  and  $Mg(OH)_2$  deposits have been  
439 associated with hyperalkaline groundwater (Neal and Stanger 1984, Likens and  
440 Bormann 1974). Then, it is necessary polymers intended to water remediation  
441 have good chemical stability keeping a consistent mass transport independently of  
442 the media pH. Our results demonstrated that PFA membranes have a consistent  
443 swelling (water uptake) in a wide range of pH, making them a good candidate  
444 material to be applied at rough environmental conditions.

445



446  
 447 **Fig. 4.** Percent of water content and swelling degree of PFA membranes. Water  
 448 content of PFA membranes as function of A) HCl (% V/V) and B) FA (% V/V)  
 449 added. Swelling degree of PFA membranes as function of C) HCl (% V/V) and D)  
 450 FA (% V/V) added. Graphics C and D shows a linear data fit and the corresponding  
 451 correlation coefficient. Swelling dynamic of PFA (1% HCl, 20% FA) at different pH.  
 452 Mean and standard deviations between four independent experiments are shown.  
 453 Error bars indicate the standard deviation between experiments. Some bars are  
 454 smaller than the symbols shown.  
 455

456  
 457 **Permeation**

458  
 459 To evaluate the molecular diffusion through PFA membranes, permeation of a  
 460 water flux as function of the amount of crosslinker added: HCl or FA and an applied

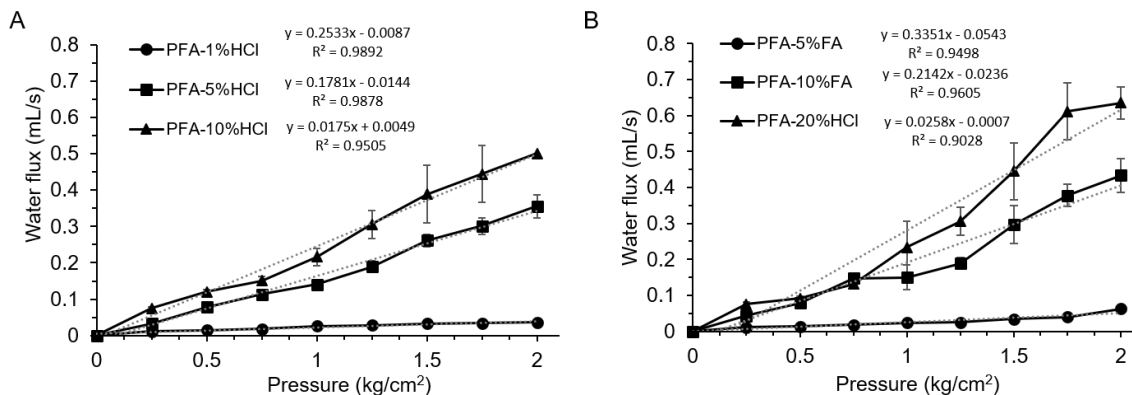


461 pressure was studied. The obtained results are shown in Fig. 5. At higher pressure  
462 applied, water flux increased linearly, independently of the amount HCl or FA  
463 added (Fig. 5). Unexpectedly, at higher HCl (Fig. 5A) or FA (Fig. 5B) content, PFA  
464 membranes were more permeable at similar levels. These results, contradictory to  
465 our intuition, could be attributed to the spatial structural heterogeneity in the  
466 polymer networks formed during the crosslinking as was previously described  
467 (Tokita and Tanaka 1991a, Tokita and Tanaka 1991b, Weiss and Silberberg 1977).  
468 Polymer heterogeneity causes both “dilute” domains (free-draining space and  
469 dense domains) and “dense” domains (non-draining space). Both domains results  
470 in higher or lower permeable regions, respectively (Tanaka, Hocker, and Benedek  
471 1973). In our conditions (1, 5 and 10% of HCl and 5, 10 and 20% of FA), PVA is  
472 the reagent in excess, thus all the crosslinker added is reacting with PVA which  
473 cause that the number of free polymer coils increased. Such free polymer coils will  
474 preferentially fill the dilute domains into the matrix, reducing the spaces through  
475 water may flow which results in a lower permeability (Grattoni et al. 2001).  
476 Moreover, it has been demonstrated that compression processes created by the  
477 water flow is close related to the elasticity of the polymer. According to our results,  
478 the lowest permeability was observed in PFA membranes at 1% HCl which also  
479 possess the higher elastic deformation (Fig. 7C). The compression caused for  
480 applied pressure, decreased the effective size of the pathways through the PFA  
481 dilute domains, and therefore the water permeability through the polymeric matrix  
482 also decreased.

483 In a previous work, Chen et. al synthesized PFA membranes at 200° C for 10 min.  
484 The resulting membranes exhibited poor water adsorption and low permeability  
485 (Chen et al. 1973). Unlike Chen et al. in this work, milder conditions of synthesis  
486 were used (36 h at room temperature and 6 h at 45° C) and the polymer obtained  
487 showed excellent swelling, absorption and permeation properties needed for an  
488 effective ionic exchange. In addition, the lower temperature of synthesis, reduced  
489 the semi crystalline regions into the matrix increasing diffusion capacity, swelling  
490 degree and water content (Harland and Peppas 1989, G. Wypych 2015).

491 In real-life PEUF processes, it is important that polymers have a good permeability  
492 and resistance to an applied pressure to allow an acceptable water work flow. In  
493 this work, synthesis temperature enhanced the PFA absorption and permeation  
494 properties. Our results show a first approach for real-life applications of PFA  
495 membranes which can tolerate a range of pressure to allow a water flux, which  
496 also can be easily modulated by varying the amount of crosslinking added with *à la*  
497 *carte* properties.

498



499 **Fig. 5.** Water flux through PFA membranes as function of an applied pressure and  
 500 A) %HCl (V/V) or B) %FA (V/V) added. Mean, and a fit to a linear model and  
 501 standard deviations between three independent experiments are shown. A linear  
 502 data fit and the corresponding correlation coefficient are also shown. Error bars  
 503 indicate the standard deviation between experiments. Some bars are smaller than  
 504 the symbols shown.

505  
 506  
 507

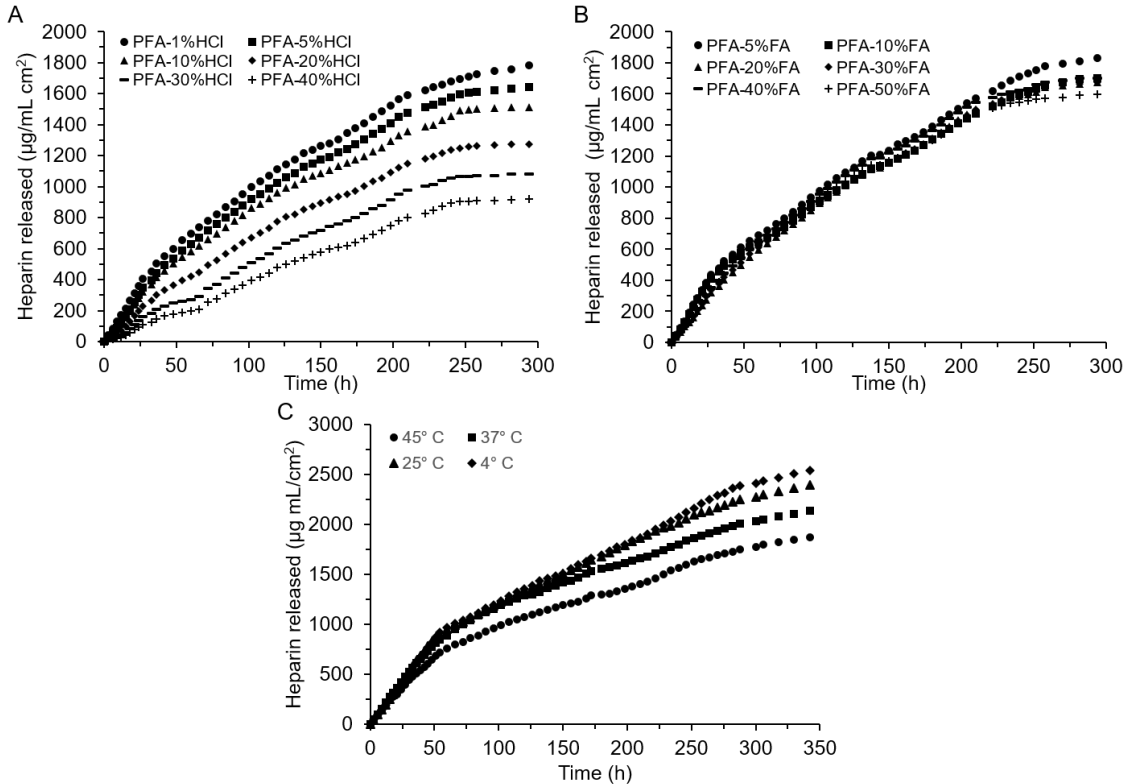
## 508 Desorption

509

510 To evaluate the PFA desorption, the release of a model molecule (heparin) from  
 511 PFA membranes as function of the amount of HCl or FA was studied. We chose  
 512 heparin based on a previous report by Li et al. (2005) who described that it was  
 513 possible to immobilize heparin in a similar polymer made of PVA and polypyrrole (Li  
 514 Y. et al. 2005) and because heparin is also a negatively charged-molecule as PFA,  
 515 avoiding possible electrostatic interactions which could interfere with the diffusion  
 516 process. At higher HCl content, heparin was poorly released (Fig. 6A). In contrast,  
 517 FA content had no effect in the heparin release (Fig. 6B).

518 In addition, the influence of the temperature in the PFA diffusion properties to  
 519 characterize possible PFA desorption phenomena in an environmental-like range  
 520 of temperatures. Interestingly, we found that heparin release was inversely  
 521 proportional to temperature (Fig 6C).

522  
 523



524 **Fig. 6.** Kinetics of heparin released from PFA membranes as function of the A) HCl  
 525 (%V/V) or B) FA (%V/V) content, and C) Temperature (PFA at 1% HCl, 20% FA is  
 526 shown). Average and standard deviations from three individual experiments are  
 527 shown. Error bars indicate the standard deviation between experiments. Some  
 528 bars are smaller than the symbols shown.  
 529

530  
 531  
 532 To understand the mechanism of heparin release from PFA, data were adjusted to  
 533 the Ritger and Peppas equation (Eq. 6) (Ritger and Peppas 1987):  
 534

535 
$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Eq. 6})$$

536  
 537 where  $M_t/M_\infty$  is the fraction of drug released,  $t$  is time,  $k$  is a kinetic constant  
 538 characteristic of the drug/polymer system, and  $n$  is the diffusional release  
 539 exponent. According to Ritger and Peppas, the value of  $n$  depends on the overall  
 540 solute diffusion mechanism. For cylindrical-shaped polymers, a value of 0.5 is  
 541 obtained in Fickian diffusion, a value  $0.5 < n < 1.0$  corresponds to anomalous (non-  
 542 Fickian diffusion), a value of 1.0 correspond to Case-II transport and  $n > 1.0$  is  
 543 obtained is obtained with super case II transport. The value of  $n$  obtained in Eq. 6  
 544 for PFA membranes at different content of HCl are shown in Table 1 and FA in  
 545 Table 2 as well as the corresponding correlation coefficient and the kinetic constant  
 546 associated.

547 Data in table 1 show that at lower HCl content (1, 5, 10 and 20% HCl), the best fit  
 548 was obtained when  $0.5 < n < 1.0$ , indicating that the mechanism of diffusion was

549 non-Fickian or anomalous. This means that diffusion coefficient changes with time  
 550 and the classic laws of diffusion are not fulfilled. Otherwise, at higher HCl content  
 551 (30 and 40%), the best fit was obtained when  $n > 1.0$ , indicating that the  
 552 mechanism of diffusion was super case II transport. Regarding velocity of  
 553 desorption, was found that at higher HCl content desorption rate of a model  
 554 molecule (heparin) were lower, but at higher FA content, desorption rate increased.  
 555 Otherwise, data in table 2 show that independently of the FA content, the best fit  
 556 was obtained when  $0.5 < n < 1.0$ , indicating that the mechanism of diffusion was  
 557 non-Fickian or anomalous.

558 Anomalous diffusion in PFA membranes could be possibly attributed to its  
 559 heterogeneous PFA structure created under our experimental conditions. At lower  
 560 HCl content (1 to 20%), there are some heterogeneity in PFA matrix with melt and  
 561 highly crosslinked (semi crystalline) regions. On one hand, melt regions chains  
 562 have a great mobility, then heparin release is accompanied by matrix collapse.  
 563 Here, diffusion is highly influenced by swelling dynamic. On the other hand, highly  
 564 crosslinked regions might inhibit matrix collapse when the drug is released, thereby  
 565 creating voids into which heparin can diffuse. It has been determined that the  
 566 incorporation of the crystallites reduced the solute diffusion coefficient significantly  
 567 (Harland and Peppas 1989). This heterogeneity triggers that the diffusion  
 568 coefficient changes over the time, a characteristic of an anomalous diffusion. A  
 569 similar observation was made by Rosenberg et al. for release of caffeine and  
 570 nicotine, two hydrophilic drugs, in poly( $\epsilon$ -caprolactone) matrices (Rosenberg et al.  
 571 2007).

572 Interestingly, PFA at highest HCl content (30-40%) trigger a super case II  
 573 mechanism of diffusion, which is found in various non-Fickian polymer-penetrant  
 574 systems (Edwards and Cohen 1995). This suggest that in our conditions, there are  
 575 some concentration gradients resembling advancing fronts, probably due to the  
 576 high HCl content create very entangled with no full permeation of heparin.

577

578

579 **Table 1.** Heparin diffusion parameters from PFA at various HCl (%V/V) content  
 580 and FA 20% at room temperature.  $n$  exponent values, kinetic constants ( $k$ ) and  
 581 Pearson's correlation coefficients ( $R^2$ ), obtained from Eq. 6, are listed. All fits were  
 582 performed using data shown in Fig. 6A. Mean and standard deviation between four  
 583 individual experiments are shown.

584

%HCl (V/V)	$n$ exponent	$k$ ( $\times 10^3 \text{ h}^{-1}$ )	$R^2$	Diffusion mechanism
1	0.827 $\pm$ 0.011	16.1 $\pm$ 3.05	0.987 $\pm$ 0.002	Anomalous
5	0.910 $\pm$ 0.018	11.0 $\pm$ 1.63	0.985 $\pm$ 0.004	Anomalous
10	0.908 $\pm$ 0.029	11.1 $\pm$ 2.69	0.984 $\pm$ 0.005	Anomalous
20	0.993 $\pm$ 0.087	7.62 $\pm$ 4.93	0.962 $\pm$ 0.016	Anomalous
30	1.080 $\pm$ 0.046	4.00 $\pm$ 1.46	0.979 $\pm$ 0.007	Super case II

40                      1.124±0.042    3.09±1.34            0.985±0.005    Super case II

585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592

**Table 2.** Heparin diffusion parameters from PFA at various FA (%V/V) content and HCl 2% at room temperature. *n* exponent values, kinetic constants (*k*) and Pearson’s correlation coefficients ( $R^2$ ), obtained from Eq. 6, are listed. All fits were performed using data shown in Fig. 6B. Mean and standard deviation between four individual experiments are shown.

FA (%V/V)	<i>n</i> exponent	<i>k</i> ( $\times 10^3 \text{ h}^{-1}$ )	$R^2$	Diffusion mechanism
5	0.791±0.011	21.2±0.824	0.981±0.003	Anomalous
10	0.789±0.009	21.0±1.12	0.978±0.001	Anomalous
20	0.887±0.020	12.8±1.05	0.994±0.001	Anomalous
30	0.890±0.009	13.0±0.769	0.990±0.004	Anomalous
40	0.889±0.006	13.1±0.340	0.991±0.001	Anomalous
50	0.893±0.010	13.0±0.766	0.990±0.002	Anomalous

593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603

In Fig. 6C, is shown the influence of temperature in heparin diffusion from PFA (1% HCl, 20% FA). According to the Arrhenius equation, it can be expected that heparin release rate was proportional to temperature, however PFA showed the opposite behavior. At higher temperature, the heparin release rate was lower. These results agree with Wypych who described that crystallinity of some polymer networks increases with temperature which reduces the solute diffusion (Harland and Peppas 1989, G. Wypych 2015)

604  
605  
606

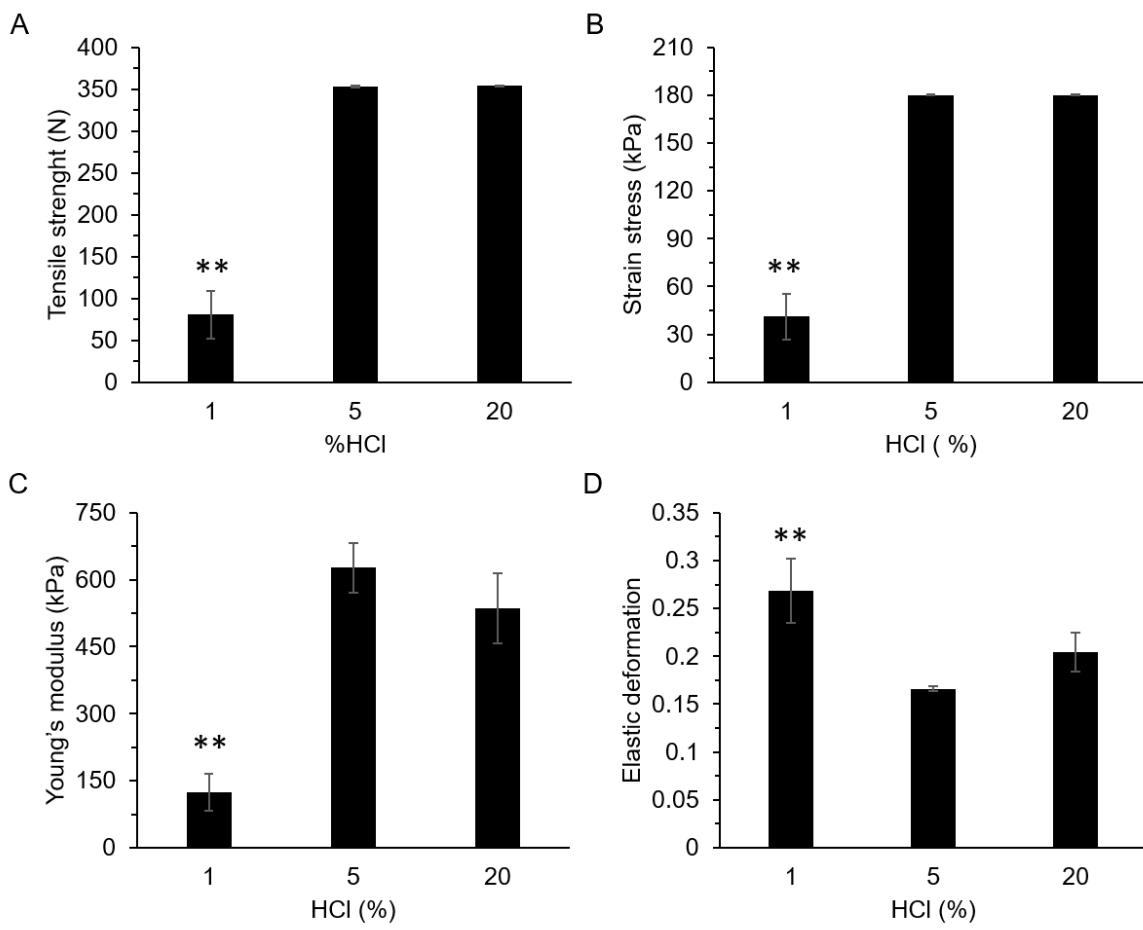
### Mechanical properties

607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616

Mechanical properties are very important parameters to determine the application of polymers for a specific purpose. Mechanical properties of an adequate material for PEUF should resist the rough environmental conditions and a working pressure that triggers a water flux through membranes to guarantee their usability at large-scale. Therefore, a rational design of materials for water treatment and PEUF should also consider the tensile strength, that indicates how much force it can resist before breaking, and strain stress, needed to determine the strain that would provoke a permanent, damaging or deformation of the material. Elasticity and the Young’s modulus determine the capacity of diffusion of molecules through the elastic polymer matrix. These properties are very important because determine the

617 feasibility of using a polymer in PEUF applications and had been seldom studied in  
618 scientific literature.

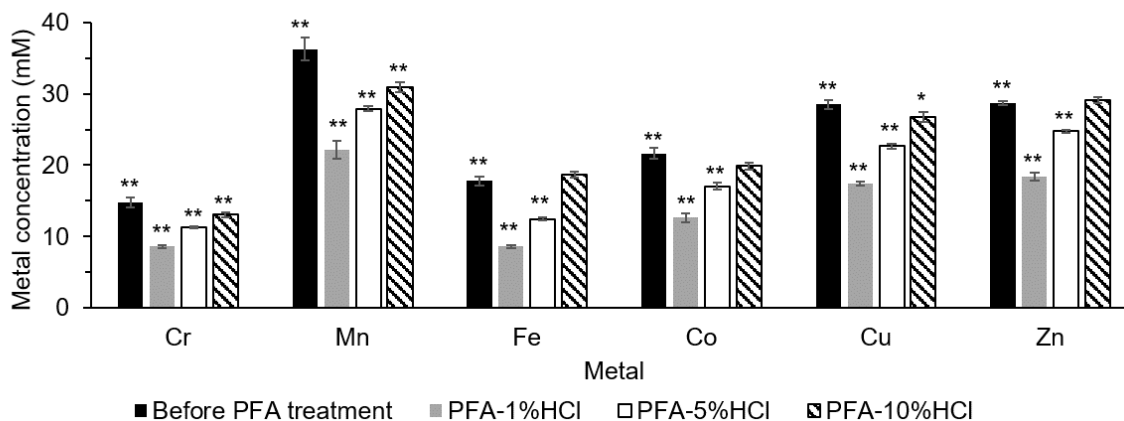
619 The mechanical properties of PFA at different HCl (%V/V) were studied, which  
620 unlike FA, influenced to a greater extend PFA diffusion properties (Fig. 7)  
621 according to our results (Figs. 6A-B). At higher HCl content PFA showed an  
622 increased tensile strength (figure 7A), strain stress (Fig. 7B), and Young's modulus  
623 (Fig. 7C), otherwise, elastic deformation decreased (Fig. 7D). No significant  
624 difference was found between PFA at 5 and 20% HCl. It worth highlight that further  
625 research should be done under real-life pressures and flow volumes that simulate  
626 large-scale PEUF operating conditions. In this first approach it was demonstrated  
627 that by varying HCl content between 1% to 5% is a simple way to modulate the  
628 mechanical properties of PFA to obtain the desired requirements for a specific  
629 application.  
630



631 **Fig. 7.** Mechanical properties of PFA at three HCl (%V/V) content. A) Tensile  
632 strength. B) Strain stress. C) Young's modulus. D) Elastic deformation. Mean and  
633 standard deviations between six independent experiments are shown. (\*\*)  
634  $p < 0.01$ .  
635

636  
637 **Metal adsorption**  
638

639 PFA is formed by a cyclic acetal matrix with free hydroxyl groups and aldehyde  
 640 groups as result of an incomplete polymerization (Fig.1C and Fig. 2C), that provides  
 641 a negative charge to PFA matrix. Moreover, due to PFA chemical stability, good  
 642 absorption capacity (Fig. 4), permeation (Fig. 5), desorption (Fig. 6) and  
 643 mechanical properties that can be easily tunable modulating the content of HCl, we  
 644 evaluated the PFA potential as cationic exchanger to adsorb metallic cations as  
 645 function of its HCl content.  
 646 Simultaneous adsorption of  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  after 24 h  
 647 interacting with PFA at different crosslinking was evaluated. The obtained results  
 648 are shown in Fig. 8. At higher HCl content, PFA capacity to adsorb metallic cations  
 649 decreased. The highest metallic adsorption was found at PFA 1% HCl, followed by  
 650 PFA 5% HCl. PFA at 10% HCl had no significant metallic cations adsorption  
 651 compared with control.  
 652



653 **Fig. 8.** Metallic cations adsorption in PFA membranes at three HCl (%V/V) content.  
 654 Mean and standard deviations between three independent experiments are shown.  
 655 (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ .  
 656  
 657

658  
 659 In table 3, the adsorption capacities in the equilibrium at constant temperature of  
 660 ( $Q_e$ ) values to each element are shown. It worth highlight that PFA at 1% HCl  
 661 resulted in a very efficient material to adsorb a wide variety of metallic cations  
 662 compared to another polymer previously reported. For example, a composite of  
 663 PVA and chitosan, showed  $Q_e$  for  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  of 45 mg/g, 40 mg/g, 20  
 664 mg/g, 25 mg/g, respectively (X. Li, Li, and Ye 2011). Apparently, it seems that PFA  
 665 membranes has a better performance compared to these materials. However  
 666 previous  $Q_e$  reported for another polymeric systems and metallic cations with our  
 667 results could be tricky, at least identical conditions of number of metals,  
 668 concentration, temperature and pH was performed.  
 669 There have been many efforts to improve polymers properties for heavy metal  
 670 removal. For example, recently Zarghami et. al incorporated Carbon nanotubes  
 671 (CNT) to a composite of PVA and chitosan. Authors reported a  $Q_e$  of 100 mg/g for  
 672 and 80 mg/g for  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , respectively (Zarghami, Tofighy, and Mohammadi  
 673 2015). Addition of CNT to polymers, has been proposed as a good strategy to

674 increase heavy metal performance of the heavy metal absorption of the polymers  
 675 and also their mechanical properties as recently was published by Hong et al.  
 676 2015, Abraham et al. 2012, among others. However further research is needed to  
 677 guarantee the safety to incorporate CNT in materials intended to be in contact with  
 678 drinking water because of the widely reported CNT cytotoxic effects (Kobayashi,  
 679 Izumi, and Morimoto 2017, Du et al. 2013). This is an advantage of PFA  
 680 membranes which exhibited high  $Q_e$  values for a wide range of metal  
 681 simultaneously added with no extra additive required keeping low-cost production.

682  
 683

684 **Table 3.**  $Q_e$  values estimated for metallic cations simultaneously adsorbed in PFA  
 685 membranes at different HCl (%V/V) content at pH7 and 25° C. All  $Q_e$  values shown  
 686 were estimated using data shown in Fig. 8. Mean and standard deviation between  
 687 three individual experiments are shown.

688

%HCl	Cr <sup>6+</sup> [mg/g]	Mn <sup>2+</sup> [mg/g]	Fe <sup>2+</sup> [mg/g]	Co <sup>2+</sup> [mg/g]	Cu <sup>2+</sup> [mg/g]	Zn <sup>2+</sup> [mg/g]
1	79.7±2.76	181±15.5	118±3.50	115±8.19	142±3.56	132±7.01
5	45.8±1.68	107±4.48	68.8±2.40	58.8±5.73	74.6±4.54	50.0±2.28
10	23.8±4.63	73.6±9.40	ND	23.5±6.89	23.9±8.98	ND

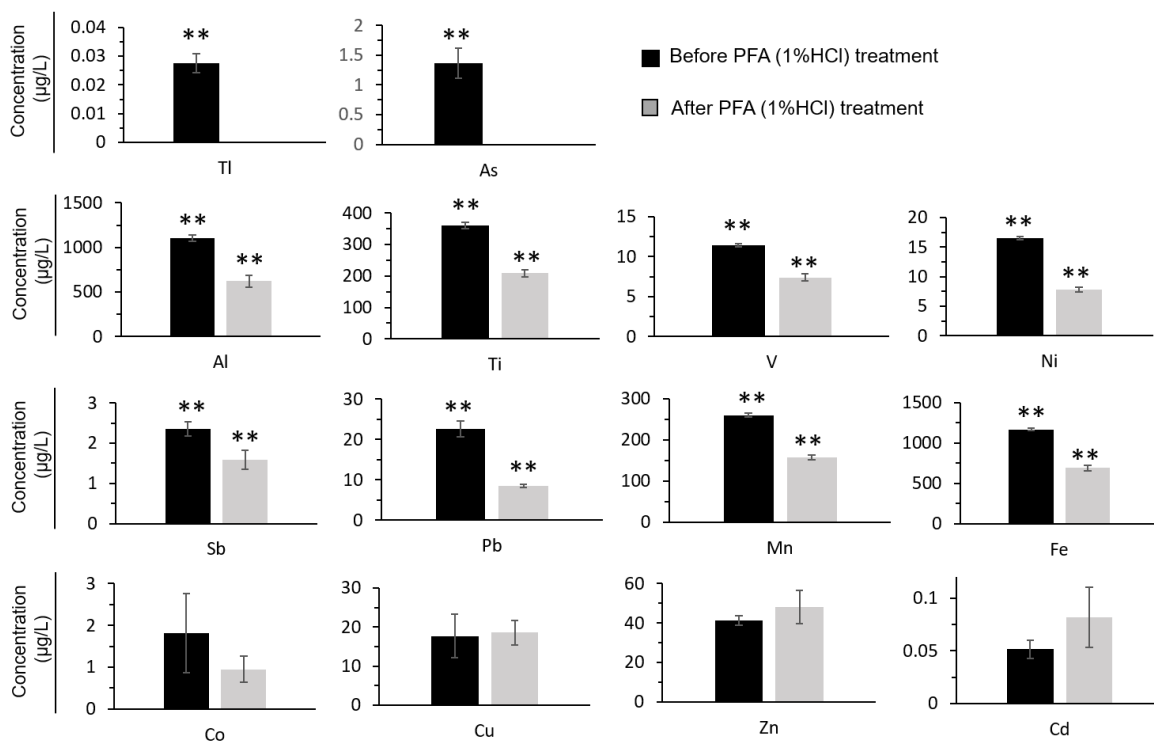
689 ND: No determined.

690

691 In this context, one of the principal reasons of novel materials published are not  
 692 applied in real-life conditions, is because their performance is studied under ideal  
 693 conditions and other undesired interferences which can affect the polymer  
 694 performance are commonly neglected. Therefore, the PFA (1% HCl, 20% FA)  
 695 capacity of heavy metal removal was evaluated in the presence of real-life samples  
 696 of the Atoyac River containing organic matter, molecules with neutral, positive and  
 697 negative charge, and other metallic cations not considered in experiment of Fig. 8.  
 698 Our results showed that there was a significant decrease in the levels of Al, Ti, V,  
 699 Ni, Sb, Pb, Mn, Fe, Tl, As in a single step; but not so for Cu and Zn where there  
 700 was no significant difference. It worth highlight that PFA absorbs 2<sup>+</sup>, 3<sup>+</sup> and 6<sup>+</sup>  
 701 charged cations at the same time. Moreover, it worth to mention that one single  
 702 step of purification with PFA membranes was sufficient to reduce Pb, Fe and Mn  
 703 until acceptable level for drinking water according to the Mexican standards. Even  
 704 As and Tl levels were reduced under the limit of detection. No significative  
 705 reduction was observed for Co, Cu, Zn and Cd as is shown in Fig. 9.

706





707  
 708 **Fig. 9.** Metallic cations adsorption in PFA membranes at three HCl (%V/V) content.  
 709 Mean and standard deviations between three independent experiments are shown.  
 710 (\*\*) $p < 0.01$ .

711  
 712 Efficiency of heavy metal/metalloid removal from water of Atoyac river is shown in  
 713 table 4.

714  
 715 **Table 4.** Removal efficiency percentages for each metal or metalloid  
 716 simultaneously adsorbed in PFA membranes (1% HCl, 20% FA) at neutral pH and  
 717 25° C. All values shown were estimated using data shown in Fig. 9. Mean and  
 718 standard deviation between three individual experiments are shown.

719

Element	Removal efficiency (%)
Al	43.7±5.90
Ti	42.2±3.01
V	35.5±3.83
Ni	35.5±2.85
Sb	32.7±10.2
Pb	62.3±1.47
Mn	39.3±2.19
Fe	40.5±2.86
Tl	100.0±0.00
As	100.0±0.00
Cu	ND
Zn	ND

720 ND: No determined.

721

722

723 To compare the efficiency PFA membranes with other polymeric system for heavy  
724 metal removal, it is important to mention that the  $Q_e$  values here reported were  
725 obtained after simultaneously adsorption of heavy metal and metalloids in PFA  
726 membranes. Li et. al synthesized a composite of PVA and chitosan for  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  
727  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  removal. They found that when cations adsorption was measured  
728 individually, exhibited an absorption efficiency of 98.77%, 98.61%, 66.37%,  
729 70.16%, respectively. But when all cations were added simultaneously, the  
730 absorption efficiencies decreased to 93.9%, 77.85%, 10.93% and 21.31%,  
731 respectively (X. Li, Li, and Ye 2011). So, in our experimental conditions with water  
732 of the Atoyac river, we have more cations than the twelve listed in table 4, real-life  
733 polluted waters as what were used here contains another organic and inorganic  
734 chemical species which can affect the efficiency of heavy metal removal,  
735 nonetheless PFA showed very high heavy metal/metalloids adsorption efficiency  
736 (Table 4).

737

738

### 739 **Conclusions and future remarks**

740

741 In summary, many materials have been proposed with potential for the removal of  
742 heavy metals. However, the most of those studies have focused on one or a few  
743 cations without considering that in real polluted waters there are many of them, in  
744 addition to the presence of organic compounds that could compromise the material  
745 performance.

746 Therefore, in this work we present a polymeric material with promising  
747 characteristics to be applied for wastewater treatment. The obtained polymer  
748 showed tunable swelling, water absorption, permeability, desorption, mechanical  
749 properties, and capability of heavy metal removal in laboratory conditions and in  
750 real-life waste waters taking a polluted Mexican river as case of study. However, it  
751 worth mention that further research is needed to optimize PFA mechanical  
752 properties. This is of especial relevance because, according to our results, the best  
753 heavy metal efficiency was obtained for PFA at 1% HCl which also showed the  
754 poorest mechanical resistance and permeability. Also, the reusability of PFA  
755 membranes as well as its resistance to a real pressure due to a water flux to be  
756 applied in a large-scale model remain to be investigated. However, in this first  
757 approach we reported a promising, low-cost, and easily synthesized polymer with *à*  
758 *la carte* properties which can be easily modulated by simple addition of HCl  
759 depending on specific necessities.

760

761

### 762 **Acknowledgements**

763 Research performed thanks to the financial support of the Programa UNAM-  
764 DGAPA-PAPIIT IT-200416. F. Villanueva received a scholarship from CONACyT  
765 during her graduate studies. We thank Mariana Ramírez Gilly (Facultad de  
766 Química UNAM), Manuel Aguilar Franco (Laboratorio Central de Microscopía  
767 UNAM), Patricia Altúzar-Cuello (Instituto de Energías Renovables UNAM). We also

768 deeply thank to Marco A. Méndez-González, Mireya Mariscal-Orduño and Norma  
769 Mendoza-González for their appreciated contributions.

770

771

## 772 **References**

773

774 Abraham, Thomas N, Rajesh Kumar, R K Misra, and S K Jain. 2012. "Poly(Vinyl  
775 Alcohol)-Based MWCNT Hydrogel for Lead Ion Removal from Contaminated  
776 Water." *Journal of Applied Polymer Science* 125 (S1). Wiley Subscription  
777 Services, Inc., A Wiley Company: E670–74.  
778 <https://doi.org/10.1002/app.35666>.

779 Armienta, M A, and N Segovia. 2008. "Arsenic and Fluoride in the Groundwater of  
780 Mexico." *Environmental Geochemistry and Health* 30 (4): 345–53.  
781 <https://doi.org/10.1007/s10653-008-9167-8>.

782 Bolto, Brian, Thuy Tran, Manh Hoang, and Zongli Xie. 2009. "Progress in Polymer  
783 Science Crosslinked Poly ( Vinyl Alcohol ) Membranes" 34: 969–81.  
784 <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.05.003>.

785 Boruah, Monalisha, Medha Mili, Shyamalima Sharma, Biswajit Gogoi, and Swapan  
786 Kumar Dolui. 2015. "Synthesis and Evaluation of Swelling Kinetics of Electric  
787 Field Responsive Poly(Vinyl Alcohol)-g-Polyacrylic Acid/OMNT  
788 Nanocomposite Hydrogels." *Polymer Composites* 36 (1): 34–41.  
789 <https://doi.org/10.1002/pc.22909>.

790 Bussey, Howard. 1996. "A History of Global Metal Pollution A Pivotal Role for  
791 Rho," no. April.

792 Centeno, Jose A, Florabel G Mullick, Leonor Martinez, Norbert P Page, Herman  
793 Gibb, David Longfellow, Claudia Thompson, and Elena R Ladich. 2002.  
794 "Pathology Related to Chronic Arsenic Exposure." *Environmental Health*  
795 *Perspectives* 110 (Suppl 5): 883–86.  
796 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241266/>.

797 Chen, C T, Y J Chang, M C Chen, and A V Tobolsky. 1973. "Formalized Poly(Vinyl  
798 Alcohol) Membranes for Reverse Osmosis." *Journal of Applied Polymer*  
799 *Science* 17 (3). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 789–96.  
800 <https://doi.org/10.1002/app.1973.070170311>.

801 Crini, Grégorio, Nadia Morin-Crini, Nicolas Fatin-Rouge, Sébastien Déon, and  
802 Patrick Fievet. 2017. "Metal Removal from Aqueous Media by Polymer-  
803 Assisted Ultrafiltration with Chitosan." *Arabian Journal of Chemistry* 10:  
804 S3826–39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.020>.

805 Dąbrowski, A, Z Hubicki, P Podkościelny, and E Robens. 2004. "Selective  
806 Removal of the Heavy Metal Ions from Waters and Industrial Wastewaters by  
807 Ion-Exchange Method." *Chemosphere* 56 (2): 91–106.  
808 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.03.006>.

809 Damián-Jiménez T. 2010. "El río Atoyac es contaminado por 1000 industrias y 50  
810 municipios denuncian". *La Jornada de Oriente*.  
811 <http://www.lajornadadeorientemx.com.mx/2010/10/12/puebla/ec107.php>

812 Demirbas, Ayhan. 2008. "Heavy Metal Adsorption onto Agro-Based Waste  
813 Materials: A Review." *Journal of Hazardous Materials* 157 (2): 220–29.  
814 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.01.024>.

815 Edwards, David A, and Donalds S Cohen. 1995. "The Effect of a Changing  
816 Diffusion Coefficient in Super-Case II Polymer-Penetrant Systems." *IMA*  
817 *Journal of Applied Mathematics* 55 (1): 49–66.  
818 <http://dx.doi.org/10.1093/imamat/55.1.49>.

819 Flory, Paul J. 1985. "Molecular Theory of Rubber Elasticity." *Polymer Journal* 17  
820 (January). The Society of Polymer Science, Japan: 1.  
821 <http://dx.doi.org/10.1295/polymj.17.1>.

822 Fu, Fenglian, and Qi Wang. 2011. "Removal of Heavy Metal Ions from  
823 Wastewaters : A Review." *Journal of Environmental Management* 92 (3).  
824 Elsevier Ltd: 407–18. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>.

825 Fumio, Urushizaki, Yamaguchi Hiroshi, Nakamura Kumiko, Numajiri Sachihiko,  
826 Sugibayashi Kenji, and Morimoto Yasunori. 1990. "Swelling and Mechanical  
827 Properties of Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels." *International Journal of*  
828 *Pharmaceutics* 58 (2): 135–42. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90251-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90251-X).

829 García-Rico, Leticia, Diana Meza-Figueroa, A Jay Gandolfi, Carlos Ibañez del  
830 Rivero, Marco A Martínez-Cinco, and Maria M Meza-Montenegro. 2019.  
831 "Health Risk Assessment and Urinary Excretion of Children Exposed to  
832 Arsenic through Drinking Water and Soils in Sonora, Mexico." *Biological Trace*  
833 *Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1347-5>.

834 Garcia-Vargas, Gonzalo, Marisela Rubio, Luz Maria Del Razo, Victor Borja-Aburto,  
835 E Vera Aguilar, and M E Cebrián. 2001. "Lead Exposure in Children Living in a  
836 Smelter Community in Region Lagunera, Mexico." *Journal of Toxicology and*  
837 *Environmental Health. Part A* 62: 417–29.

838 Geckeler, Kurt, and Konstantin Volchek. 1996. *Removal of Hazardous Substances*  
839 *from Water Using Ultrafiltration in Conjunction with Soluble Polymers.*  
840 *Environmental Science and Technology*. Vol. 30.  
841 <https://doi.org/10.1021/es950326l>.

842 Gohil, J M, A Bhattacharya, and P Ray. 2006. "Studies On The Crosslinking Of  
843 Poly (Vinyl Alcohol)." *Journal of Polymer Research* 13 (2): 161–69.  
844 <https://doi.org/10.1007/s10965-005-9023-9>.

845 Grattoni, Carlos A, Hamed H Al-Sharji, Canghu Yang, Ann H Muggeridge, and  
846 Robert W Zimmerman. 2001. "Rheology and Permeability of Crosslinked  
847 Polyacrylamide Gel." *Journal of Colloid and Interface Science* 240 (2): 601–7.  
848 <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7633>.

849 Harland, R S, and N A Peppas. 1989. "Solute Diffusion in Swollen Membranes VII.  
850 Diffusion in Semicrystalline Networks." *Colloid and Polymer Science* 267 (3):  
851 218–25. <https://doi.org/10.1007/BF01410578>.

852 Hegazi, Hala Ahmed. 2013. "Removal of Heavy Metals from Wastewater Using  
853 Agricultural and Industrial Wastes as Adsorbents." *HBRC Journal* 9 (3): 276–  
854 82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hbrj.2013.08.004>.

855 Hejna, M, D Gottardo, A Baldi, V Dell Orto, F Cheli, M Zaninelli, and L Rossi. 2018.  
856 "Review : Nutritional Ecology of Heavy Metals," no. Table 1.  
857 <https://doi.org/10.1017/S175173111700355X>.

858 Hernández-Ochoa, I., García-Vargas, G., López-Carrillo, L et al. 2005. "Low Lead  
859 Environmental Exposure Alters Semen Quality and Sperm Chromatin  
860 Condensation in Northern Mexico &" 20: 221–28.

861 <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.01.007>.

862 Hong, Soon-kook, Dongouk Kim, Sangeui Lee, Byung-Wook Kim, Paul Theilmann,  
863 and Sung-Hoon Park. 2015. "Enhanced Thermal and Mechanical Properties of  
864 Carbon Nanotube Composites through the Use of Functionalized CNT-  
865 Reactive Polymer Linkages and Three-Roll Milling." *Composites Part A:  
866 Applied Science and Manufacturing* 77: 142–46.  
867 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2015.05.035>.

868 Hurtado-Jiménez, Roberto, and Jorge Gardea-Torresdey. 2006. *Arsenic in  
869 Drinking Water in the Los Altos de Jalisco Region of Mexico. Revista  
870 Panamericana de Salud Pública = Pan American Journal of Public Health*. Vol.  
871 20. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892006000900004>.

872 Işıklan, Nuran, and Oya Şanlı. 2005. "Separation Characteristics of Acetic Acid-  
873 water Mixtures by Pervaporation Using Poly(Vinyl Alcohol) Membranes  
874 Modified with Malic Acid." *Chemical Engineering and Processing: Process  
875 Intensification* 44 (9): 1019–27.  
876 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cep.2005.01.005>.

877 Ji, D., Wang, S., You, H., and Zhao, X. 2013. "Understanding the Toxicity of  
878 Carbon Nanotubes in the Environment Is Crucial to the Control of  
879 Nanomaterials in Producing and Processing and the Assessment of Health  
880 Risk for Human: A Review." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36  
881 (2): 451–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.05.007>.

882 Kang, Inn-Kyu, Oh Hyeong Kwon, Young Moo Lee, and Yong Kiel Sung. 1996.  
883 "Preparation and Surface Characterization of Functional Group-Grafted and  
884 Heparin-Immobilized Polyurethanes by Plasma Glow Discharge." *Biomaterials*  
885 17 (8): 841–47. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)81422-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)81422-0).

886 Kobayashi, Norihiro, Hiroto Izumi, and Yasuo Morimoto. 2017. "Review of Toxicity  
887 Studies of Carbon Nanotubes." *Journal of Occupational Health* 59 (5): 394–  
888 407. <https://doi.org/10.1539/joh.17-0089-RA>.

889 Krumova, M, D López, R Benavente, C Mijangos, and J M Pereña. 2000. "Effect of  
890 Crosslinking on the Mechanical and Thermal Properties of Poly(Vinyl  
891 Alcohol)." *Polymer* 41 (26): 9265–72.  
892 [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00287-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00287-1).

893 Kulyukhin, S A, L V Mizina, M P Gorbacheva, I A Rumer, V A Lomovskoi, and E I  
894 Saunin. 2014. "Removal of 131I and 137Cs from Aqueous and Aqueous-  
895 Organic Solutions with Porous Polyvinyl Formal." *Radiochemistry* 56 (2): 177–  
896 82. <https://doi.org/10.1134/S106636221402009X>.

897 Kurniawan, Tonni Agustiono, Gilbert Y S Chan, Wai-Hung Lo, and Sandhya Babel.  
898 2006. "Physico-chemical Treatment Techniques for Wastewater Laden with  
899 Heavy Metals." *Chemical Engineering Journal* 118 (1): 83–98.  
900 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.01.015>.

901 Li, X., Li, Y., and Ye, Z. 2011. "Preparation of Macroporous Bead Adsorbents  
902 Based on Poly(Vinyl Alcohol)/Chitosan and Their Adsorption Properties for  
903 Heavy Metals from Aqueous Solution." *Chemical Engineering Journal* 178:  
904 60–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.10.012>.

905 Li, Y., Neoh, KJ., and Kang, ET. 2005. "Controlled Release of Heparin from  
906 Polypyrrole-Poly(Vinyl Alcohol) Assembly by Electrical Stimulation." *Journal of  
907 Biomedical Materials Research - Part A* 73 (2): 171–81.

908 <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30286>.

909 Likens, Gene E, and F Herbert Bormann. 1974. "Acid Rain: A Serious Regional  
910 Environmental Problem." *Science* 184 (4142): 1176 LP-1179.  
911 <http://science.sciencemag.org/content/184/4142/1176.abstract>.

912 Muthukumar, M, and S F Edwards. 1982. "Screening Concepts in Polymer Solution  
913 Dynamics." *Polymer* 23 (3): 345–48.  
914 [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0032-3861\(82\)90333-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0032-3861(82)90333-0).

915 Neal, C., and Stanger, G. 1984. *Calcium and Magnesium Hydroxide Precipitation  
916 from Alkaline Groundwaters in Oman, and Their Significance to the Process of  
917 Serpentinization. Mineralogical Magazine*. Vol. 48.

918 Nielsen, Lawrence E. 1969. "Cross-Linking–Effect on Physical Properties of  
919 Polymers." *Journal of Macromolecular Science, Part C* 3 (1). Taylor & Francis:  
920 69–103. <https://doi.org/10.1080/15583726908545897>.

921 Norton, Michael V, Francis A DiGiano, and Richard T Hallen. 1997. "Selective  
922 Separation of Europium Using Polymer-Enhanced Ultrafiltration." *Water  
923 Environment Research* 69 (2). Water Environment Federation: 244–53.  
924 <http://www.jstor.org/stable/25044869>.

925 Pan, Yanxiong, Kai Shi, Chao Peng, Weicai Wang, Zhi Liu, and Xiangling Ji. 2014.  
926 "Evaluation of Hydrophobic Polyvinyl-Alcohol Formaldehyde Sponges As  
927 Absorbents for Oil Spill."

928 Piñón-Miramontes, M., Bautista-Margulis, R. G., & Pérez-Hernández, A. 2003.  
929 "Removal of Arsenic and Fluoride from Drinking Water with Cake Alum and a  
930 Polymeric Anionic Flocculent." *Fluoride* 36: 122–28.

931 Razo Soto, Israel, Leticia Carrizales-Yáñez, Javier Castro-Larragoitia, Fernando  
932 Díaz-Barriga, and Marcos Monroy. 2004. *Arsenic and Heavy Metal Pollution of  
933 Soil, Water and Sediments in a Semi-Arid Climate Mining Area in Mexico.  
934 Water Air and Soil Pollution*. Vol. 152.  
935 <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000015350.14520.c1>.

936 Ritger, Philip L, and Nikolaos A Peppas. 1987. "A Simple Equation for Description  
937 of Solute Release I. Fickian and Non-Fickian Release from Non-Swellable  
938 Devices in the Form of Slabs, Spheres, Cylinders or Discs." *Journal of  
939 Controlled Release* 5 (1): 23–36. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-  
940 3659\(87\)90034-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4).

941 Romieu, I., Lopez, L., Palazuelos, E., Rios, C., Yves., and Hernandez M. 1995.  
942 "Environmental Urban Lead Exposure and Blood Lead Levels in Children of  
943 Mexico City" 103 (11): 36–40.

944 Rosenberg, R, W Devenney, S Siegel, and N Dan. 2007. "Anomalous Release of  
945 Hydrophilic Drugs from Poly(ε-Caprolactone) Matrices." *Molecular  
946 Pharmaceutics* 4 (6). American Chemical Society: 943–48.  
947 <https://doi.org/10.1021/mp700097x>.

948 Sanderson, R D, E Immelman, D Bezuidenhout, E P Jacobs, and A J Van Reenen.  
949 1993. "Polyvinyl Alcohol and Modified Polyvinyl Alcohol Reverse Osmosis  
950 Membranes." *Desalination* 90 (1): 15–29.  
951 [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0011-9164\(93\)80161-F](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0011-9164(93)80161-F).

952 Sargent, James D, Madeline Dalton, and Sandy Roda. 1999. "High Concentrations  
953 of Heavy Metals in Neighborhoods Near Ore Smelters in Northern Mexico"  
954 107 (4): 279–84.

955 Schwartz, J. 1994. "Low-Level Lead Exposure and Children's IQ: A Metaanalysis  
956 and Search for a Threshold." *Environmental Research* 65 (1): 42–55.  
957 <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/enrs.1994.1020>.

958 Smeester, Lisa, and Rebecca C Fry. 2018. "Long-Term Health Effects and  
959 Underlying Biological Mechanisms of Developmental Exposure to Arsenic."  
960 *Current Environmental Health Reports*. [https://doi.org/10.1007/s40572-018-](https://doi.org/10.1007/s40572-018-0184-1)  
961 [0184-1](https://doi.org/10.1007/s40572-018-0184-1).

962 Smith, B C. 1995. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*.  
963 Taylor & Francis. [https://books.google.com.mx/books?id=cL\\_cvNCoEmkC](https://books.google.com.mx/books?id=cL_cvNCoEmkC).

964 Stover, R C, Lee Sommers, and D J Silveira. 1976. *Evaluation of Metals in*  
965 *Wastewater Sludge*. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. Vol.  
966 48.

967 Tanaka, Toyochi, L O Hocker, and G B Benedek. 1973. *Spectrum of Light*  
968 *Scattered from a Viscoelastic Gel*. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*. Vol.  
969 59. <https://doi.org/10.1063/1.1680734>.

970 Tokita, Masayuki, and Toyochi Tanaka. 1991a. *Friction Coefficient of Polymer*  
971 *Networks of Gel*. *The Journal of Chemical Physics*. Vol. 95.  
972 <https://doi.org/10.1063/1.461729>.

973 Tokita, Masayuki, and Toyochi Tanaka. 1991b. "Reversible Decrease of Gel-  
974 Solvent Friction." *Science* 253 (5024): 1121 LP-1123.  
975 <http://science.sciencemag.org/content/253/5024/1121.abstract>.

976 Weiss, Nurit, and Alexander Silberberg. 1977. "Inhomogeneity of Polyacrylamide  
977 Gel Structure from Permeability and Viscoelasticity." *British Polymer Journal* 9  
978 (2). Wiley-Blackwell: 144–50. <https://doi.org/10.1002/pi.4980090210>.

979 Wyatt J., Fimbres, CC., Romo, R., Méndez, O and Grijalva, M. 1998. "Incidence of  
980 Heavy Metal Contamination in Water Supplies in Northern Mexico."  
981 *Environmental Research* 76 (2): 114–19.  
982 <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/enrs.1997.3795>.

983 Wypych, George. 2015. "Analytical Methods." In , edited by George B T - P V C  
984 Degradation and Stabilization (Third Edition) Wypych, 241–85. Boston:  
985 ChemTec Publishing. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-895198-](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-895198-85-0.50012-1)  
986 [85-0.50012-1](https://doi.org/10.1016/B978-1-895198-85-0.50012-1).

987 Yoshiro, O., Okano, M., and Ganke, T. 1956. "Kinetics of the Formation of the  
988 Formal of Polyvinyl Alcohol." *Journal of the American Chemical Society* 78  
989 (13). American Chemical Society: 2962–64.  
990 <https://doi.org/10.1021/ja01594a011>.

991 Zarghami, Soheil, Maryam Ahmadzadeh Tofighy, and Toraj Mohammadi. 2015.  
992 "Adsorption of Zinc and Lead Ions from Aqueous Solutions Using  
993 Chitosan/Polyvinyl Alcohol Membrane Incorporated via Acid-Functionalized  
994 Carbon Nanotubes." *Journal of Dispersion Science and Technology* 36 (12).  
995 Taylor & Francis: 1793–98. <https://doi.org/10.1080/01932691.2014.974814>.  
996

# *Anexo 4*



# 1           **MICROFIBRAS DE POLIVINIL FORMAL PARA PARA LA ADSORCIÓN** 2 **DE METALES PESADOS**

3  
4 Francisca Villanueva-Flores<sup>1</sup>, Octavio T. Ramírez<sup>1</sup> y Laura A. Palomares<sup>1\*</sup>

5  
6 1. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ave.  
7 Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México. 62210.

8 \* A quién debe dirigirse toda la correspondencia. Tel: +52 777 3291646. E-mail:  
9 [laura@ibt.unam.mx](mailto:laura@ibt.unam.mx).

## 10 11 **CAMPO DE LA INVENCION**

12  
13 La presente invención se refiere al uso de microfibras de poli(vinil formal) (PFA)  
14 resultado del entrecruzamiento entre el poli(vinil alcohol) (PVA) y formaldehído  
15 (FA) en presencia de ácido clorhídrico (HCl). La presente patente incluye datos  
16 experimentales que sustentan que las membranas de PFA son capaces de realizar  
17 un proceso de intercambio catiónico para la adsorción de cationes metálicos y  
18 metaloides con una eficiencia inversamente proporcional al grado de  
19 entrecruzamiento. Dada la sencillez de la producción, fácil manejo y bajo costo,  
20 esta tecnología potencialmente puede aplicarse para el tratamiento de aguas  
21 contaminadas como se demuestra con una prueba de concepto con muestras de  
22 aguas contaminadas del río mexicano "Atoyac".  
23

## 24 25 **ANTECEDENTES**

26  
27 Luego de la revolución industrial, la demanda y la consecuente emisión de metales  
28 al ambiente se disparó considerablemente [1]. Esto supuso un gran riesgo a la  
29 salud pública dado que los metales pesados por sus propiedades recalitrantes y  
30 su no biodegradabilidad se acumulan en los organismos vivos y persisten en el  
31 medio ambiente [2].

32 Una de las maneras más comunes de exposición a metales pesados es mediante  
33 el agua, especialmente donde ésta contiene altos niveles de acidez. Además la  
34 incorporación de metales pesados a la cadena alimenticia se agrava cuando éstos  
35 son lixiviados del suelo a los mantos freáticos con los que se irrigan los cultivos y  
36 se alimenta el ganado con que se alimenta a la comunidad [3].

37 En México el agua subterránea suministra el 75% del agua potable [4]. Por ello la  
38 contaminación por metales pesados es un problema de particular relevancia en  
39 nuestro país especialmente en las regiones cercanas a las metalúrgicas y  
40 alfareras [4, 5, 6]. A continuación, citaremos los casos particulares de dos metales:  
41 plomo y talio, y el metaloide As en su incidencia en acuíferos mexicanos por ser  
42 los elementos con los que se obtuvieron las mayores eficiencias de remoción con  
43 nuestro material, aunque no los únicos.

44 Plomo: Históricamente se han documentado numerosos casos de intoxicación por  
45 Pb y son bien sabidos sus efectos toxicológicos entre los que se incluye estrés  
46 oxidativo y falla respiratoria. La intoxicación por Pb se ha asociado con anemia en

47 dado que el Pb inhibe la porfobilinógeno sintasa y la ferroquelatasa, previniendo la  
48 formación de porfobilinógenos y la incorporación de hierro a la protoporfirina IX,  
49 que previene la síntesis de hemo. Asimismo se sabe que el Pb interfiere con la  
50 cognición es que actúa como un análogo del calcio que interfiere con los canales  
51 iónicos [8]. En Torreón, Coahuila, el porcentaje de niños con valores de plomo en  
52 sangre mayores a 15  $\mu\text{g}/\text{dL}$  de plomo en sangre fue de 92, % 84,9% y 6,8%,  
53 respectivamente correlacionando a la distancia de su escuela a una fundidora [9].  
54 Estos niveles suponen un gran riesgo a la salud con base en el meta-análisis  
55 efectuado por Schwartz donde se señala que niveles de plomo en sangre de 10 a  
56 20  $\mu\text{g}/\text{dL}$  se asocia con un decremento de 2,6 puntos de coeficiente intelectual (IQ)  
57 [10]. En esta población de Coahuila, también se analizaron muestras de personas  
58 con valores de 9.3  $\mu\text{g}/\text{dL}$  de plomo en sangre que se asoció con una disminución  
59 de la calidad del esperma y alteraciones en la cromatina [7, 9].

60 Arsénico: La arsénico (As) que se ha asociado al desarrollo de cáncer de piel,  
61 abortos espontáneos, daño al DNA, problemas gastrointestinales, enfermedades  
62 vasculares, deterioro cognitivo, entre otros [11, 12, 13]. En México se han  
63 reportado diversos mantos acuíferos y suelos aledaños con altas concentraciones  
64 de este metaloide. Tal es el caso de la comunidad de Cerrito Blanco en  
65 Matehuala, San Luis Potosí, donde los niveles de este metaloide alcanzaron los  
66  $>5900 \mu\text{g L}^{-1}$ ), excediendo más de 100 veces el máximo establecido por la Norma  
67 Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994) de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  [15]. Otro caso es el de  
68 Hermosillo, Sonora con concentraciones de 2 a  $305 \mu\text{g L}^{-1}$  [16], Meoqui,  
69 Chihuahua con mediciones de  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  [17], el Valle del Guadiana, Durango con  
70 hasta  $167 \mu\text{g L}^{-1}$  [17], en diversos pozos de Los Altos, Jalisco con  $14.7 \mu\text{g L}^{-1}$  a  
71  $101.9 \mu\text{g L}^{-1}$  [18], entre otras zonas geotérmicas como Los Azufres, Los Humeros  
72 y Acapulco, así como minera como Zacatecas, Guanajuato y San Luis Potosí [4].

73 Talio: Si bien los límites de talio (Tl) no están especificados en la NOM-127-SSA1-  
74 1994, sus efectos neurotóxicos, mutagénicos y alta toxicidad han sido  
75 documentados [18, 19]. El Tl puede atravesar las barreras placentaria,  
76 hematoencefálica y gonadal. Dentro de las células, se cree que el Tl puede  
77 acumularse e interferir con el metabolismo del potasio (K) y otros metales [20]. La  
78 medición del Tl es particularmente difícil por su baja incidencia y su  
79 enmascaramiento con el As, por ello que el único reporte de su detección en  
80 muestras de suelo mexicano de este metal es el trabajo recientemente publicado  
81 de Cruz-Hernández y col, quienes recientemente [21] detectaron Tl en muestras  
82 de agua de pozos del poblado "El Tecolote" (0.358-1.19 mg/kg) en Sonora, así  
83 como en el distrito metalúrgico de San Luis Potosí (10-72 mg/kg) así como  
84 nosotros en el presente trabajo. Estos datos son alarmantes, particularmente el de  
85 San Luis Potosí, sabiendo que la dosis letal de Tl es de 0.9-9.4 mg/kg en humanos  
86 [22] aunque poco se conoce sobre la movilidad y bioacumulación.

87 La diversidad de metales pesados y metaloides en agua es muy amplia para  
88 abordarlos todos, sin embargo, los tres ejemplos anteriores dan un panorama  
89 global del serio problema que enfrenta México respecto a la contaminación de  
90 metales pesados de sus mantos acuíferos.

91 La remoción de estos metales y metaloides actualmente se tratan en conjunto y no  
92 en un proceso selectivo lo cual permite abaratar los costos, aunque por otra parte,  
93 dificulta su recuperación. Los procedimientos convencionales para remover los

94 otros metales pesados de aguas residuales incluyen la floculación, adsorción,  
95 intercambio iónico, deposición electroquímica y la precipitación, siendo ésta última  
96 la más utilizada [23]. Inclusive se ha incursionado en explorar otras tecnologías  
97 como la absorción de metales pesados con plantas, hogos y microorganismos  
98 [24], lamentablemente estas alternativas aún tienen grandes retos con los cuales  
99 contender como lo son la depuración de grandes volúmenes de aguas  
100 contaminadas en comparación con los métodos físico-químicos [25].  
101 En la precipitación química de metales pesados generalmente se utiliza cal, el cual  
102 es un procedimiento barato, que requiere equipo simple y se le considera un  
103 procedimiento de operación seguro. La precipitación de metales pesados es un  
104 método eficiente para tratar muestras con una concentración de metales superior  
105 a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  [26]. El inconveniente de este método es que requiere una gran  
106 cantidad de productos químicos para reducir los metales a un nivel aceptable para  
107 su descarga. Otras desventajas de esta técnica son la producción excesiva de  
108 lodos que requieren tratamiento adicional. Aunado a ello, la precipitación química  
109 es lenta, la sedimentación pobre y existe agregación de los precipitados metálicos.  
110 Todos estos inconvenientes para la eliminación de los lodos generados en la  
111 precipitación de metales tiene un gran el impacto ambiental a largo plazo [27].  
112 Otra manera de remover los metales pesados del agua es mediante la  
113 recuperación electrolítica. Este proceso utiliza electricidad para pasar una  
114 corriente a través de una solución acuosa que contiene metal que contiene una  
115 placa catódica y un ánodo insoluble. Los cationes metálicos se adhieren a los  
116 cátodos dejando un depósito metálico que es desprendible y recuperable. Una  
117 limitante de este proceso es la corrosión que ocasiona que los electrodos deban  
118 reemplazarse frecuentemente lo que encarece el proceso [26].  
119 Una metodología ampliamente extendida para la remoción de metales pesados es  
120 el intercambio iónico, donde frecuentemente se utilizan resinas sintéticas  
121 orgánicas [28], así como zeolitas naturales y modificadas [29]. Esta metodología  
122 consiste en que un sólido actúa como un intercambiador de iones e interacciona  
123 con los cationes metálicos circundantes adsorbiéndolos [30]. Recientemente se  
124 han desarrollado y aplicado varios adsorbentes provenientes de diferentes fuentes  
125 para la eliminación de metales pesados de aguas contaminadas. Entre ellos se  
126 encuentran: los desechos agrícolas [18,19], nanopartículas magnéticas [33],  
127 subproductos industriales [34], materiales naturales [22, 23], biopolímeros  
128 modificados [24, 25, 26], así como los polímeros sintéticos [26, 27, 28, 30, 31].  
129 Entre todos estos materiales se destacan los polímeros sintéticos ya que su  
130 naturaleza orgánica, su bajo costo, su capacidad para ser funcionalizados, la  
131 flexibilidad para ser sintetizados en diversas formas y tamaños, su estabilidad  
132 química, gran capacidad adsorbtiva y buenas propiedades mecánicas, han sido  
133 propuestos como candidatos para la remoción de metales en aguas contaminadas  
134 en las intermediaciones naturales. Estas propiedades únicas han derivado en el  
135 desarrollo de una nueva técnica llamada "Ultrafiltración mejorada por polímeros"  
136 (Polymer enhanced ultrafiltration, PEUF), la cual se basa en la explotar la  
137 interacción entre los metales y una membrana polimérica para retenerlos  
138 (selectiva o no selectivamente) y separarlos del agua [31, 32]. PEUF se ha  
139 convertido hoy en día en una alternativa promisoría para la remoción y  
140 recuperación de metales pesados de aguas residuales, los cuales generalmente

141 se encuentran a bajas concentraciones cuando la precipitación de los metales no  
 142 es viable [32, 33, 34, 35, 36] o incluso, residuos tóxicos radiactivos [37, 38].  
 143 El PVA es un material atractivo para el desarrollo de nuevas membranas para  
 144 PEUF. Entre sus características destacan su biodegradabilidad, hidrofiliidad,  
 145 resistencia térmica, estabilidad ante diferentes solventes y condiciones de pH, alto  
 146 potencial antiincrustante y sobretodo su alta permeabilidad al agua [54]. Sin  
 147 embargo, el PVA por sí solo no puede emplearse dada su solubilidad en agua.  
 148 Para volverlo insoluble es necesario entrecruzarlo y para ello existen diversas  
 149 metodologías físicas y químicas para entrecruzar el PVA cada una con ventajas y  
 150 desventajas que deben tomarse en cuenta para su potencial aplicación en PEUF.  
 151 En la tabla 1 se presenta un resumen con las principales metodologías de  
 152 entrecruzamiento las cuales se resumen en la tabla 1.

153 **TABLA 1.** Estado del arte de los materiales entrecruzados de PVA.  
 154

Método de entrecruzamiento del PVA	Ventajas	Desventajas	Referencia
Inducción de la cristalización por congelamiento-descongelamiento (-20° C/+25° C, 10 veces).	No hay necesidad de adición de otros químicos.	Entrecruzamiento menos estable comparado con los métodos químicos	[55]
Calentamiento (120–175° C, 30–80 min).	No hay necesidad de adición de otros químicos. Mejor comportamiento ante la compresión en comparación con el entrecruzamiento químico.	Estudios de desalinización por ósmosis reversa (RO) mostraron que el calentamiento impacta de manera inversamente proporcional a la permeabilidad de las membranas.	[41, 42]
Deshidratación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> depositadas en membranas de polietersulfona (PES) (100–125° C, 10–30 min).	Estudios de desalinización por RO mostraron un rechazo de NaCl de 70-85% a 2 MPa de presión en comparación con el 55% obtenido para entrecruzamientos más laxos preparados en condiciones más suaves.	Flujos bajos de agua a través de la membrana con alto entrecruzamiento (29–33 L/m <sup>2</sup> h) en comparación con entrecruzamientos más laxos (63 L/m <sup>2</sup> h).	[58]

Radiación con $^{60}\text{Co}$	Permeabilidad al agua mayor que las membranas de PVA con entrecruzamiento químico.	Baja razón de hinchamiento/secado (5.3-2.6). Baja repulsión de NaCl en RO.	[59]
Oxidación vía radicales libres con persulfato en la forma de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	Repulsión de $\text{MgSO}_4$ de hasta 80%.	Flujo bajo de agua a través de la membrana (42 L/m <sup>2</sup> h con 2 MPa).	[60]
Reacción con ácidos carboxílicos: reacción entre PVA y ácido oxálico, malónico y cítrico en presencia de $\text{H}_2\text{SO}_4$ como catalizador a 90-120° C sobre membranas de PES.	Los mejores resultados se obtuvieron con ácido oxálico con 95% de repulsión de sal en experimentos de desalinización por RO con 4 MPa de presión.	Flujo de agua a través de la membrana muy bajo.	[61]
Reacción con ácidos carboxílicos: ácido málico (90 min a 140° C).	Mejor entrecruzante que el GA. Utilizado para separar mezclas de agua/ácido acético y agua/alcoholes alifáticos. Estable en solventes polares y no polares.	Soluble en agua caliente (aunque insoluble en agua fría).	[48, 49, 50]
Reacción con ácidos carboxílicos: ácido poliacrílico (150° C, 1h).	Utilizado para separar mezclas de metanol/metil <i>tert</i> -butil éter, así como mezclas de agua/etanol.	La separación se lleva a cabo a 50° C.	[51, 52]
Copolímeros alternantes de poli (vinil metil éter) con anhídrido maleico para entrecruzar PVA en presencia de poli(estireno sulfonato) sódico.	La repulsión de sales y permeabilidad de la membrana dependen de su composición.	Material frágil y débil.	[67]
Reacción con alcoxisilanos:	Al hacer fluir una solución de etanol al 85% se observó	Velocidad de permeación disminuída de	[68]

tetraetoxisilano (TEOS)	un incremento en la selectividad de la permeabilidad de la membrana proporcional a la cantidad de TEOS.	manera proporcional a la cantidad de TEOS.	
Reacción con aldehídos (GA)	Permeable tanto a sales como agua. Fuerte afinidad por proteínas (retención de 100% de albúmina). Superficie potencialmente modificable (inmovilización de enzimas). En procesos de ultrafiltración (UF) ha demostrado retener >90% del aceite de soja en una mezcla agua/aceite (1.35 g/L) a flujos de 360 L/m <sup>2</sup> h.	Su afinidad por proteínas podría interferir en un tratamiento "real" de agua que contienen proteínas, posiblemente al comprometer los sitios de interacción con sales.	[48, 49, 50, 52]
Reacción con aldehídos (GA): PVA se hizo reaccionar con acetaldehído, se moldeó en una solución de dimetilacetamida y posteriormente se entrecruzó con GA a T ambiente.	Se evaluó el material en un proceso de ultrafiltración de albúmina, exhibiendo mejor permeación al agua, buena retención de albúmina y menor incrustamiento comparado con membranas comerciales.	El poli (vinil acetal) tiene una temperatura de hidrólisis más baja en comparación con poli (vinil formal) y poli (vinil butiral).	[73]
Reacción con aldehídos (Acroleína): La reacción entre PVA y acroleína se llevó a cabo en presencia de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 135° C durante 15	Por experimentos de desalinización de agua de mar artificial por RO se logró una repulsión de sal del 96.5-	La acroleína es tóxica para plantas acuáticas y moluscos.	[74]

minutos sobre un soporte de polisulfona. 96.7% con una presión de 10 MPa.

Reacción con aldehídos: FA (200° C, 10 min). Estabilidad en presencia de ácidos y bases. Entrecruzamientos con FA arrojaron membranas de baja absorción de agua y permeabilidad. [75]

Reacción con aldehídos: FA (50° C, 2h). Experimentos de desalinización por RO arrojaron de sal del 93-97% en pruebas de RO a 4 MPa. Y 90% con 10 MPa. Un derivado de este material modificado con cloruro de estearoilo ha sido exitoso para la absorción de petróleo en mezclas agua/hidrocarburos. Los numerosos grupos hidroxilo de la red restringen su uso en materiales hidrofóbicos como absorbentes de hidrocarburos. [60, 62]

155

156

157

---

158 Los trabajos resumidos en la tabla 1, sugieren que un entrecruzamiento moderado  
159 (condiciones suaves de síntesis) del PVA con FA, dará como resultado una red  
160 con excelentes propiedades mecánicas y de permeabilidad de agua compuesta  
161 por acetales cíclicos rica en grupos hidroxilo con una buena repulsión de sales y  
162 capaz de resistir presiones de hasta 10 MPa de presión en experimentos de  
163 desalinización por RO. Sin embargo, resaltamos enfáticamente que ninguna de  
164 estas membranas ha sido ensayada para la remoción de metales pesados. Con  
165 base en ello, hemos hipotetizamos que posiblemente los grupos hidroxilo de la  
166 retícula, podrían emplearse como un intercambiador catiónico de metales pesados  
167 en aguas contaminadas.

168 Sorprendentemente, pese a lo prometedor de las membranas de PVA para la  
169 remoción de metales pesados, son pocos los trabajos que se han enfocado en  
170 ello. Podemos destacar entre éstos, el trabajo de Pan y colaboradores quienes  
171 sintetizaron una esponja de PVA y FA formado mediante una polimerización redox  
172 con injertos de acrilamida y una hidrólisis adicional en condiciones alcalinas. para

173 la retención de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  con capacidades de adsorción en el equilibrio a  
174 temperatura constante ( $Q_e$ ) de 2.50, 3.26 and 3.15  $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Sus  
175 datos de adsorción tuvieron un buen ajuste a una cinética de absorción de pseudo  
176 segundo orden y por datos de espectroscopía infrarroja por transformada de  
177 Fourier (FTIR) los autores propusieron que la adsorción de los cationes metálicos  
178 está mediada por los grupos carboxilatos [77]. Una modificación a este material  
179 que consiste en un entrecruzamiento previo con GA a la polimerización con injerto  
180 de acrilamida y la subsecuente hidrólisis alcalina, demostró una notable mejoría en  
181 la capacidad adsorbtiva del material de hasta  $360\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  de agua desionizada,  
182 aunque no se evaluó la capacidad de absorción de metales [78].  
183 Asimismo se ha evaluado un composito de PVA y quitosán para la absorción de  
184 metales con buenos resultados de desorción y reusabilidad de las membranas [65,  
185 66, 32]. Sin embargo, la desventaja de este material es que existen diferentes  
186 afinidades para cada uno de los cationes evaluados:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ . Las  
187  $Q_e$  respectivas obtenidas para cada catión fueron de  $45\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $40\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $20$   
188  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $25\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Así pues, cuando los cationes se encuentran solos cada un  
189 exhibe una eficiencia de absorción del 98.77%, 98.61%, 66.37%, 70.16%,  
190 respectivamente. Pero cuando los cuatro cationes se encuentran presentes al  
191 mismo tiempo, las eficiencias de absorción disminuyeron a 93.9%, 77.85%,  
192 10.93% y 21.31%, respectivamente.

193 Algunos autores han evaluado recientemente el comportamiento de PVA en  
194 conjunción con diferentes nanopartículas. Por ejemplo, Xiao y colaboradores  
195 sintetizaron un composito de quitosán, PVA y nano-rodillos de  $\text{CuO}$  cuya superficie  
196 con grupos carboxilo, amina e hidroxilo mostró una buena afinidad por  $\text{Pb}^{2+}$   
197 exhibiendo una  $Q_e$  de  $116.84\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  a pH 5, aunque cabe señalar que en este  
198 estudio no se comparó este comportamiento en presencia de otros cationes para  
199 evaluar la afinidad relativa [81]. She y colaboradores por su parte evaluaron un  
200 composito de nanofibrillas de celulosa con PVA entrecruzado con ácido acrílico  
201 obteniendo membranas con una  $Q_e$  de  $30\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $131.5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  para  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$   
202 respectivamente [82]. Cabe destacar de este estudio que las membranas obtenidas  
203 por los autores exhibieron una buena reusabilidad manteniendo una eficiencia de  
204 88%-89% después de 5 usos. Una ligera mejoría de la adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  la  
205 obtuvieron Mallakpour y colaboradores con el nanocomposito de PVA con  
206 nanopartículas de carbonato de calcio modificadas con  $\gamma$ -aminopropil trietoxi  
207 silano, logrando una  $Q_e$  de  $45.5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . En este mismo estudio los autores  
208 mencionan que su material es una buena barrera para el oxígeno, sin embargo no  
209 discuten sobre su permeabilidad al agua [83]. Varios autores han explorado la  
210 combinación de PVA con nanotubos de carbono (CNT) que han demostrado ser  
211 útiles en la remoción de metales pesados [84]. Thomas y colaboradores evaluaron  
212 el desempeño de CNT sobre PVA logrando una adsorción del 80% de  $\text{Pb}^{2+}$  de una  
213 solución inicial de  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  [85]. En este estudio no se evaluó la eficiencia de  
214 adsorción dependiendo variando la concentración de  $\text{Pb}^{2+}$  por lo que es difícil  
215 establecer una comparación con otros datos de la literatura, sin embargo vale la  
216 pena resaltarlo ya que la eficiencia de adsorción fue independiente del pH (ácido,  
217 neutro o alcalino). Posteriormente Zarghami y colaboradores evaluaron un  
218 composito de PVA, quitosán y CNT obteniendo una  $Q_e$  para  $\text{Pb}^{2+}$  de  $100\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , y  
219 para  $\text{Zn}^{2+}$  de  $80\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  [86]. Existen múltiples limitantes para la aplicación de los



220 CNT que inclinen la balanza hacia del beneficio *versus* su costo. Aún es necesaria  
221 más investigación que demuestre su aplicabilidad en gran escala, así como  
222 abaratar los costos de su producción. Sin embargo la principal limitante del uso de  
223 los CNT es su elevada toxicidad la cual ha sido documentada por múltiples  
224 autores [74, 75, 76]

225 En síntesis, se han propuesto y caracterizado una serie de materiales con  
226 potencial para la remoción de metales pesados; sin embargo, estos estudios se  
227 han centrado en uno o pocos cationes sin considerar que en las aguas  
228 contaminadas existen muchos de ellos, además de la presencia de compuestos  
229 orgánicos que pudieran comprometer el desempeño del material. Aunado a ello,  
230 muchos de ellos trabajos reportan un desempeño en condiciones limitantes,  
231 principalmente de pH generalmente ácidos o diferentes al que se encuentra en  
232 una muestra real.

233 Por ello, en el presente trabajo presentamos un material que reúne las  
234 características de permeabilidad, flujo y presión de trabajo adecuadas para su  
235 aplicabilidad a gran escala tratamiento de aguas, así como resultados  
236 experimentales de adsorción de mezclas de metales en laboratorio en función del  
237 grado de entrecruzamiento del material. Adicionalmente presentamos una prueba  
238 de concepto con muestras de agua contaminadas “reales” de un río mexicano.  
239

240

## 241 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

242

243 **FIGURA 1.** Reacción de polimerización entre el PVA (A) y FA (B) para formar la  
244 red de acetales cíclicos que constituyen al PFA (C).

245 **FIGURA 2.** Análisis de FTIR del PVA (espectro superior), FA (espectro medio) y  
246 PFA (espectro inferior). En la figura se señalan los principales grupos funcionales.  
247 La región resaltada en amarillo señala el intervalo de número de onda entre 3550-  
248 3200 donde absorben los oxidrilos de los enlaces intra e intermoleculares). La  
249 región verde señala la región de número de onda entre 2830-2695 donde un pico  
250 indica la presencia de -CH de los grupos alquilo y un doblete indica la presencia  
251 de -CH de aldehídos. La región resaltada en rosa, comprendida entre el número  
252 de onda de 1740-1720 correspondiente a los carbonilos (-C=O) aldehídicos  
253 alifáticos saturados. Asimismo, en el espectro del PFA se señala un pico a un  
254 número de onda entre 1150-1085 correspondiente al grupo acetal presente  
255 únicamente en el producto de polimerización.

256 **FIGURA 3.** Contenido de agua y porcentaje de hinchamiento como función de la  
257 cantidad de HCl (A y B) y FA en membranas de PFA (C y D). Las barras de error  
258 indican la desviación estándar para n=4.

259 **FIGURA 4.** Efecto del pH en el porcentaje de hinchamiento de las membranas de  
260 PFA. En azul, pH 3. En rojo, pH 7. En verde, pH 12. Las barras de error indican la  
261 desviación estándar para n=3.

262 **FIGURA 5.** Imágenes de SEM de membranas de PFA con diferente grado de  
263 entrecruzamiento modula por el contenido de HCl, el cual se indica en cada  
264 imagen.

265 **FIGURA 6.** Cinética de adsorción de  $Pb^{2+}$  por membranas de PFA en función del  
266 grado de entrecruzamiento por cuantificación colorimétrica con nanopartículas de  
267 oro. A) Espectro de UV-Vis de nanopartículas de oro (azul) y agregados de  
268 nanopartículas de oro con  $Pb^{2+}$  (rojo). B) Curva de calibración del método. C)  
269 Cinética de adsorción de  $Pb^{2+}$  en membranas de PFA como función del grado de  
270 entrecruzamiento modulado por la cantidad de HCl añadido (azul 1%, rojo 5%,  
271 verde 10%).

272 **FIGURA 7.** Adsorción simultánea de Cr, Mn, Fe, Co, Cu y Zn en membranas de  
273 PFA como función del grado de entrecruzamiento a pH neutro y 25° C. En negro  
274 se indica la concentración inicial, en dorado la adsorción en membranas de PFA  
275 con 10% de HCl, en azul la adsorción en membranas de PFA con 5% de HCl y en  
276 gris la adsorción en membranas de PFA con 1% de HCl. Las barras de error  
277 representan la desviación estándar para n=3.

278 **FIGURA 8.** Remoción de metales pesados y metaloides de muestras de agua del  
279 río Atoyac a 25° C y pH neutro con membranas de PFA sintetizadas con 1% de  
280 HCl v/v. En rojo se indican los valores que indica la NOM-127-SSA1-1994 para  
281 aguas que pueden ser sometidas a un proceso de potabilización.

282 **FIGURA 9.** Propiedades mecánicas del PFA como función del grado de  
283 entrecruzamiento. A) Fuerza de fractura. B) Módulo de Young. C) Esfuerzo de  
284 cedencia. D) Deformación elástica. Las barras de error indican la desviación  
285 estándar para n=6.

286 **FIGURA 10.** Voltametría cíclica de membranas de PFA que contienen 1% de HCl  
287 A) deshidratadas y B) hidratadas.

288

289

## 290 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

291

292 La presente invención consiste en la utilización del PFA como un intercambiador  
293 catiónico de metales pesados en el tratamiento de aguas contaminadas.

294 La reacción de síntesis se muestra en la figura 1, la cual se llevó a cabo  
295 modificando los métodos previamente reportados por [89, 90] como se detalla en  
296 la sección de materiales y métodos.

297 La estructura química esperada se corroboró mediante un análisis por FTIR donde  
298 se identificaron los principales grupos funcionales señalados en la figura 2.

299 Posteriormente se obtuvieron membrana con distinto grado de entrecruzamiento.

300 Para ello se varió la cantidad de agente entrecruzante (FA) y/o catalizador (HCl)  
301 obteniéndose membranas con diferente contenido de agua y grado de

302 hinchamiento como se muestra en la figura 3. Nuestros resultados arrojaron que

303 es la variación de HCl lo impacta mayoritariamente en el hinchamiento ni en el

304 contenido de agua del PFA puesto que incluso las cantidades más bajas que se

305 evaluaron de 1%, 5% y 10% tienen un impacto significativo en las propiedades del

306 PFA y no así el FA, el cual hasta incrementos superiores al 30% se aprecia un

307 efecto.

308 Por otra parte, el pH impacta pobremente en el hinchamiento de la membrana de

309 PFA como se muestra en la figura 4. Donde se evaluó el transporte de agua a

310 través de la membrana con un buffer salino a pH de 3, 7 y 12. Esto supone una  
 311 ventaja para aplicaciones de tratamiento de agua, pues independientemente del  
 312 pH el desempeño de las membranas no se verá comprometido.  
 313 Con base en ello, decimos trabajar con distintos grados de entrecruzamiento  
 314 modulados por el contenido de HCl. Las membranas de PFA se observaron  
 315 mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), donde se aprecia los acetales  
 316 de estructuran en una red tridimensional compuesta de microfibras entrecruzadas  
 317 cuyo entramado se vuelve más cerrado de manera proporcional a la cantidad de  
 318 HCl utilizado en la síntesis. Con la cantidad máxima de HCl evaluada (20% v/v) se  
 319 observó por primera vez que PFA se estructura en microesferas de  
 320 aproximadamente 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro (figura 5).  
 321 Dada la estructura química se espera que la membrana posea carga negativa por  
 322 lo cual evaluamos su potencial para utilizarse como un intercambiador catiónico  
 323 para la retención de metales pesados.  
 324 Para sustentar nuestra hipótesis se realizó un primer experimento donde se realizó  
 325 una adsorción en sistema tipo lote, donde se puso en contacto con membranas de  
 326 PFA de diferente grado de entrecruzamiento con una solución 50 mM de  $\text{Pb}^{2+}$ .  
 327 Nuestros resultados indicaron que el PFA es capaz de retener hasta 120 mg de  
 328  $\text{Pb}^{2+}$  por cada gramo de material y además que la adsorción de  $\text{Pb}^{2+}$  en el  
 329 entrecruzamiento más laxo. Asimismo, observamos que la adsorción de  $\text{Pb}^{2+}$  era  
 330 inversamente proporcional al grado de entrecruzamiento (figura 6). Así pues, como  
 331 se aprecia en la figura 6 cuando se añade 1% v/v de HCl la adsorción de  $\text{Pb}^{2+}$  es  
 332 mayor con respecto a 5% v/v de HCl. Para el caso de 20% v/v de HCl la adsorción  
 333 es tan pobre que no sobrepasa el nivel del ruido del experimento.  
 334 Con esta primera evidencia de retención de  $\text{Pb}^{2+}$  decidimos evaluar el  
 335 comportamiento del PFA ante distintos cationes metálicos en concentraciones  
 336 aproximadamente equimolares. Nuestros resultados corroboraron que  
 337 efectivamente la capacidad adsortiva de cationes metálicos era inversamente  
 338 proporcional al grado de entrecruzamiento (figura 7). Bajo nuestras condiciones,  
 339 no fue posible determinar si existía una adsorción preferencial entre los metales  
 340 evaluados pues la proporción adsorción/entrecruzamiento fue comparable en  
 341 todos los casos. En la tabla 2 se muestran los valores de  $Q_e$  para cada caso.  
 342 Nótese que Iso valores de  $Q_e$  de las membranas de PFA con 1% HCl resultan  
 343 mucho mpas eficientes con las reportadas anteriormente en la literatura, además  
 344 de ser útiles para una amplia gama de metales presentes simultáneamente en  
 345 mezclas complejas.

346  
 347 **TABLA 2.** Valores de  $Q_e$  para diferentes grados de entrecruzamiento de PFA a pH  
 348 neutro y 25° C. Las concentraciones iniciales experimentales para cada metal se  
 349 muestran en la figura 7.

	Cr [ $\text{mg g}^{-1}$ ]	Mn [ $\text{mg g}^{-1}$ ]	Fe [ $\text{mg g}^{-1}$ ]	Co [ $\text{mg g}^{-1}$ ]	Cu [ $\text{mg g}^{-1}$ ]	Zn [ $\text{mg g}^{-1}$ ]
PFA-1	79.7±2.76	181±15.5	118±3.50	115±8.19	142±3.56	132±7.01
PFA-5	45.8±1.68	107±4.48	68.8±2.40	58.8±5.73	74.6±4.54	50.02±2.28
PFA-10	23.8±4.63	73.6±9.40	ND	23.5±6.89	23.9±8.98	ND

350 PFA-1: PFA con 1% de HCl, PFA-5: PFA con 5% de HCl, PFA-10: PFA con 10%  
351 de HCl, ND: No determinado.

352

353 Sin embargo, como se ha enfatizado anteriormente la mayoría de los artículos  
354 publicados estudian el comportamiento de los materiales bajo condiciones ideales;  
355 es decir, en el pH más favorable y sin considerar las interacciones con otros  
356 componentes de las aguas contaminadas. Por ello, se evaluó el desempeño de las  
357 membranas de PFA con 1% de HCl (el grado de entrecruzamiento más laxo)  
358 donde se había obtenido la máxima adsorción ante muestras de agua del río  
359 Atoyac.

360 El río Atoyac es el nombre que recibe el río mexicano “Balsas” en la región entre  
361 Puebla y Tlaxcala localizado entre los paralelos 19°06' y 19°40' latitud norte y los  
362 meridianos 97°58' y 98°031' longitud oeste. Esta región recibe múltiples descargas  
363 de aguas residuales de origen urbano, agrícola e industrial. Las muestras fueron  
364 colectadas en la primavera del año 2017 cuando el caudal es más bajo.

365 Recientemente se han reportado niveles alarmantes de contaminación de este río,  
366 y se ha discutido sobre el peligro que suponen a la salud humana e impacto  
367 ecotoxicológico en organismos acuáticos y terrestres. Se estima que el río Atoyac  
368 es contaminado diariamente por 50 municipios de Tlaxcala y Puebla, que  
369 descargan sus aguas residuales al aire libre y por al menos mil industrias que no  
370 cuentan con plantas de tratamiento o no funcionan adecuadamente. Este afluente  
371 es un foco de infección en las poblaciones aledañas que han presentado  
372 hepatitis, cáncer y cólera, asociada. Lo más alarmante es que pese a ello, al  
373 momento no se han propuesto soluciones concretas. De este modo, este es el  
374 primer trabajo con una alternativa viable en términos económicos y funcionales  
375 para la remediación de este y otros afluentes contaminados. Los resultados  
376 obtenidos de la remoción de metales pesados en las aguas del río Atoyac con las  
377 membranas de PFA se muestran en la figura 8.

378 La diferencia substancial entre el experimento de la figura 8 y el resto, es que al  
379 evaluar el desempeño de las membranas de PFA con el agua tomada  
380 directamente del río y cuantificar los cationes metálicos antes y después de la  
381 interacción es que se están considerando todas las posibles interferencias con  
382 materia orgánica, moléculas con carga positiva, y otros cationes no considerados  
383 en el estudio a pH 7 y se demuestra que en esas condiciones las membranas  
384 siguen siendo funcionales como en condiciones de laboratorio. En la figura 8 se  
385 aprecia que hubo una disminución significativa en los niveles de Al, Ti, V, Ni, Sb,  
386 Pb, Mn, Fe, Tl, As en un solo paso; pero no así para Cu y Zn donde no se apreció  
387 una diferencia significativa. Cabe resaltar que el material absorbe tanto cationes  
388 con carga 2+ como 3+ al mismo tiempo. En la figura se muestran también en rojo  
389 los valores que pide la NOM-127-SSA1-1994 para que el agua sea considerada  
390 para su potabilización y como se puede observar en el caso de Pb, Fe y Mn las  
391 concentraciones se reducen incluso para ser aceptadas por la NOM-127-SSA1-  
392 1994, mientras que sorprendentemente para As y Tl la remoción sobrepasó los  
393 límites de detección. En la tabla 3 se muestran los valores de  $Q_e$  y eficiencias  
394 para cada caso.

395

396 **TABLA 3.** Porcentajes de eficiencia de remoción para cada metal o metaloide en  
397 membranas de PFA con 1% de HCl a pH neutro y 25° C.

	% Eficiencia de remoción	SD
Al	43.7	5.90
Ti	42.2	3.01
V	35.5	3.83
Ni	35.5	2.85
Sb	32.7	10.2
Pb	62.3	1.47
Mn	39.3	2.19
Fe	40.5	2.86
Tl	100	0
As	100	0
Cu	ND	ND
Zn	ND	ND

398 SD: Desviación estándar. ND: No determinado.

399

400 Una vez demostrada la eficiencia del material para la adsorción de metales  
401 pesados en aguas contaminadas, se analizaron sus propiedades mecánicas para  
402 evaluar la posibilidad de su aplicación a gran escala. Los resultados se muestran  
403 en la figura 9.

404 El estudio mecánico de PFA, reveló que las propiedades mecánicas pueden  
405 modularse desde las condiciones de síntesis variando el grado de  
406 entrecruzamiento. Nuestros resultados arrojaron que la fuerza de fractura, el  
407 esfuerzo de cedencia y el módulo de Young son los más bajos para la condición  
408 de 1% de HCl v/v, misma condición para la que la adsorción de cationes metálicos  
409 y el contenido de agua (y consecuentemente la permeabilidad) son máximos,  
410 mientras que el hinchamiento es mínimo. Sin embargo, aún son necesarios más  
411 estudios en condiciones de ultrafiltración donde se simulen las presiones y  
412 volúmenes de flujo en condiciones de operación de PEUF a gran escala.

413

414

## 415 **MATERIALES Y MÉTODOS**

416

### 417 **SÍNTESIS DE PFA**

418 Se disolvió PVA (Aldrich, 11773 Mowiol® 20-98, Mw 125,000) en agua bidestilada  
419 hasta una solución al 10% p / v en un baño de agua a 80°C con agitación  
420 magnética. Esta solución se mezcló con diferentes cantidades de FA (Sigma,  
421 252549) y HCl (Sigma, 320331). La reacción se llevó a cabo por 36 h a 25° C con  
422 una posterior etapa de 6 h a 45° C.

423

### 424 **CARACTERIZACIÓN POR FTIR**

425 Se sintetizaron películas delgadas de PFA en 24 placas de pocillos planos  
426 (Costar®, 2548). Se añadieron 0.1 mL de mezcla de PVA al 10% v/v, FA y HCl  
427 como se indica en cada caso siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.  
428 Las películas se secaron en un desecador de vacío en presencia de MgSO<sub>4</sub>  
429 (Merck, 106067) durante 7 días o hasta que el peso en seco permaneció

430 constante. Se obtuvieron espectros infrarrojos de transformada de Fourier (FTIR)  
431 en un rango de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , usando un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum  
432 GX en modo de reflectancia total atenuada (ATR).

#### 433 434 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA Y GRADO DE HINCHAMIENTO

435 Se pesaron muestras secas con forma de disco de membranas de membranas de  
436 PFA pesadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS: 0.9 g de NaCl,  
437 0.038 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.021 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  disuelto en 1 L de agua desionizada) a  
438 diferentes valores de pH. El exceso de agua de la superficie de PFA se eliminó  
439 utilizando papel de filtro. A diversos intervalos de tiempo, las membranas se  
440 retiraron del tampón y se pesaron. El grado de hinchamiento ( $D_s$ ) se calculó de  
441 acuerdo con el uso de la ecuación 1:

$$442$$
$$443 D_s = \frac{W_h - W_d}{W_d} * 100 \text{ (Ecuación 1)}$$
$$444$$

445  $D_s$  significa grado de hinchamiento,  $W_h$  y  $W_d$  son los pesos del hidrogel hidratado  
446 y deshidratado, respectivamente.

447 El porcentaje de agua se determinó hidratando las membranas de PFA  
448 sumergiéndolas en agua desionizada durante 72 horas, posteriormente las  
449 muestras se deshidrataron a 25° C en un desecador en presencia de  $\text{MgSO}_4$   
450 como agente desecante hasta exhibir un peso constante. Mediante la diferencia de  
451 peso húmedo y peso seco se determinó el porcentaje de agua, dependiente del  
452 grado de entrecruzamiento.

#### 453 454 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)

455 Las imágenes de SEM de las membranas deshidratadas de PFA se obtuvieron  
456 con un microscopio utilizando un JSM 5600-LV microscopio.

#### 457 458 CUANTIFICACIÓN DE $\text{Pb}^{2+}$

459 La cuantificación de  $\text{Pb}^{2+}$  se llevó a cabo siguiendo la metodología previamente  
460 reportada por [92]. El método consiste en que la presencia de  $\text{Pb}^{2+}$  en la  
461 suspensión de oro coloidal causa un cambio en la absorbancia de 570 nm a 595  
462 nm. El cambio en la absorbancia se atribuye al cambio en el tamaño de las  
463 nanopartículas de oro las cuales se agregan ante la presencia de éste.

#### 464 465 CUANTIFICACIÓN DE METALES PESADOS Y METALOIDES

466 La adsorción de los metales y metaloides en las membranas de PFA se realizaron  
467 a pH neutro y temperatura ambiente (25° C) en experimentos tipo lote. 10 mL de  
468 las muestras se filtraron por membranas de nylon con un tamaño de poro de 0.45  
469  $\mu\text{m}$  (Sigma, WHA7404004). Las soluciones se dejaron interaccionar con las  
470 membranas de PFA de masa conocida durante 24 h. Al término de este tiempo se  
471 colectaron, se acidificaron con 1% de  $\text{HNO}_3$  (Sigma, 695025) y se analizaron  
472 mediante espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado  
473 inductivamente (ICP-MS) en un espectrómetro modelo iCAP Qc de la marca  
474 Thermo Scientific. El instrumento fue optimizado previamente al análisis de las  
475 muestras, con una solución certificada acuosa de la marca High Purity Standards

476 la cual contiene un amplio intervalo de masas (Li, Co, In, Ba, Bi, Ce y U de 1 µg L<sup>-1</sup>  
477 respectivamente).

478 Para el análisis de metales, se realizó una curva de calibración se realizó con 16  
479 puntos (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 y 500 µg L<sup>-1</sup>)  
480 <sup>1</sup>), a partir de una solución madre multielemental (QCS-26). El drift instrumental se  
481 corrigió con el estándar interno Indio (In de 10 µg L<sup>-1</sup>). Los límites de detección se  
482 calcularon mediante la siguiente ecuación:

483

$$484 \quad L. D. = \frac{3(SD \text{ int } BCO)(conc \text{ STD})}{(int \text{ STD} - prom \text{ int } BCO)} \text{ (Ecuación 2)}$$

485 Donde:

486 *SD int BCO* – Desviación estándar de la intensidad del blanco

487 *conc STD* – Concentración de la solución estándar

488 *int STD* – Intensidad de la solución estándar

489 *prom int BCO* – Promedio de la intensidad del blanco

490

491

## 492 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS

493 Se determinaron las propiedades mecánicas del PFA con diferente grado de  
494 entrecruzamiento mediante compresión uniaxial de PFA a 24 ° C y 65% de  
495 humedad relativa con una máquina de prueba mecánica (MTS, modelo Sintech 1 /  
496 S, EE. UU.) con una punta plana de cilindro (25 mm de diámetro) a una velocidad  
497 constante de 100 mm min<sup>-1</sup> y una carga nominal de célula de 500 N (353.45 N de  
498 carga efectiva).

499 La fuerza de fractura se calculó de acuerdo con la fuerza máxima en los gráficos  
500 de fuerza vs tiempo. El módulo de Young se calculó a partir de las pendientes de  
501 la deformación (σ) frente a los gráficos de deformación (ε), de la siguiente manera:

502 Módulo joven = (Δσ) / Δε (Ec. 3), donde

503 Δε = Δl / Δl<sub>0</sub> (Eq. 4)

504 Δε se define como la relación entre el alargamiento (Δl) sobre la longitud inicial  
505 (Δl<sub>0</sub>).

506 El esfuerzo de cedencia se calculó a partir del máximo de los gráficos de tensión  
507 Vs deformación.

508 La deformación elástica se calculó por interpolación con la deformación de  
509 rendimiento máxima en un gráfico de tensión frente a gráfico de deformación.

510

511

## 512 RESUMEN

513

514 La presente invención se refiere al uso de microfibras de poli(vinil formal) (PFA)  
515 resultado del entrecruzamiento entre el poli(vinil alcohol) (PVA) y formaldehído  
516 (FA) en presencia de ácido clorhídrico (HCl). El material es capaz de absorber  
517 metales pesados con una eficiencia inversamente proporcional al grado de  
518 entrecruzamiento. Adicionalmente se evaluó su desempeño en una prueba de  
519 concepto con muestras de aguas contaminadas del río mexicano "Atoyac".  
520 Nuestros resultados demostraron que las membranas de PFA con 1% v/v de HCl  
521 son eficaces para la remoción de una gran variedad de metales pesados y

522 metaloides en mezclas complejas de agua, en condiciones de pH neutro y  
523 temperatura ambiente. Dada la sencillez de su síntesis, manejo seguro y sencillo y  
524 bajo coste de producción se presenta la presente invención como una atractiva  
525 tecnología para el tratamiento de aguas contaminadas. Asimismo, se presenta  
526 evidencia preliminar de la posibilidad de optimizar el procedimiento mediante  
527 electrodiálisis y la reutilización de las membranas mediante la aplicación de  
528 diferenciales de potencial.

529

530

## 531 **REIVINDICACIONES**

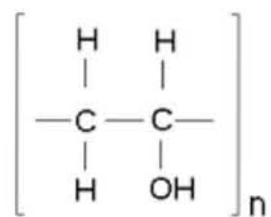
532

- 533 1. Un material polimérico capaz de atrapar cationes de metales pesados y  
534 metaloides en solución acuosa. Esta tecnología es especialmente útil  
535 cuando, como en el caso de las muestras reales, la concentración de  
536 metales y metaloides es tan baja, que la precipitación y floculación no son  
537 viables.
- 538 2. Un intercambiador catiónico para la remoción de sustancias químicas con  
539 carga positiva.
- 540 3. Un material polimérico para la remediación de aguas contaminadas con  
541 potencial para emplearse en sistemas de PEUF y electrodiálisis.

542

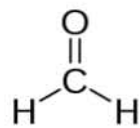
543





A

+



B

25° C, 36 h

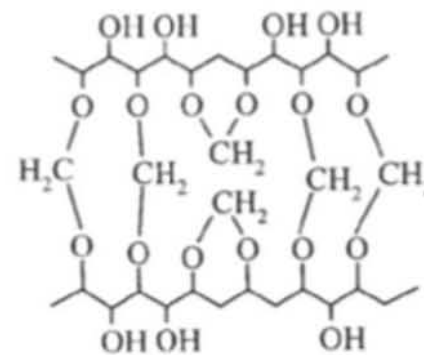


HCl

45° C, 6 h



HCl



C

544

545 **FIGURA 1.**

546

547

548

549

550

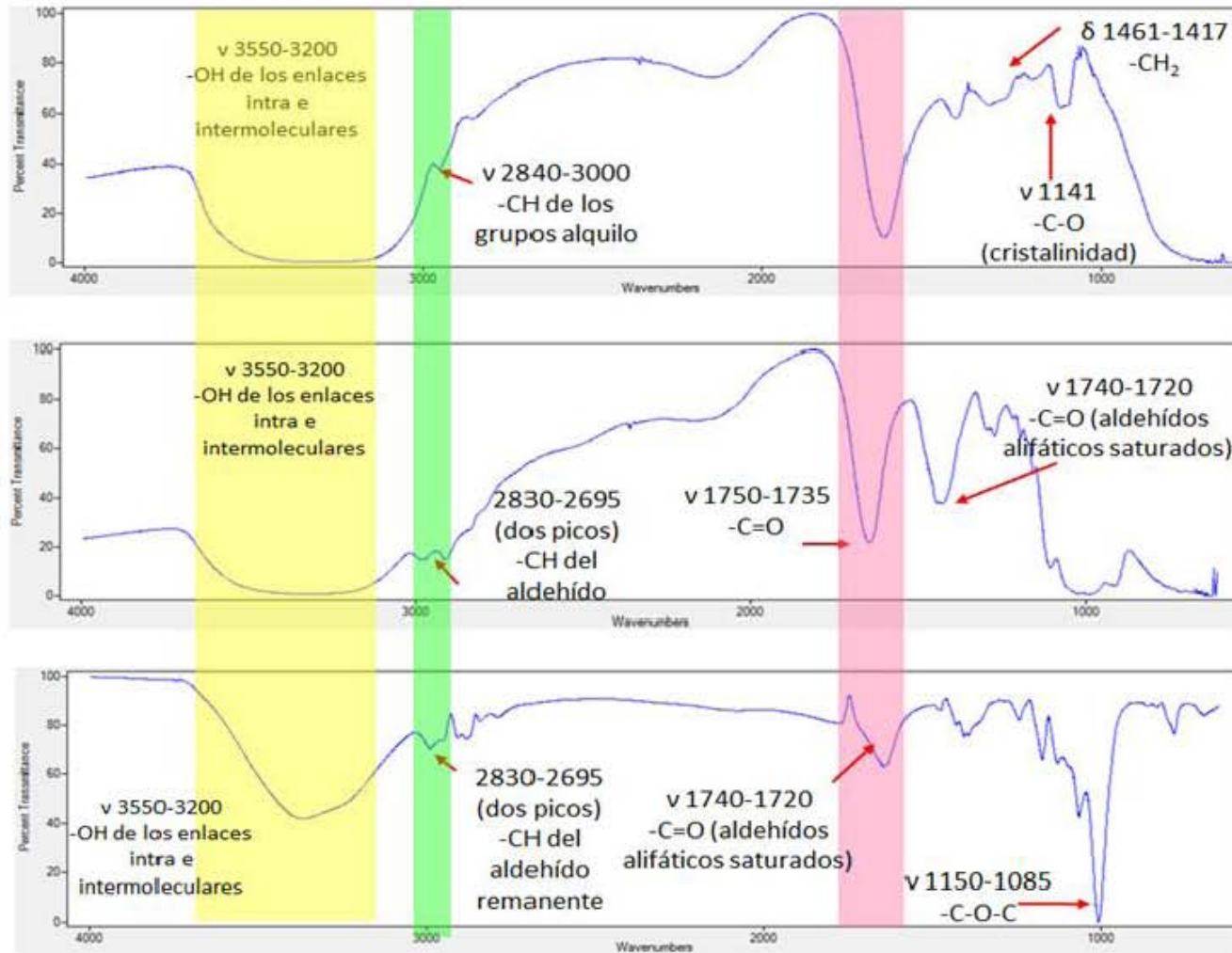
551

552

553

554

555

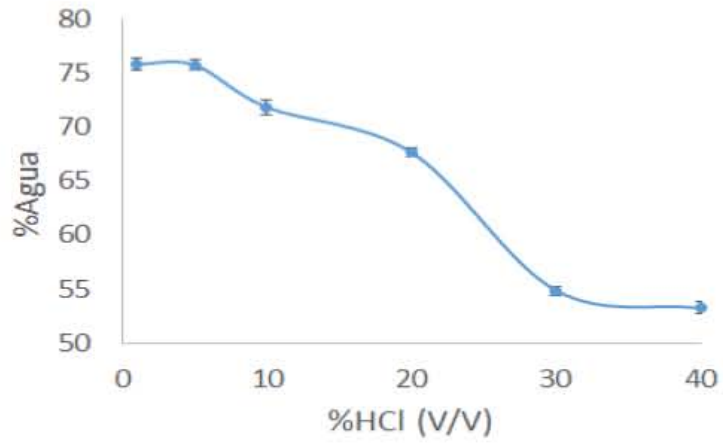


Reducción de  
 la intensidad  
 de la banda del  
 -OH, indica la  
 probabilidad  
 de formación  
 de puentes de  
 acetales

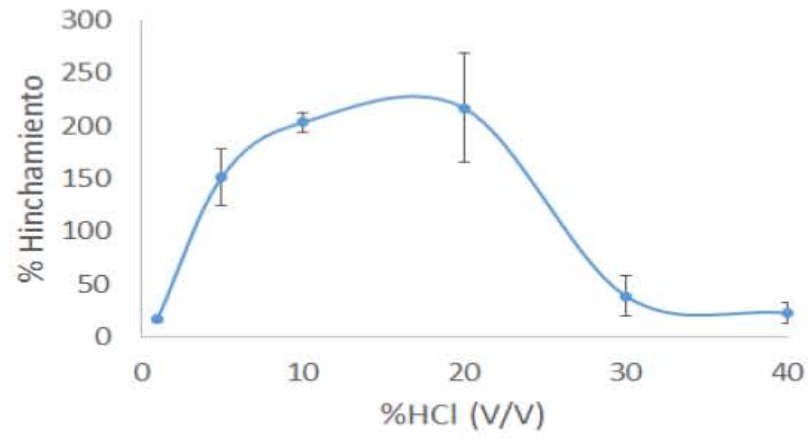
556

557 **FIGURA 2.**

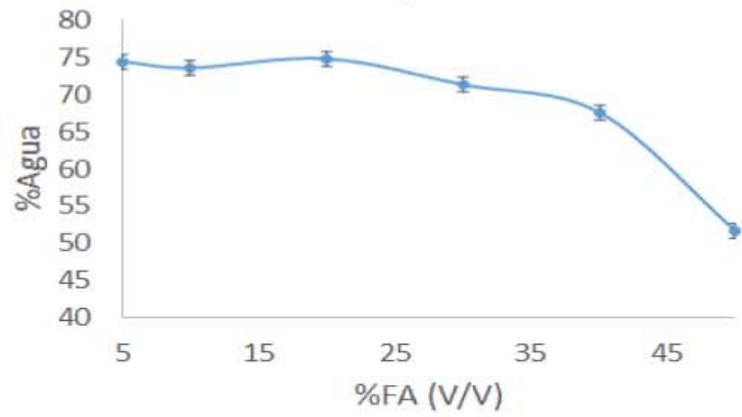
558



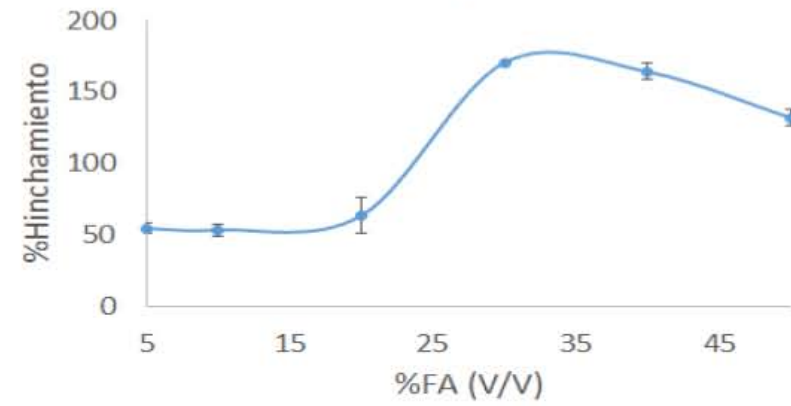
A



B



C



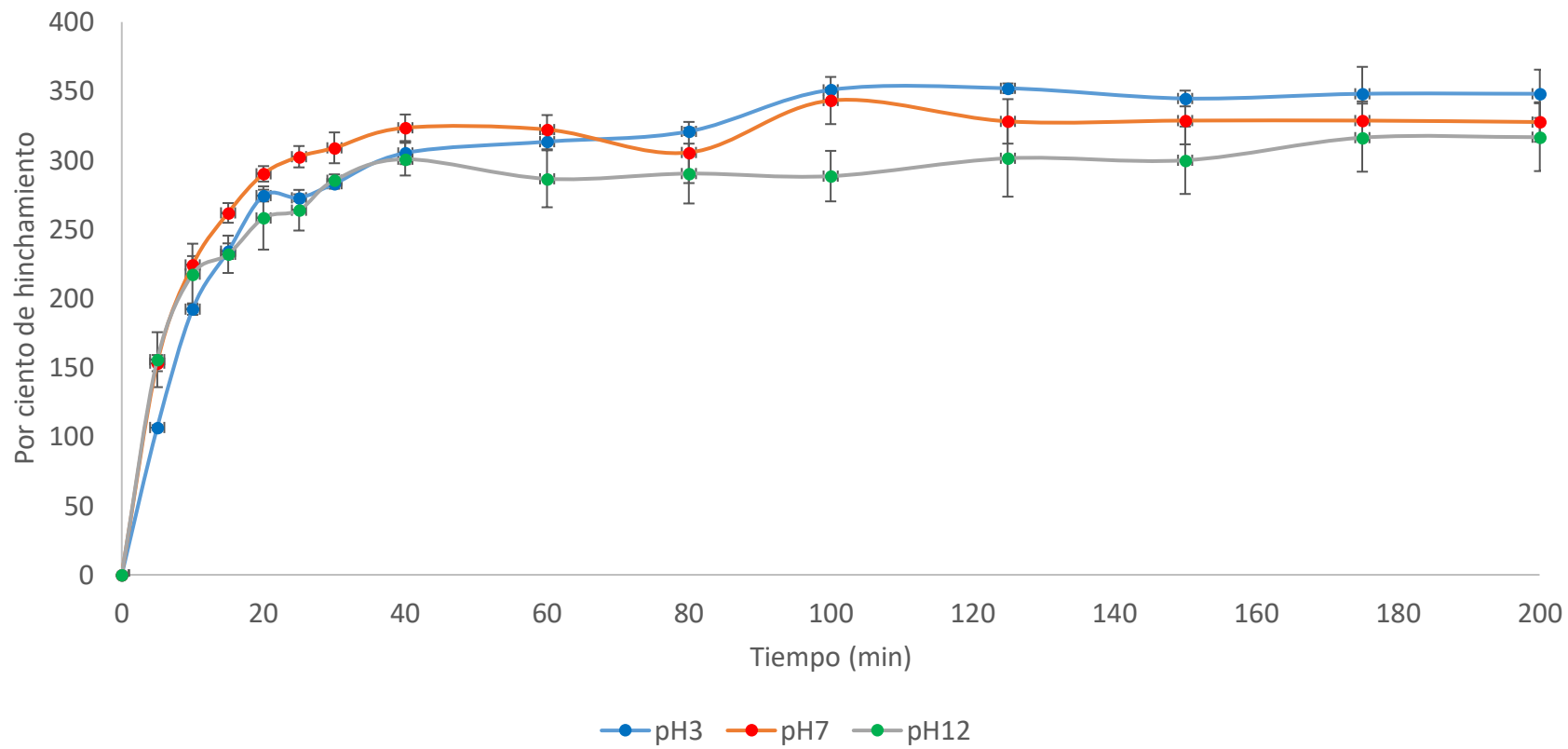
D

559

560 **FIGURA 3.**

561

562

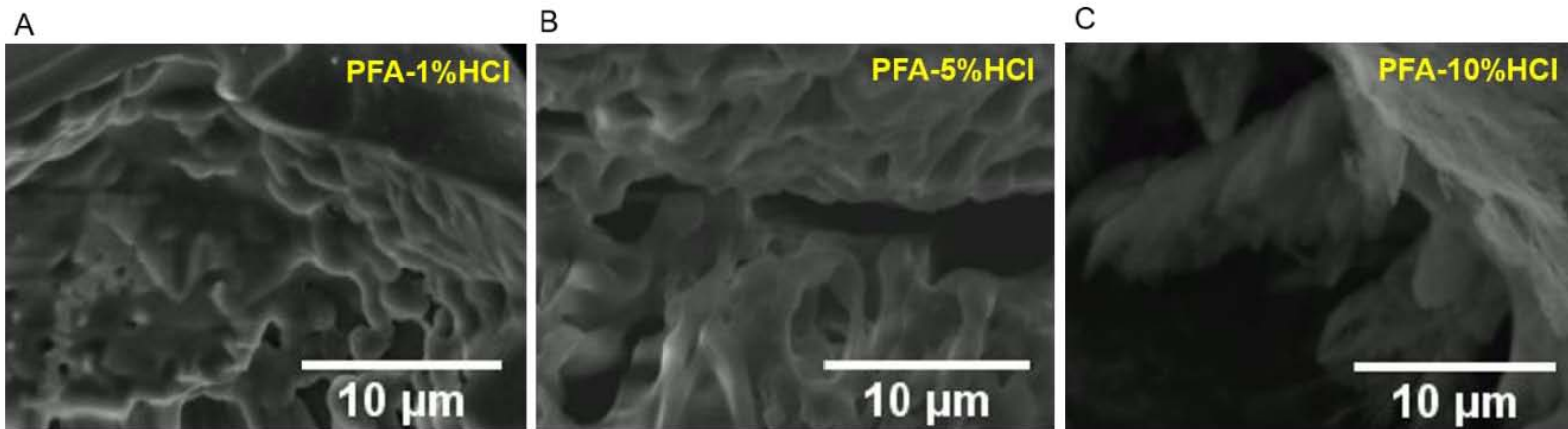


563

564 **FIGURA 4.**

565

566



567

568

569 **FIGURA 5.**

570

571

572

573

574

575

576

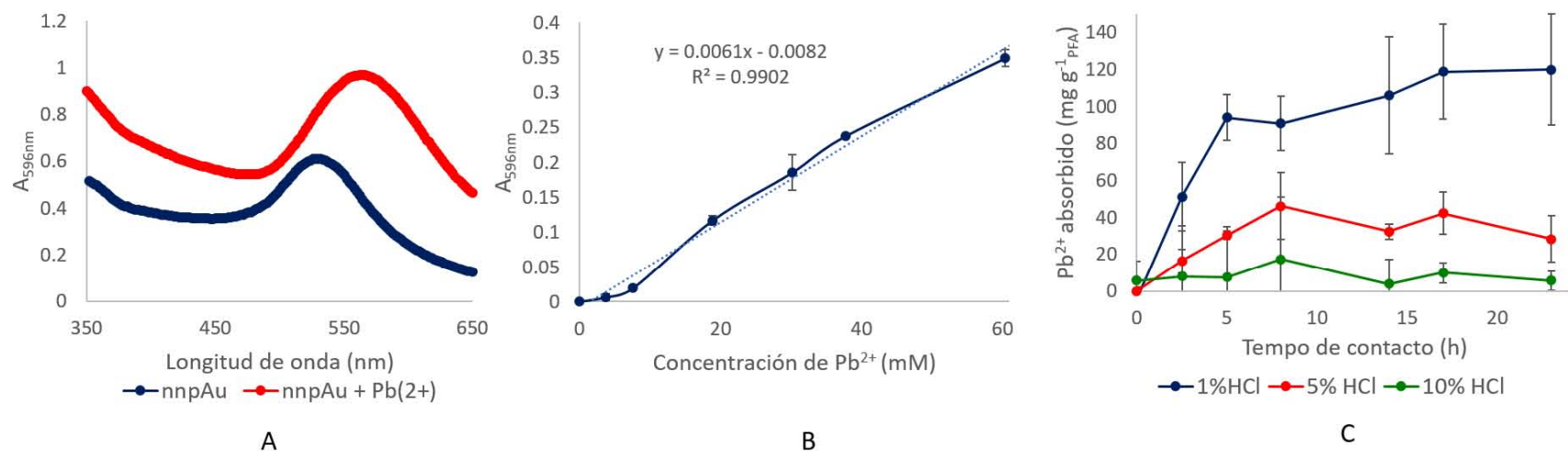
577

578

579

580

581



582

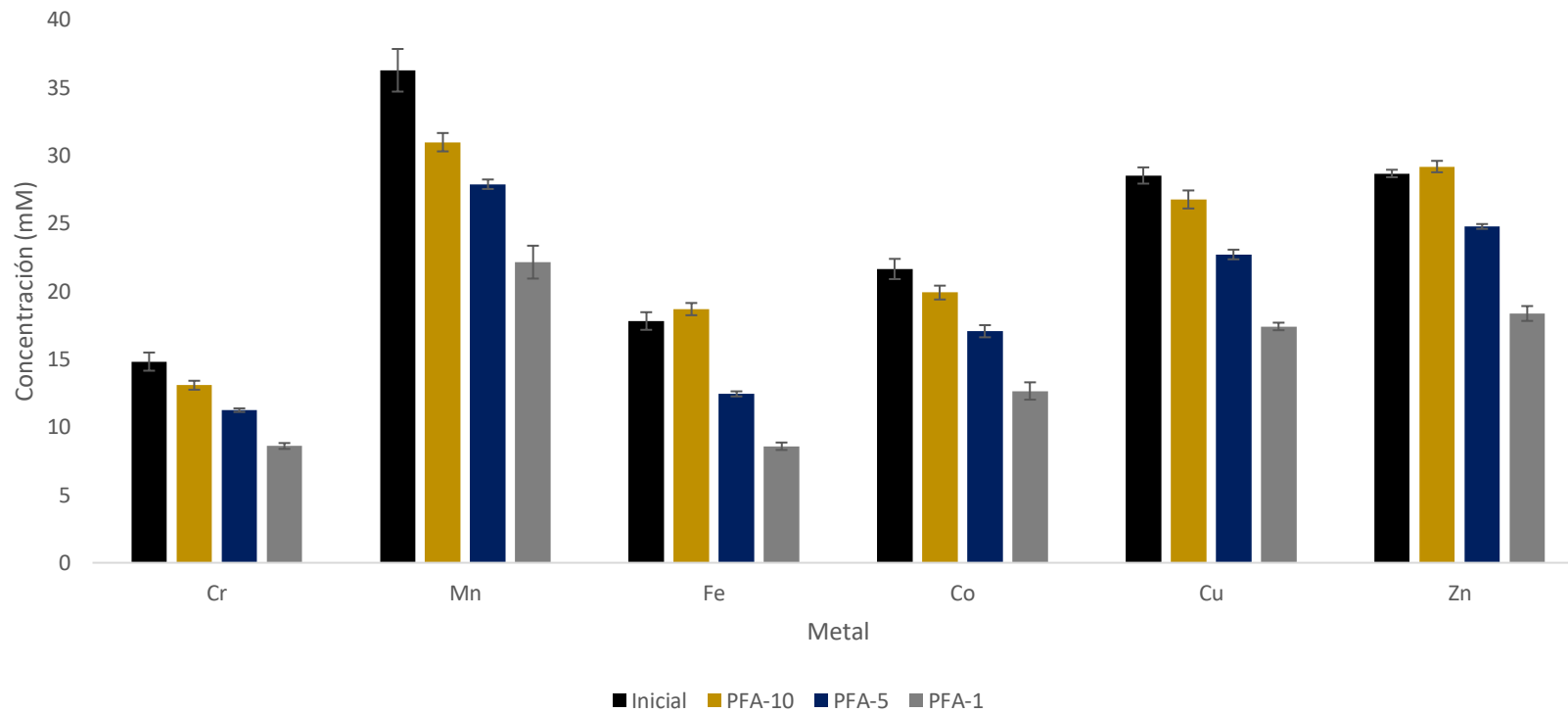
583 **FIGURA 6.**

584

585

586

587



588

589 **FIGURA 7.**

590

591

592

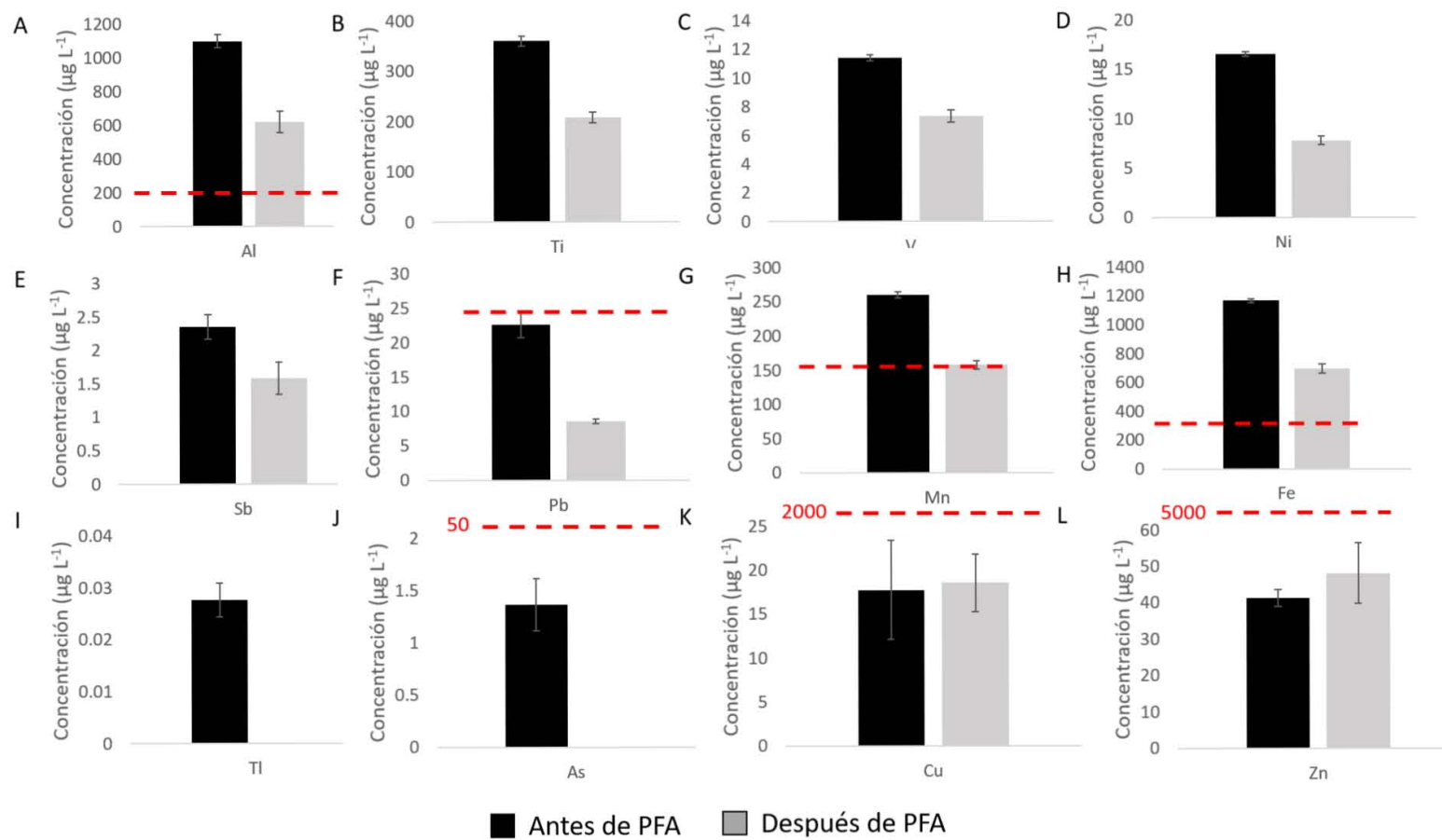
593

594

595

596

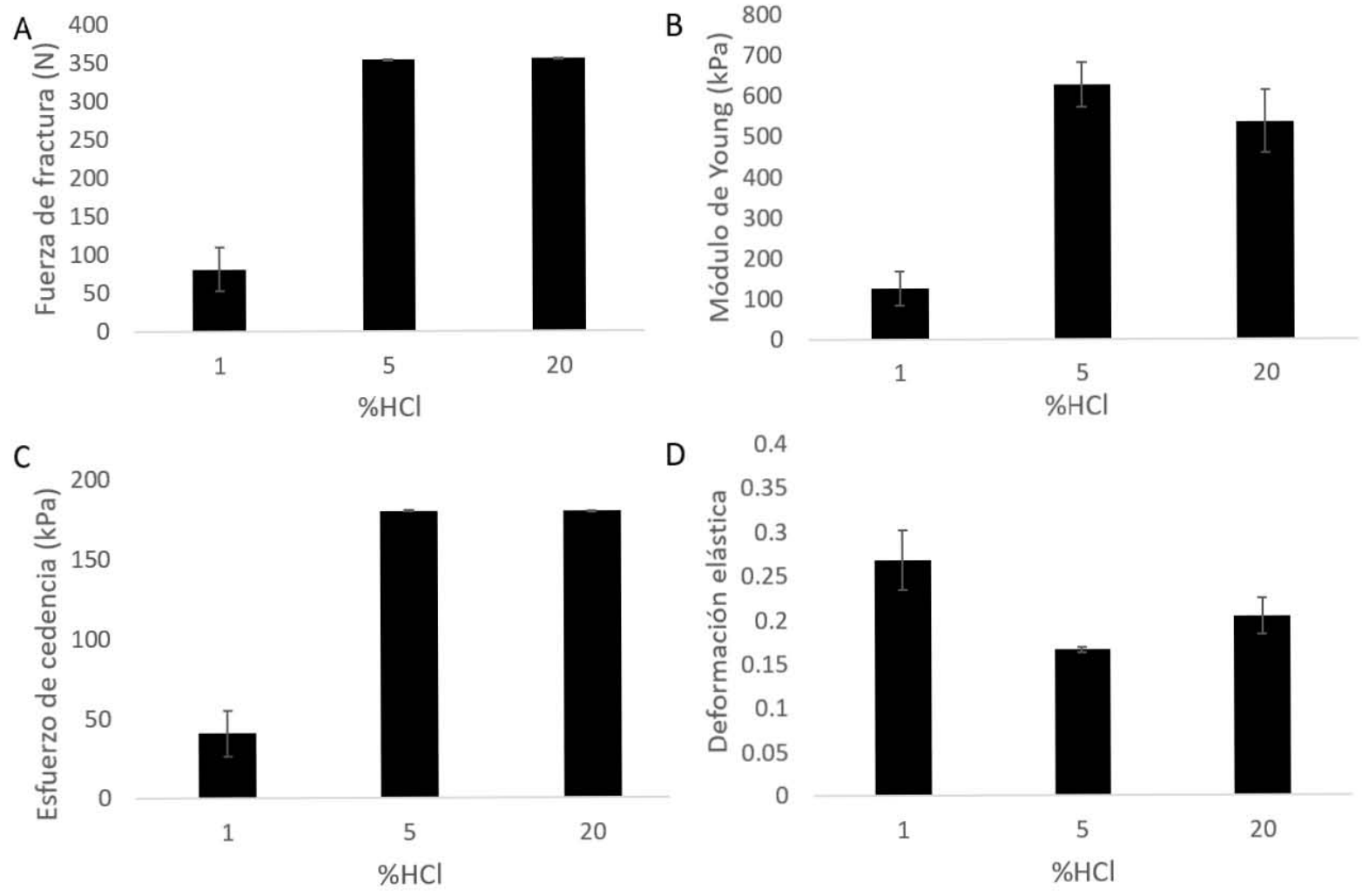
597



598

599 **FIGURA 8.**





600  
601  
602

**FIGURA 9.**

603 **REFERENCIAS**

604

605

- 606 [1] H. Bussey, "A History of Global Metal Pollution A Pivotal Role for Rho," no.  
607 April, 1996.
- 608 [2] F. Fu and Q. Wang, "Removal of heavy metal ions from wastewaters : A  
609 review," *J. Environ. Manage.*, vol. 92, no. 3, pp. 407–418, 2011.
- 610 [3] M. Hejna *et al.*, "Review : Nutritional ecology of heavy metals," no. Table 1,  
611 2018.
- 612 [4] M. A. Armienta and N. Segovia, "Arsenic and fluoride in the groundwater of  
613 Mexico," *Environ. Geochem. Health*, vol. 30, no. 4, pp. 345–353, 2008.
- 614 [5] I. Romieu, L. Lopez, E. Palazuelos, C. Rios, Y. Manuel, and M. Hernandez-  
615 avia, "Environmental Urban Lead Exposure and Blood Lead Levels in  
616 Children of Mexico City," vol. 103, no. 11, pp. 36–40, 1995.
- 617 [6] J. D. Sargent, M. Dalton, and S. Roda, "High Concentrations of Heavy  
618 Metals in Neighborhoods Near Ore Smelters in Northern Mexico," vol. 107,  
619 no. 4, pp. 279–284, 1999.
- 620 [7] I. Romieu, E. Palazuelos, M. H. Avila, C. Jimenez, and G. Cahero, "Sources  
621 of Lead Exposure in Mexico City Sources of Lead Exposure in Mexico City,"  
622 no. May 1994, 2016.
- 623 [8] A. L. Wani, A. Ara, and J. A. Usmani, "Lead toxicity: a review," *Interdiscip.*  
624 *Toxicol.*, vol. 8, no. 2, pp. 55–64, Jun. 2015.
- 625 [9] G. Garcia-Vargas, M. Rubio, L. M. Del Razo, V. Borja-Aburto, E. Vera  
626 Aguilar, and M. E Cebrián, "Lead Exposure in Children Living in a Smelter  
627 Community in Region Lagunera, Mexico," *J. Toxicol. Environ. Health. A*, vol.  
628 62, pp. 417–429, 2001.
- 629 [10] "Low-Level\_Lead\_Exposure\_and\_Childrens\_IQ\_A\_Met.pdf." .
- 630 [11] I. Hern, G. Garc, and L. Lizbeth, "Low lead environmental exposure alters  
631 semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico &," vol.  
632 20, pp. 221–228, 2005.
- 633 [12] J. L. Rosado *et al.*, "Arsenic Exposure and Cognitive Performance in  
634 Mexican Schoolchildren," *Environ. Health Perspect.*, vol. 115, no. 9, pp.  
635 1371–1375, Sep. 2007.
- 636 [13] J. A. Centeno *et al.*, "Pathology related to chronic arsenic exposure.,"  
637 *Environ. Health Perspect.*, vol. 110, no. Suppl 5, pp. 883–886, Oct. 2002.
- 638 [14] L. Smeester and R. C. Fry, "Long-Term Health Effects and Underlying  
639 Biological Mechanisms of Developmental Exposure to Arsenic," *Curr.*  
640 *Environ. Heal. Reports*, 2018.
- 641 [15] I. Razo Soto, L. Carrizales-Yáñez, J. Castro-Larragoitia, F. Díaz-Barriga, and  
642 M. Monroy, *Arsenic and Heavy Metal Pollution of Soil, Water and Sediments*  
643 *in a Semi-Arid Climate Mining Area in Mexico*, vol. 152. 2004.
- 644 [16] C. Jane Wyatt, C. Fimbres, L. Romo, R. O. Méndez, and M. Grijalva,  
645 "Incidence of Heavy Metal Contamination in Water Supplies in Northern  
646 Mexico," *Environ. Res.*, vol. 76, no. 2, pp. 114–119, 1998.
- 647 [17] A. Piñón-Miramontes, M., Bautista-Margulis, R. G., & Pérez-Hernández,  
648 "Removal of arsenic and Fluoride from drinking water with cake alum and a

- 649 polymeric anionic flocculent.," *Fluoride*, vol. 36, pp. 122–128, 2003.
- 650 [18] R. Hurtado-Jiménez and J. Gardea-Torresdey, *Arsenic in drinking water in*  
651 *the Los Altos de Jalisco region of Mexico*, vol. 20. 2006.
- 652 [19] L. Osorio-Rico, A. Santamaria, and S. Galván-Arzate, "Thallium Toxicity:  
653 General Issues, Neurological Symptoms, and Neurotoxic Mechanisms BT -  
654 Neurotoxicity of Metals," M. Aschner and L. G. Costa, Eds. Cham: Springer  
655 International Publishing, 2017, pp. 345–353.
- 656 [20] J. J. Rodríguez-Mercado and M. A. Altamirano-Lozano, "Genetic toxicology  
657 of thallium: a review," *Drug Chem. Toxicol.*, vol. 36, no. 3, pp. 369–383, Jul.  
658 2013.
- 659 [21] Y. Cruz-Hernández *et al.*, "Fractionation and mobility of thallium in areas  
660 impacted by mining-metallurgical activities: Identification of a water-soluble  
661 Tl(I) fraction," *Environ. Pollut.*, vol. 237, pp. 154–165, 2018.
- 662 [22] Gekkan Yakuji, "Pharmaceutical Monthly," Tokio, Japan, 1980.
- 663 [23] A. Demirbas, "Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A  
664 review," *J. Hazard. Mater.*, vol. 157, no. 2, pp. 220–229, 2008.
- 665 [24] N. Verma and R. Sharma, *Bioremediation of Toxic Heavy Metals: A Patent*  
666 *Review*, vol. 11. 2017.
- 667 [25] S. M. A. and M. F. D. Thakur, S., L. Singh, Z. A. Wahid, M. F. Siddiqui,  
668 "Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation,  
669 tolerance mechanism, challenges, and future perspectives," *Env. Monit*  
670 *Assess*, vol. 188, no. 4, 2016.
- 671 [26] T. A. Kurniawan, G. Y. S. Chan, W.-H. Lo, and S. Babel, "Physico-chemical  
672 treatment techniques for wastewater laden with heavy metals," *Chem. Eng.*  
673 *J.*, vol. 118, no. 1, pp. 83–98, 2006.
- 674 [27] R. C. Stover, L. Sommers, and D. J. Silviera, *Evaluation of metals in*  
675 *wastewater sludge*, vol. 48. 1976.
- 676 [28] A. Dąbrowski, Z. Hubicki, P. Podkościelny, and E. Robens, "Selective  
677 removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by  
678 ion-exchange method," *Chemosphere*, vol. 56, no. 2, pp. 91–106, 2004.
- 679 [29] L. Čurković, Š. Cerjan-Stefanović, and T. Filipan, "Metal ion exchange by  
680 natural and modified zeolites," *Water Res.*, vol. 31, no. 6, pp. 1379–1382,  
681 1997.
- 682 [30] H. A. Hegazi, "Removal of heavy metals from wastewater using agricultural  
683 and industrial wastes as adsorbents," *HBRC J.*, vol. 9, no. 3, pp. 276–282,  
684 2013.
- 685 [31] M. Ajmal, R. A. K. Rao, R. Ahmad, and J. Ahmad, "Adsorption studies on  
686 *Citrus reticulata* (fruit peel of orange): removal and recovery of Ni(II) from  
687 electroplating wastewater," *J. Hazard. Mater.*, vol. 79, no. 1, pp. 117–131,  
688 2000.
- 689 [32] S. Babel and T. A. Kurniawan, "Cr(VI) removal from synthetic wastewater  
690 using coconut shell charcoal and commercial activated carbon modified with  
691 oxidizing agents and/or chitosan," *Chemosphere*, vol. 54, no. 7, pp. 951–967,  
692 2004.
- 693 [33] F. Ge, M.-M. Li, H. Ye, and B.-X. Zhao, *Effective Removal of Heavy Metal*  
694 *Ions Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> from Aqueous Solution by Polymer-Modified*  
695 *Magnetic Nanoparticles*, vol. 211–212. 2011.

- 696 [34] D. Feng, J. S. J. van Deventer, and C. Aldrich, "Removal of pollutants from  
697 acid mine wastewater using metallurgical by-product slags," *Sep. Purif.*  
698 *Technol.*, vol. 40, no. 1, pp. 61–67, 2004.
- 699 [35] N. R. Bishnoi, M. Bajaj, N. Sharma, and A. Gupta, "Adsorption of Cr(VI) on  
700 activated rice husk carbon and activated alumina," *Bioresour. Technol.*, vol.  
701 91, no. 3, pp. 305–307, 2004.
- 702 [36] N. H. Baharuddin, N. M. Nik Sulaiman, and M. K. Aroua, "Unmodified starch  
703 as water-soluble binding polymer for chromium ions removal via polymer  
704 enhanced ultrafiltration system," *J. Environ. Heal. Sci. Eng.*, vol. 12, no. 1, p.  
705 61, Mar. 2014.
- 706 [37] T. R. A. Sobahi, M. Y. Abdelaal, and M. S. I. Makki, "Chemical modification  
707 of Chitosan for metal ion removal," *Arab. J. Chem.*, vol. 7, no. 5, pp. 741–  
708 746, 2014.
- 709 [38] D. Soto, J. Urdaneta, K. Pernía, O. León, A. Muñoz-Bonilla, and M.  
710 Fernandez-García, "Removal of heavy metal ions in water by starch esters,"  
711 *Starch - Stärke*, vol. 68, no. 1–2, pp. 37–46, 2016.
- 712 [39] E. Salehi, P. Daraei, and A. Arabi Shamsabadi, "A review on chitosan-based  
713 adsorptive membranes," *Carbohydr. Polym.*, vol. 152, pp. 419–432, 2016.
- 714 [40] A. El-Hag Ali, H. A. Shawky, H. A. Abd El Rehim, and E. A. Hegazy,  
715 "Synthesis and characterization of PVP/AAC copolymer hydrogel and its  
716 applications in the removal of heavy metals from aqueous solution," *Eur.*  
717 *Polym. J.*, vol. 39, no. 12, pp. 2337–2344, 2003.
- 718 [41] H. Kaşgöz, S. Özgümüş, and M. Orbay, "Modified polyacrylamide hydrogels  
719 and their application in removal of heavy metal ions," *Polymer (Guildf.)*, vol.  
720 44, no. 6, pp. 1785–1793, 2003.
- 721 [42] Y. Jiang *et al.*, "Polyaniline-based adsorbents for removal of hexavalent  
722 chromium from aqueous solution: a mini review," *Environ. Sci. Pollut. Res.*,  
723 vol. 25, no. 7, pp. 6158–6174, Mar. 2018.
- 724 [43] G. Lofrano *et al.*, "Polymer functionalized nanocomposites for metals  
725 removal from water and wastewater: An overview," *Water Res.*, vol. 92, pp.  
726 22–37, 2016.
- 727 [44] E. N. Zare, A. Motahari, and M. Sillanpää, "Nano-adsorbents based on  
728 conducting polymer nanocomposites with main focus on polyaniline and its  
729 derivatives for removal of heavy metal ions/dyes: A review," *Environ. Res.*,  
730 vol. 162, pp. 173–195, 2018.
- 731 [45] Y. Huang, D. Wu, X. Wang, W. Huang, D. Lawless, and X. Feng, "Removal  
732 of heavy metals from water using polyvinylamine by polymer-enhanced  
733 ultrafiltration and flocculation," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 158, pp. 124–136,  
734 2016.
- 735 [46] G. Crini, N. Morin-Crini, N. Fatin-Rouge, S. Déon, and P. Fievet, "Metal  
736 removal from aqueous media by polymer-assisted ultrafiltration with  
737 chitosan," *Arab. J. Chem.*, vol. 10, pp. S3826–S3839, 2017.
- 738 [47] "Preparation and application of water-soluble polymer-metal complexes,"  
739 *Pure and Applied Chemistry*, vol. 52, p. 1883, 1980.
- 740 [48] K. Geckeler and K. Volchek, *Removal of Hazardous Substances from Water*  
741 *Using Ultrafiltration in Conjunction with Soluble Polymers*, vol. 30, 1996.
- 742 [49] P. Cañizares, A. de Lucas, Á. Pérez, and R. Camarillo, "Effect of polymer

- 743 nature and hydrodynamic conditions on a process of polymer enhanced  
744 ultrafiltration," *J. Memb. Sci.*, vol. 253, no. 1, pp. 149–163, 2005.
- 745 [50] O. Arar, N. Kabay, J. Sánchez, B. L. Rivas, M. Bryjak, and C. Peña,  
746 "Removal of arsenic from water by combination of electro-oxidation and  
747 polymer enhanced ultrafiltration," *Environ. Prog. Sustain. Energy*, vol. 33, no.  
748 3, pp. 918–924, 2014.
- 749 [51] I. A. Ike, J. Zhang, A. Groth, J. D. Orbell, and M. Duke, "Effects of dissolution  
750 conditions on the properties of PVDF ultrafiltration membranes," *Ultrason.  
751 Sonochem.*, vol. 39, pp. 716–726, 2017.
- 752 [52] M. V Norton, F. A. DiGiano, and R. T. Hallen, "Selective Separation of  
753 Europium Using Polymer-Enhanced Ultrafiltration," *Water Environ. Res.*, vol.  
754 69, no. 2, pp. 244–253, 1997.
- 755 [53] S. A. Kulyukhin, L. V Mizina, M. P. Gorbacheva, I. A. Rumer, V. A.  
756 Lomovskoi, and E. I. Saunin, "Removal of <sup>131</sup>I and <sup>137</sup>Cs from aqueous and  
757 aqueous-organic solutions with porous polyvinyl formal," *Radiochemistry*, vol.  
758 56, no. 2, pp. 177–182, 2014.
- 759 [54] B. Bolto, T. Tran, M. Hoang, and Z. Xie, "Progress in Polymer Science  
760 Crosslinked poly ( vinyl alcohol ) membranes," vol. 34, pp. 969–981, 2009.
- 761 [55] A. S. Hickey and N. A. Peppas, "Mesh size and diffusive characteristics of  
762 semicrystalline poly(vinyl alcohol) membranes prepared by freezing/thawing  
763 techniques," *J. Memb. Sci.*, vol. 107, no. 3, pp. 229–237, 1995.
- 764 [56] M. G. Katz and T. Wydeven, "Selective permeability of PVA membranes. II.  
765 Heat-treated membranes," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 79–87,  
766 1982.
- 767 [57] Y.-L. Wang, H. Yang, and Z.-L. Xu, "Influence of post-treatments on the  
768 properties of porous poly(vinyl alcohol) membranes," *J. Appl. Polym. Sci.*,  
769 vol. 107, no. 3, pp. 1423–1429, 2008.
- 770 [58] E. Immelman, D. Bezuidenhout, R. D. Sanderson, E. P. Jacobs, and A. J.  
771 van Reenen, "Poly(vinyl alcohol) gel sub-layers for reverse osmosis  
772 membranes. III. Insolubilization by crosslinking with potassium  
773 peroxydisulphate," *Desalination*, vol. 94, no. 2, pp. 115–132, 1993.
- 774 [59] M. G. Katz and T. Wydeven, "Selective permeability of PVA membranes. I.  
775 Radiation-crosslinked membranes," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 26, no. 9, pp.  
776 2935–2946, 1981.
- 777 [60] R. D. Sanderson, E. Immelman, D. Bezuidenhout, E. P. Jacobs, and A. J.  
778 Van Reenen, "Polyvinyl alcohol and modified polyvinyl alcohol reverse  
779 osmosis membranes," *Desalination*, vol. 90, no. 1, pp. 15–29, 1993.
- 780 [61] S. Jian and S. Xiao Ming, "Crosslinked PVA-PS thin-film composite  
781 membrane for reverse osmosis," *Desalination*, vol. 62, pp. 395–403, 1987.
- 782 [62] N. Işıklan and O. Şanlı, "Separation characteristics of acetic acid–water  
783 mixtures by pervaporation using poly(vinyl alcohol) membranes modified with  
784 malic acid," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 44, no. 9, pp. 1019–  
785 1027, 2005.
- 786 [63] M. C. Burshe, S. B. Sawant, J. B. Joshi, and V. G. Pangarkar, "Sorption and  
787 permeation of binary water-alcohol systems through PVA membranes  
788 crosslinked with multifunctional crosslinking agents," *Sep. Purif. Technol.*,  
789 vol. 12, no. 2, pp. 145–156, 1997.

- 790 [64] J. M. Gohil, A. Bhattacharya, and P. Ray, "Studies On The Crosslinking Of  
791 Poly (Vinyl Alcohol)," *J. Polym. Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 161–169, 2006.
- 792 [65] J.-W. Rhim and Y.-K. Kim, "Pervaporation separation of MTBE–methanol  
793 mixtures using cross-linked PVA membranes," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 75,  
794 no. 14, pp. 1699–1707, 2000.
- 795 [66] K.-H. Lee, H.-K. Kim, and J.-W. Rhim, "Pervaporation separation of binary  
796 organic–aqueous liquid mixtures using crosslinked PVA membranes. III.  
797 Ethanol–water mixtures," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 58, no. 10, pp. 1707–  
798 1712, 1995.
- 799 [67] C. C. Gryte, J. Chen, V. Kevorkian, and H. P. Gregor, "Hydrophilic  
800 interpolymer membranes from crosslinked blends of poly(vinylalcohol),  
801 poly(styrene sodium sulfonate) and poly(vinyl methyl ether–alt–maleic  
802 anhydride)," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 23, no. 9, pp. 2611–2625, 1979.
- 803 [68] T. Uragami, K. Okazaki, H. Matsugi, and T. Miyata, "Structure and  
804 Permeation Characteristics of an Aqueous Ethanol Solution of  
805 Organic–Inorganic Hybrid Membranes Composed of Poly(vinyl alcohol) and  
806 Tetraethoxysilane," *Macromolecules*, vol. 35, no. 24, pp. 9156–9163, Nov.  
807 2002.
- 808 [69] M. Djennad, D. Benachour, H. Berger, and R. Schomäcker, "Poly(vinyl  
809 alcohol) Ultrafiltration Membranes: Synthesis, Characterization, the Use for  
810 Enzyme Immobilization," *Eng. Life Sci.*, vol. 3, no. 11, pp. 446–452, 2003.
- 811 [70] N. Masao, "Process for producing immobilized L-asparaginase preparations  
812 for the therapy of leukemia," US4617271A, 1982.
- 813 [71] 吴松海, 臧金金, 任海涛, 韩煦, and 刘勇, "Immobilized enzyme and  
814 preparation method thereof," CN103013971A, 2012.
- 815 [72] R. H. Li and T. A. Barbari, "Performance of poly(vinyl alcohol) thin-gel  
816 composite ultrafiltration membranes," *J. Memb. Sci.*, vol. 105, no. 1, pp. 71–  
817 78, 1995.
- 818 [73] Y. Zhang, H. Li, H. Li, R. Li, and C. Xiao, "Preparation and characterization of  
819 modified polyvinyl alcohol ultrafiltration membranes," *Desalination*, vol. 192,  
820 no. 1, pp. 214–223, 2006.
- 821 [74] J. E. Cadotte, U. States., O. of W. R. and Technology., M. ). Midwest  
822 Research Institute (Kansas City, N. S. Division., and M. . Midwest Research  
823 Institute (Kansas City, *Continued evaluation of in situ-formed condensation*  
824 *polymers for reverse osmosis membranes : final report*. Minneapolis, Minn.:  
825 MRI, North Star Division, 1976.
- 826 [75] C. T. Chen, Y. J. Chang, M. C. Chen, and A. V Tobolsky, "Formalized  
827 poly(vinyl alcohol) membranes for reverse osmosis," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol.  
828 17, no. 3, pp. 789–796, 1973.
- 829 [76] Y. Pan, K. Shi, C. Peng, W. Wang, Z. Liu, and X. Ji, "Evaluation of  
830 Hydrophobic Polyvinyl-Alcohol Formaldehyde Sponges As Absorbents for Oil  
831 Spill," 2014.
- 832 [77] Y. Pan, Z. Liu, W. Wang, C. Peng, K. Shi, and X. Ji, "Highly efficient  
833 macroporous adsorbents for toxic metal ions in water systems based on  
834 polyvinyl alcohol-formaldehyde sponges," *J. Mater. Chem. A*, vol. 4, no. 7,  
835 pp. 2537–2549, 2016.

- 836 [78] Y. Pan, K. Shi, Z. Liu, W. Wang, C. Peng, and xiangling Ji, *Synthesis of new*  
837 *kind of macroporous polyvinyl-alcohol formaldehyde based sponges and its*  
838 *water superabsorption performance*. 2015.
- 839 [79] X. Li, Y. Li, and Z. Ye, "Preparation of macroporous bead adsorbents based  
840 on poly(vinyl alcohol)/chitosan and their adsorption properties for heavy  
841 metals from aqueous solution," *Chem. Eng. J.*, vol. 178, pp. 60–68, 2011.
- 842 [80] W. S. Wan Ngah, L. C. Teong, and M. A. K. M. Hanafiah, "Adsorption of dyes  
843 and heavy metal ions by chitosan composites: A review," *Carbohydr. Polym.*,  
844 vol. 83, no. 4, pp. 1446–1456, 2011.
- 845 [81] X. Jiao, Y. Gutha, and W. Zhang, "Application of chitosan/poly(vinyl  
846 alcohol)/CuO (CS/PVA/CuO) beads as an adsorbent material for the removal  
847 of Pb(II) from aqueous environment," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol.  
848 149, pp. 184–195, 2017.
- 849 [82] J. She *et al.*, "Cellulose Nanofibrils Aerogel Cross-Linked by Poly(vinyl  
850 alcohol) and Acrylic Acid for Efficient and Recycled Adsorption with Heavy  
851 Metal Ions," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 18, no. 6. pp.  
852 4167–4175.
- 853 [83] S. Mallakpour and E. Khadem, "Facile and cost-effective preparation of  
854 PVA/modified calcium carbonate nanocomposites via ultrasonic irradiation:  
855 Application in adsorption of heavy metal and oxygen permeation property,"  
856 *Ultrason. Sonochem.*, vol. 39, pp. 430–438, 2017.
- 857 [84] Ihsanullah *et al.*, "Heavy metal removal from aqueous solution by advanced  
858 carbon nanotubes: Critical review of adsorption applications," *Sep. Purif.*  
859 *Technol.*, vol. 157, pp. 141–161, 2016.
- 860 [85] T. N. Abraham, R. Kumar, R. K. Misra, and S. K. Jain, "Poly(vinyl alcohol)-  
861 based MWCNT hydrogel for lead ion removal from contaminated water," *J.*  
862 *Appl. Polym. Sci.*, vol. 125, no. S1, pp. E670–E674, 2012.
- 863 [86] S. Zarghami, M. A. Tofighy, and T. Mohammadi, "Adsorption of Zinc and  
864 Lead Ions from Aqueous Solutions Using Chitosan/Polyvinyl Alcohol  
865 Membrane Incorporated via Acid-Functionalized Carbon Nanotubes," *J.*  
866 *Dispers. Sci. Technol.*, vol. 36, no. 12, pp. 1793–1798, Dec. 2015.
- 867 [87] N. Kobayashi, H. Izumi, and Y. Morimoto, "Review of toxicity studies of  
868 carbon nanotubes," *J. Occup. Health*, vol. 59, no. 5, pp. 394–407, 2017.
- 869 [88] M. Allegri *et al.*, "Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes:  
870 The relationship between functionalization and agglomeration," *Toxicol.*  
871 *Reports*, vol. 3, pp. 230–243, 2016.
- 872 [89] J. Du, S. Wang, H. You, and X. Zhao, "Understanding the toxicity of carbon  
873 nanotubes in the environment is crucial to the control of nanomaterials in  
874 producing and processing and the assessment of health risk for human: A  
875 review," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 36, no. 2, pp. 451–462, 2013.
- 876 [90] Y. Ogata, M. Okano, and T. Ganke, "Kinetics of the Formation of the Formal  
877 of Polyvinyl Alcohol," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 78, no. 13, pp. 2962–2964, Jul.  
878 1956.
- 879 [91] Wilson Christopher Lumley, "Method of making expanded polyvinyl alcohol-  
880 formaldehyde reaction product and product resulting therefrom,"  
881 US2609347A, 1952.
- 882 [92] A. N. Berlina, A. K. Sharma, A. V. Zherdev, M. S. Gaur, and B. B. Dzantiev,

883 "Colorimetric Determination of Lead Using Gold Nanoparticles," *Anal. Lett.*,  
884 vol. 48, no. 5, pp. 766–782, 2015.  
885  
886



# *Anexo 5*

1 **Tailoring the formation of protein assemblies *in vitro* using a novel method**

2  
3 Mabel Rodríguez<sup>1</sup>, Ricardo M. Castro-Acosta<sup>2</sup>, Elías R. Ruiz-Morales<sup>1</sup>, Francisca  
4 Villanueva-Flores<sup>1</sup>, Octavio T. Ramírez<sup>1, 2</sup> and Laura A. Palomares<sup>1\*</sup>.

5 1. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. 2. Laboratorio Nacional  
6 para la Producción y Análisis de Moléculas y Medicamentos Biotecnológicos.  
7 Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,  
8 Cuernavaca Morelos CP. 62210, México.

9 \* Corresponding author. E-mail: [laura@ibt.unam.mx](mailto:laura@ibt.unam.mx). Tel: +52 777 3291646.

10 Fax: +52 777 3138811.

11 MR: [mabel@ibt.unam.mx](mailto:mabel@ibt.unam.mx)

12 RCA: [rcastro@ibt.unam.mx](mailto:rcastro@ibt.unam.mx)

13 ERM: [genomelias@hotmail.com](mailto:genomelias@hotmail.com)

14 FVF: [fran@ibt.unam.mx](mailto:fran@ibt.unam.mx)

15 OTR: [tonatiuh@ibt.unam.mx](mailto:tonatiuh@ibt.unam.mx)

16 LAP: [laura@ibt.unam.mx](mailto:laura@ibt.unam.mx)

17  
18 **Keywords:** VP6, nanotubes, assembly

19 Abstract word count: 183.

20 Manuscript word count: 3401

21

22

## 23 **ABSTRACT**

24 Protein assemblies, with increasing applications in nanobiotechnology, health  
25 and research, are most commonly obtained through the recombinant expression  
26 of their subunits, followed by a recovery and very often by an *in vitro* assembly  
27 step, essential when the expression system or the culture environment are not  
28 adequate for assembly. *In vitro* disassembly and assembly are also commonly  
29 used to prevent the encapsidation of contaminants, and to obtain particular types  
30 of assemblies. An ion of particular relevance for protein assembly is calcium,  
31 which can mediate assembly or disassembly reactions. In this work, a novel  
32 method to assemble proteins was developed and is illustrated with the particular  
33 case of rotavirus VP6, a polymorphic protein. Monomers of VP6 were assembled  
34 by the precipitation of calcium with sodium bicarbonate, obtaining VP6 nanotubes  
35 ranging from 0.15 to 9  $\mu\text{m}$  in length, with a case reaching 15  $\mu\text{m}$ . The length of  
36 the nanotubes obtained was directly proportional to the initial concentration of  
37 VP6 monomers used, which is in accordance to the classic nucleation theory of  
38 capsid assembly. The nanotubes assembled using this novel method were  
39 successfully used as scaffolds for the production of nanobiomaterials, which  
40 increased their potential applications in nanotechnology.

## 41 **INTRODUCTION**

42 Viral proteins have the unique capacity of assembling into nanostructures when  
43 purified. Viral proteins are often polymorphic, assembling by themselves as  
44 icosahedra, sheets or nanotubes (Douglas and Young, 2006) Such  
45 nanostructural assemblies can be used to create novel multifunctional  
46 nanomaterials with unique properties (Ref). Viral capsid proteins assemble in a  
47 thermodynamic fashion, being icosahedra the most favorable shape for viral  
48 capsid assemblies, as it retains a large inner volume within small areas. By  
49 burying hydrophobic surfaces at the inter-subunit contact points, viral capsids  
50 assemble in order to increase entropy (Katen and Zlotnick, 2005; Bahadur et al.,  
51 2007). VP6 protein from the rotavirus intermediate capsid assembles in the form  
52 of icosahedra in the virion when meets inner capsid protein VP2. Nevertheless,  
53 when it is expressed alone inside insect cells using the Insect Cell-Baculovirus  
54 Expression System (IC-BVES) for recombinant protein expression, VP6 protein  
55 assembles in the form of large nanotubes that can reach various micrometers in  
56 length. VP6 polymorphism has been characterized earlier, and electron  
57 microscopy analysis showed that purified VP6 protein can assemble in  
58 icosahedra or nanotubes depending on the pH and the concentration of the  
59 divalent cations  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in the media (Ready and Sabara., 1987; Lepault  
60 et al., 2001) Like VP6, the assembly of other viral capsid proteins rely on the  
61 calcium concentration in the media. For example in SV40 virus, the coordination  
62 of  $\text{Ca}^{2+}$  ions by the pentamers formed by Vp1 capsid protein is essential for the  
63 virion assembly. (Li et al., 2003). Also, L1 protein, the major capsid protein in the  
64 Human Papilloma Virus type 16, has the ability to form icosahedral particles *in*  
65 *vitro* when  $\text{Ca}^{2+}$  ion is present in the media (Touzé et al., 1998; 2000). Ready and  
66 Sabara (1987) reported for the first time a method for the *in vitro* formation of  
67 VP6 nanotubes based on the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  ion to the media to obtain VP6  
68

69 monomers, and the later elimination of calcium by extensive and time-consuming  
70 three days dialysis to form VP6 nanotubes. Recently, Lappalainen and co-  
71 workers (2016) reported the assembly of VP6 nanotubes *in vitro* using  
72 ultrafiltration methods, but obtained short tubes that oscillated between 0.2 to 1.5  
73 micrometers in length.

74 Here we report a new protocol for the generation of VP6 nanotubes from VP6  
75 protein purified from the culture supernatants of insect cells. By the addition of  
76 calcium ion to the media we obtained VP6 monomers, which were re-assembled  
77 into nanotubes by the precipitation of calcium ion with sodium bicarbonate. In  
78 less than 48 hours, we obtained nanotubes larger than those purified from insect  
79 cells, which length could be modulated by adjusting the initial concentration of  
80 VP6 protein used.

81

## 82 METHOD SUMMARY

83 VP6 protein produced in insect cells was purified, and disassembled by the  
84 addition of 300 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ion to the media. Our protocol describes the formation  
85 of VP6 nanotubes *in vitro* by the precipitation of  $\text{Ca}^{2+}$  ions using sodium  
86 bicarbonate buffer, which increased the length of the nanotubes obtained and  
87 speeds the assembly process compared to previous reports when dialysis or  
88 ultrafiltration methods were used to eliminate  $\text{Ca}^{2+}$  ions from the media. We also  
89 showed that adjusting the initial concentration of VP6 monomers could modulate  
90 the length of the nanotubes assembled. By increasing VP6 monomers initial  
91 concentration we obtained longer VP6 nanotubes, as measured using  
92 Transmission Electron Microscopy.

93

## 94 MATERIALS AND METHODS

### 95 Purification of rotavirus VP6

96 VP6 was produced in IC-BEVS using High Five® cells cultured in shake flasks  
97 (500mL) as previously described (Plascencia-Villa et al., 2011). Production of  
98 VP6 during the infection was confirmed by SDS-PAGE and Western blot.  
99 Purification of VP6 from culture supernatant consisted of two chromatographic  
100 steps, first by anionic exchange chromatography (Q-Sepharose Fast Flow, GE  
101 Healthcare ) followed by gel permeation chromatography (HW65F, Tosoh). The  
102 fractions collected from gel permeation chromatography were analyzed using  
103 SDS-PAGE in order to confirm the presence and purity of VP6. Polyacrilamide  
104 gels were prepared at 10% and protein separation was performed at 15 mA  
105 constant.

106 The assembly of VP6 protein into nanotubes was determined by transmission  
107 electron microscopy (TEM). Briefly, VP6 positive fractions were deposited on a  
108 200-mesh formvar carbon-coated copper grid (Electron Microscopy Sciences,  
109 Washington, PA), stained with 1% uranyl acetate, and observed in an EM900  
110 Zeiss transmission electron microscope (TEM) operated at 80 kV or a M-JEOL  
111 1010 electron microscope (Jeol, Peabody, MA, USA) operated at 70 kV.

112

### 113 *In vitro* assembly of VP6 nanotubes

114 500  $\mu\text{L}$  of purified VP6 protein from insect cells at different concentrations (0.1;  
115 0.25; 0.5; 1, 2 and 3 mg/mL) was disassembled by the addition of a stock  
116 solution of  $\text{CaCl}_2$  1M to reach a final concentration of 300 mM  $\text{CaCl}_2$ . The mixture  
117 was stirred for 2 h at room temperature in a Rocker platform (Back-to-Basics®)  
118 at a speed of 10 rpm and stored overnight at 4°C. On the next day, 10 volumes  
119 of 100 mM  $\text{NaHCO}_3$  pH 8.3 were added and the solution was stirred at laboratory  
120 temperature in a Rocker platform (Back-to-Basics®) at a speed of 10 rpm for 1  
121 hour to allow the precipitation of  $\text{Ca}^{2+}$  ions. Then, the mixture was centrifuged at  
122 10 000 rpm for 10 minutes in a Centrifuge 5810 R (*eppendorf*) and the  
123 supernatant obtained was concentrated by centrifugation at 8000 rpm using  
124 Spin-X® UF 6 Concentrator 10k MWCO (Corning®) in a Centrifuge 5810 R  
125 (*eppendorf*).

126

127 Characterization of the VP6 nanotubes

128 VP6 nanotubes assembly was confirmed by TEM and the length of the  
129 nanotubes was measured using the software Fiji for image analysis (Schindelin  
130 et al., 2012). In addition, assembled samples of VP6 nanotubes were analyzed  
131 by size exclusion chromatography (SEC-HPLC) (Mena et al, 2014 and Castro-  
132 Acosta et al., 2014) in a Waters chromatographic system (*Waters Corp., MA,*  
133 *USA*) with an UV diode array detector at 280 nm and a fluorescence detector  $\lambda_{\text{exc}}$   
134 280 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  350 nm. VP6 nanotubes were separated from un-assembled  
135 protein using an Ultrahydrogel 500 size exclusion column (*Waters Corp., MA,*  
136 *USA*) at an isocratic flow of 0.9 mL/min of Tris buffer 10 mM, pH 8.0.

137

138 Functionalization with gold nanoparticles

139 VP6 nanotubes were functionalized with gold according to the methodology  
140 previously reported by Plascencia-Villa et al (2009) with the following  
141 modifications: VP6 nanotubes (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were mixed with 2 mM of  
142  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, 520918) and incubated at 27° C for 3 h protected from  
143 light. Afterwards,  $\text{Au}^{3+}$  ions were reduced to  $\text{Au}^0$  (metallic state) by adding an  
144 equimolar amount of reducing agent (Merck, 251275). Reduction reaction was  
145 performed for 4 hours at room temperature protected from light. Removal of  
146 remnant ions was performed by washing three times with deionized water and by  
147 centrifugation (10 min at 10 000 rpm) in a centrifuge 5810 R (*eppendorf*),  
148 followed by a dialysis in deionized water at 4° C for 48 h using a dialysis  
149 membrane (Spectra/Por 1® Dialysis Tubbing, MW 6-8 kD). The correct  
150 functionalization of the tubes was confirmed by TEM as it was described above,  
151 with no uranyl acetate added.

152

153

## 154 RESULTS AND DISCUSSION

155 VP6 protein produced in insect cells was purified from culture supernatants and  
156 the purity obtained was near 100% as seen by SDS-PAGE and Coomassie Blue  
157 staining (Figure 1A, Lane 6). The sample was visualized using TEM at different  
158 magnifications (Fig 1B, C and D), showing the typical quasihexagonal surface  
159 lattice structure in the surface of VP6 nanotubes as reported earlier (Lepault, et

160 al., 2001). As can be observed by TEM, not only assembled structures line  
161 nanotubes were present, also, structures like aggregates and DNA in the  
162 background of the grid are visible. A sample of purified VP6 was characterized to  
163 determine the presence of assembled and unassembled protein. In Figure 2, a  
164 typical SEC-HPLC chromatogram obtained after gel permeation chromatography  
165 is shown. Peak 1, which migrates at the void volume of the column, corresponds  
166 to assembled VP6, with a size larger than the pore size of the column (50 nm).  
167 As reported previously by Plascencia-Villa and colleagues (2011), in peak 2 we  
168 observed unassembled VP6 protein and peak 3 are mainly salts. The percentage  
169 of assembled protein corresponds to the 69% of the sample and un-assembled  
170 protein corresponds to 20%, which is in agreement with previous results reported  
171 from our group (Plascencia-Villa et al., 2009 and Castro-Acosta et al., 2014).  
172 In order to generate VP6 nanotubes from purified VP6, we first added calcium  
173 ions to the media to obtain VP6 monomers. As we show in figure 3A, no VP6  
174 nanotubes were observed after the treatment with calcium ions, only a few  
175 protein aggregates were visualized. It has been previously reported that the basic  
176 unit that conforms VP6 nanotubes are VP6 trimers, which have several potential  
177 calcium binding sites in their intra and inter-trimer contact regions (Mathieu et al.,  
178 2001; Lepault et al., 2001). With calcium excess (more than 200mM) all the  
179 calcium-binding sites in VP6 nanotubes are filled and then the electrostatic  
180 interactions that keep the nanotubes assembled are destabilized. After having  
181 unassembled VP6, we added  $\text{NaHCO}_3$  to precipitate calcium ions from the  
182 media, and then the VP6 protein reassembled into the form of nanotubes. Using  
183 TEM we monitored VP6 nanotubes formation at different protein concentration,  
184 and the length of the nanotubes observed in TEM was measured. In figure 3, we  
185 show images from different samples of VP6 nanotubes reassembled at different  
186 VP6 concentrations, which displayed lengths ranging from 0.15 to 15  $\mu\text{m}$  and a  
187 diameter of approximately 80 nm. At an initial VP6 concentration of 0.1 mg/mL,  
188 we barely observed VP6 nanotubes (data not shown), and a small amount of  
189 reassembled nanotubes was observed at 0.25 mg/mL, indicated by arrows in  
190 Figure 3B. The population of reassembled nanotubes started to increase at 0.5  
191 mg/mL of VP6 concentration (Fig 3C) and when we increased VP6 concentration  
192 at 1, 2 and 3 mg/mL, the larger nanotubes were obtained (Fig 3 D, E and F). In  
193 Figure 4 we show the results of the measurement of the length of VP6 nanotubes  
194 at different VP6 protein concentration. We observed from the graphic that the  
195 length of the nanotubes reassembled was directly proportional to the initial  
196 concentration of VP6 monomers used in the reactions, until a plateau was  
197 reached at 2 mg/mL of VP6 protein. When the initial concentration of VP6 protein  
198 is 1 mg/mL or bigger, we reassembled nanotubes even longer than those purified  
199 from the supernatant of insect cells (Figure 4). These results open the possibility  
200 of modulating the length of protein assemblies whether you need shorter or  
201 longer nanotubes, depending on your experimental needs. Our group reported  
202 previously the formation of VP6 nanowires by the functionalization of the inner  
203 surface of VP6 nanotubes with silver (Carreño-Fuentes et al., 2013). If we use  
204 longer VP6 nanotubes as scaffolds by assembling VP6 nanotubes at a high VP6  
205 protein concentration, we will be able to obtain longer nanowires useful in

206 biotechnology or biomedical applications. For example, carbon nanotubes, which  
207 have several micrometers in length, have been used as scaffolds for the growth  
208 of different cell types such as neurons and myocytes (Martinelli, et al., 2012 and  
209 Fabbro et al., 2013). On the other hand, smaller nanotubes have proven to be  
210 better as cell delivery vehicles for drugs and DNA (Singh et al., 2005; Dolatabadi  
211 et al., 2011; Sciortino et al., 2017).

212 Assembly process was monitored by SEC-HPLC as was described in Materials  
213 and Methods. SEC chromatograms shows the same results observed by TEM,  
214 where higher protein concentrations increased the assembly of VP6 nanotubes  
215 (Figure 5). In Light blue we observed VP6 protein treated with calcium, when  
216 most of the protein is in the monomeric form and only 6% is assembled. At 1  
217 mg/mL a small increment in assembly structures was visualized in the  
218 chromatogram, 10.6% (green line). At 2 mg/mL the proportion of assemblies was  
219 29.4% and at 3 mg/mL was 50.7%. As we can see from the chromatograms, the  
220 percentage of VP6 nanotubes reassembled arises when we increased the initial  
221 concentration of VP6 protein.

222  
223  
224  
225

226 In order to study if the nanotubes reassembled using our new methodology  
227 maintained the capacity to form organized nanoparticle-based nanobiomaterials,  
228 we functionalized the surface of the reassembled VP6 nanotubes with gold, using  
229 the method previously described by Plascencia-Villa and co-workers (2009). This  
230 functionalization method was based on the affinity of certain amino acids to  
231 metals through electrostatic attractions. In top of the central cavity of the VP6  
232 trimer, three polar aminoacids were identified (Asn 250, Glu 315 and His 316),  
233 and suggested to be key to this process. Our results showed that the VP6  
234 nanotubes reassembled maintained the same conformation in the VP6 trimmers  
235 necessary for the functionalization with metals, as they were successfully  
236 functionalized with gold (Fig. 6). In Figure 6A and 6B, we showed the formation  
237 of gold nanoparticles on VP6 nanotubes purified from the supernatant of insect  
238 cells, as it was previously showed by Plascencia-Villa et al (2009). In Figure 6C  
239 and 6D we observed that the reassembled nanotubes were also able to provide a  
240 scaffold for the formation of the metal nanoparticles. This results demonstrated  
241 that the conformational structure of the VP6 trimer is comparable in both types of  
242 VP6 assemblies and opens the possibility of forming nanobiomaterials  
243 functionalized with metals longer than those previously reported by our group  
244 (Plascencia-Villa et al., 2009).

245 VP6 protein is a polymorphic protein from the capsid of rotavirus with potential  
246 applications in nanotechnology. We have shown previously the applications of  
247 VP6 nanotubes as scaffolds for the production of nanobiomaterials, catalyzers  
248 and immunogens (Plascencia-Villa et al., 2009; Carreño-Fuentes et al., 2013;  
249 Pastor et al., 2014; Rodríguez et al., 2014). Also, the use of VP6 nanotubes as  
250 adjuvants, mainly due to their large size, has been previously reported as  
251 advantageous (Blazevic et al., 2016; Malm et al., 2017). Here we report an easy

252 and reproducible method to generate VP6 nanotubes from VP6 monomers. The  
253 method described here not only offers a new way to assemble VP6 nanotubes *in*  
254 *vitro*, but also to modulate the length of the nanotubes obtained, depending on  
255 the initial concentration of VP6 used. The reassembled VP6 nanotubes could  
256 also be functionalized with gold, demonstrating a comparable trimmer  
257 arrangement with the one existing in the nanotubes purified from insect cells  
258 giving the opportunity to increase the range of applications in nanotechnology of  
259 VP6 nanotubes.

260

## 261 **ACKNOWLEDGMENTS**

262 Technical support: G. Zavala and A.N. Lecona at the Electron Microscopy Units  
263 of Instituto de Biotecnología UNAM and Instituto Nacional de Salud Pública,  
264 Mexico; R. Pastor, JC Fabián, MA Contreras and V Hernández at the Laboratorio  
265 de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología, Instituto de Biotecnología  
266 UNAM, México. We also thank Shirley E. Ainsworth for bibliographical support.

267

## 268 **COMPETING INTERESTS STATEMENT**

269 The authors declare no competing interests.

270

## 271 **REFERENCES**

- 272 **Bahadur RP, Rodier F, Janin J.** 2007. A dissection of the protein-protein  
273 interfaces in icosahedral virus capsids. *J Mol Biol.* Mar 23;367(2):574-90.
- 274 **Blazevic V, Lappalainen S, Nurminen K, Huhti L, Vesikari T.** 2011. Norovirus  
275 VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood  
276 gastroenteritis. *Vaccine* 29 (45): 8126-8133.
- 277 **Blazevic V, Malm M, Arinobu D, Lappalainen S, Vesikari T.** 2016. Rotavirus  
278 capsid VP6 protein acts as an adjuvant *in vivo* for norovirus virus-like particles in  
279 a combination vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* Mar 3;12(3):740-8.
- 280 **Carreño-Fuentes L, Ascencio JA, Medina A, Aguila S, Palomares LA,**  
281 **Ramírez OT.** 2013. Strategies for specifically directing metal functionalization of  
282 protein nanotubes: constructing protein coated silver nanowires.  
283 *Nanotechnology.* 24(23): 235602.
- 284 **Castro-Acosta RM, Rodríguez-Limas WA, Valderrama B, Ramírez OT,**  
285 **Palomares LA.** 2014. Effect of metal catalyzed oxidation in recombinant viral  
286 protein assemblies. *Microb Cell Fact.* 13(1): 25.
- 287 **Dolatabadi JEN, Omid Y and Losic D.** 2011. Carbon Nanotubes as an  
288 Advanced Drug and Gene Delivery Nanosystem. *Current Nanoscience,* 7: 297-  
289 314.
- 290 **Douglas T, Young M.** 2006. Viruses: Making friends with old foes. *Science.* 312:  
291 873-875.
- 292 **Fabbro A, Prato M, Ballerini L.** 2013. Carbon nanotubes in neuroregeneration  
293 and repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 65(15):2034-44.
- 294 **Katen S, Zlotnick A.** 2009. The thermodynamics of virus capsid assembly.  
295 *Methods Enzymol.* 455:395-417.



296 **Lepault J, Petitpas I, Erk I, Navaza J, Bigot D, Dona M, Vachette P, Cohen J,**  
297 **Rey FA.** 2001. Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus.  
298 *EMBO J.* 20:1498-507.

299 **Lombardi A, Summa CM, Geremia S, Randaccio L, Pavone V, DeGrado WF.**  
300 2000. Retrostructural analysis of metalloproteins: Application to the design of a  
301 minimal model for diiron proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 6298–6305.

302 **Malm M, Heinimäki S, Vesikari T, Blazevic V.** 2017. Rotavirus  
303 capsid VP6 tubular and spherical nanostructures act as local adjuvants when co-  
304 delivered with norovirus VLPs. *Clin Exp Immunol.* Sep;189(3):331-341.

305 **Martinelli V, Cellot G, Toma FM, Long CS, Caldwell JH, Zentilin L, Giacca M,**  
306 **Turco A, Prato M, Ballerini L, Mestroni L.** 2012. Carbon nanotubes promote  
307 growth and spontaneous electrical activity in cultured cardiac myocytes. *Nano*  
308 *Lett.* Apr 11;12(4):1831-8.

309 **Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Prasad BV,**  
310 **Cohen J, Rey FA.** 2001. Atomic structure of the major capsid protein of  
311 rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J.* 20:1485-97.

312 **Pastor-Flores AR Rodríguez-Limas WA, Contreras MA, Esquivel-Soto E,**  
313 **Esquivel-Guadarrama F, Ramírez OT, Palomares LA.** 2014. The assembly  
314 conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus  
315 challenge in mice. *Vaccine.* 32(24): 2874-7.

316 **Plascencia-Villa G, Mena JA, Castro-Acosta RM, Fabian JC, Ramirez OT,**  
317 **Palomares LA.** 2011. Strategies for the purification and characterization of  
318 protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *J Chromatogr B.*  
319 879 (15-16): 1105-1111.

320 **Plascencia-Villa G, Saniger JM, Ascencio JA, Palomares LA, Ramírez OT.**  
321 2009. Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template  
322 for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnol*  
323 *Bioeng.* 104(5): 871-81.

324 **Ready KF, Sabara M.** 1987. In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid  
325 protein. *Virology.* 157(1):189-98.

326 **Rodríguez M, Wood C, Sanchez-López R, Castro-Acosta RM, Ramírez OT,**  
327 **Palomares LA.** 2014. Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes  
328 by cells: towards a recombinant vaccine. *Arch Virol.* 159(5):1005-15.

329 **Sciortino N, Fedeli S, Paoli P, Brandi A, Chiarugi P, Severi M, Cicchi S.**  
330 2017. Multiwalled carbon nanotubes for drug delivery: Efficiency related to length  
331 and incubation time. *Int J Pharm.* Apr 15;521(1-2):69-72.

332 **Singh R, Pantarotto D, McCarthy D, Chaloin O, Hoebeke J, Partidos CD,**  
333 **Briand JP, Prato M, Bianco A and Kostarelos K.** 2005. Binding and  
334 Condensation of Plasmid DNA onto Functionalized Carbon Nanotubes: Toward  
335 the Construction of Nanotube-Based Gene Delivery Vectors. *J. Am. Chem. Soc.,*  
336 2005, 127 (12), pp 4388–4396.

337

### 338 **FIGURE LEGENDS**

339 **Figure 1.** A. Analysis by SDS-PAGE of the fractions obtained in the purification  
340 process of VP6 protein. Line 1: MWP Precision Plus Protein™ Dual Color  
341 Standards (Biorad), line 2: VP6 positive control, Line 3: Culture supernatant from

342 the insect cells producing VP6, line 4: concentrated culture supernatant using  
343 ultrafiltration, line 5: VP6 positive fraction eluted from anionic exchange  
344 chromatography, line 6: VP6 positive fraction eluted from SEC. Arrows indicate  
345 the molecular weight of VP6 protein (45 KDa) and gp64 protein, which is the  
346 main contaminant from the baculovirus. B, C and D. Visualization of purified VP6  
347 protein at different amplifications: 2500 X, 10 000 X and 50 000 X, respectively.  
348 The samples were stained with 1% uranyl acetate and observed in a  
349 transmission electron microscope.

350 **Figure 2.** HPLC analysis of VP6 nanotubes purified from insect cells. In Peak 1  
351 we observed the elution of VP6 purified nanotubes. Peak 2 is composed of VP6  
352 monomers and peak 3 are mainly salts.

353 **Figure 3.** Transmission Electron Microscopy from different samples of VP6. A:  
354 VP6 disassembled in the presence of 300 mM CaCl<sub>2</sub>. B: VP6 reassembled at  
355 0.25 mg/mL (25 000X). C: VP6 reassembled at 0.5 mg/mL (5000X). D: VP6  
356 reassembled at 1 mg/mL (6000X). E: VP6 reassembled at 2 mg/mL (630X). F:  
357 VP6 reassembled at 3 mg/mL (630X). E and F Upper left: the typical structure of  
358 nanotubes is shown at 80 000 X and 31 500X, respectively.

359 **Figure 4.** Analysis of the length of the reassembled VP6 nanotubes. In the X-axis  
360 we show the different groups formed by different concentrations of VP6  
361 nanotubes reassembled, as well as purified VP6. In Y-axis we show the length of  
362 each nanotube measured. The line in the boxplot represents the median value of  
363 each group. \*\*\* Means statistically significant differences between groups using  
364 the Wilcoxon non-parametric test; ns means no statistically differences between  
365 groups.

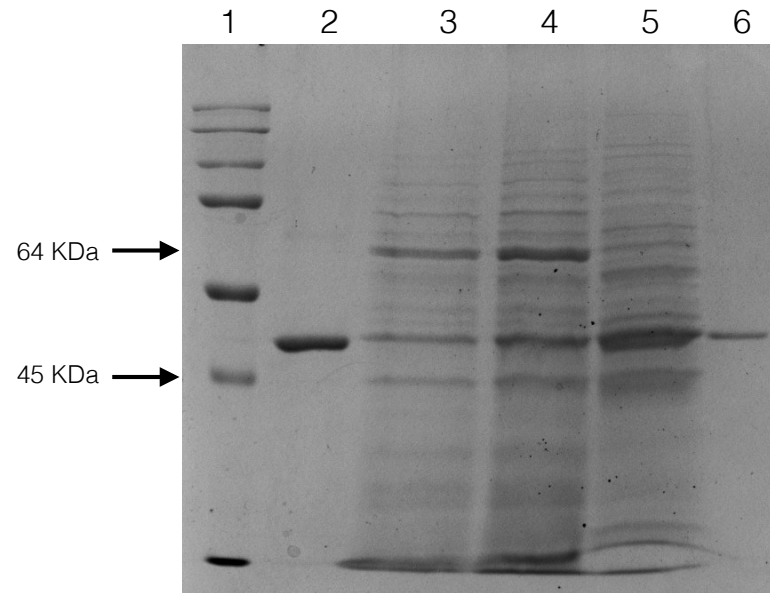
366 **Figure 5.** Size exclusion chromatography of calcium treated fraction (light blue)  
367 and VP6 assembled nanotubes. In green we show VP6 reassembled at 1  
368 mg/mL. In black VP6 protein was reassembled at 2 mg/mL and in dark blue we  
369 show the chromatogram for VP6 nanotubes reassembled at 3 mg/mL. The  
370 graphic shows fluorescence elution profile at  $\lambda_{ex}$  280 nm and  $\lambda_{em}$  350 nm.

371 **Figure 6.** TEM images of VP6 nanotubes functionalized with gold. A and B: VP6  
372 nanotubes purified from insect cells and functionalized with gold at 60 000 X and  
373 80 000 X, respectively. C and D: Reassembled VP6 nanotubes functionalized  
374 with gold at 5000 X and 8000 X, respectively.

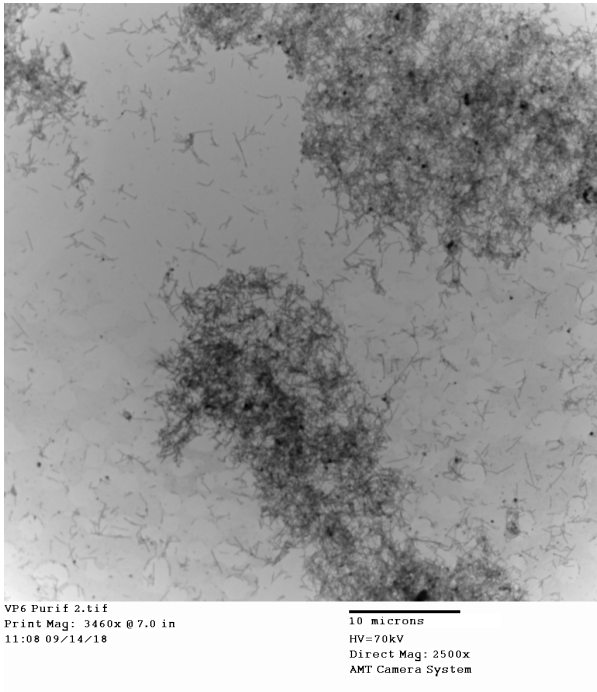
375  
376  
377  
378  
379  
380

Fig 1

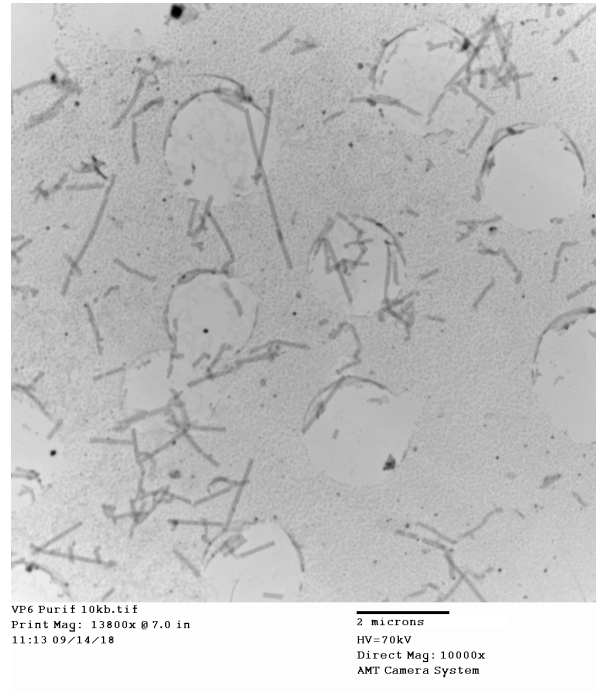
**A**



**B**



**C**



**D**

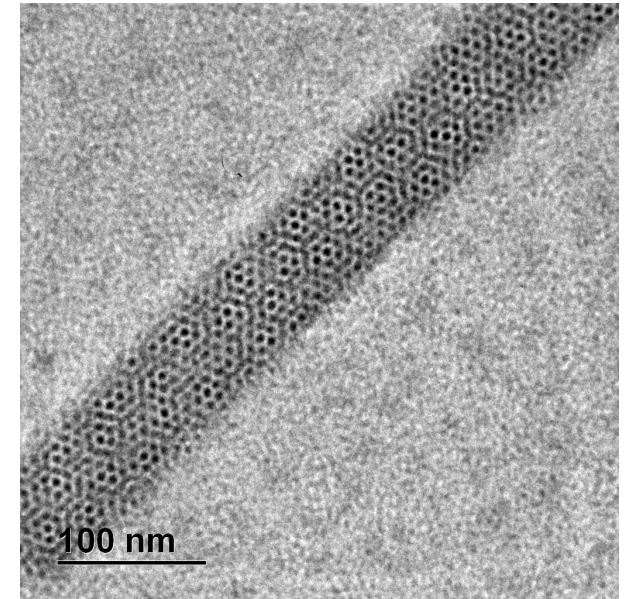


Fig 2

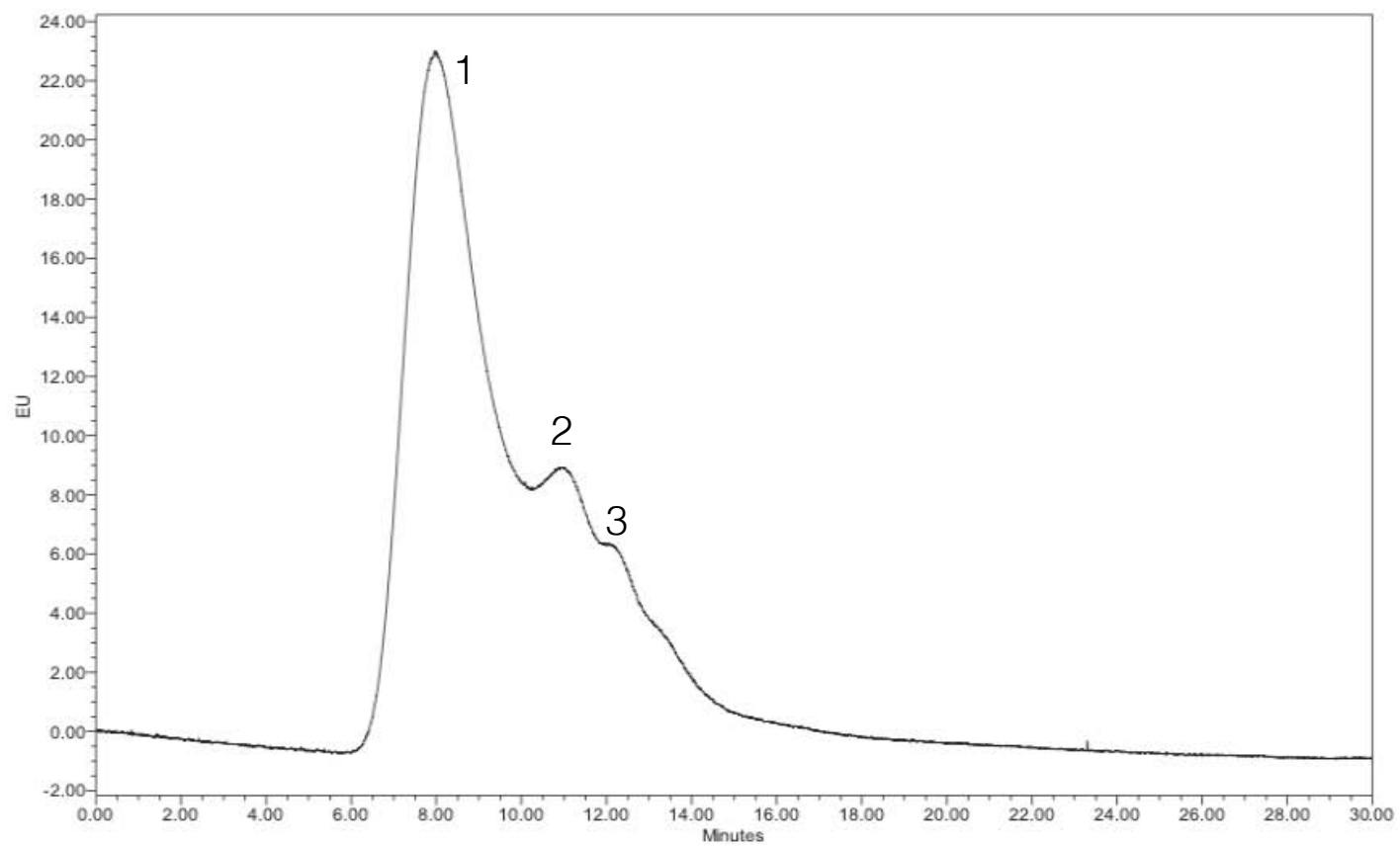


Fig 3

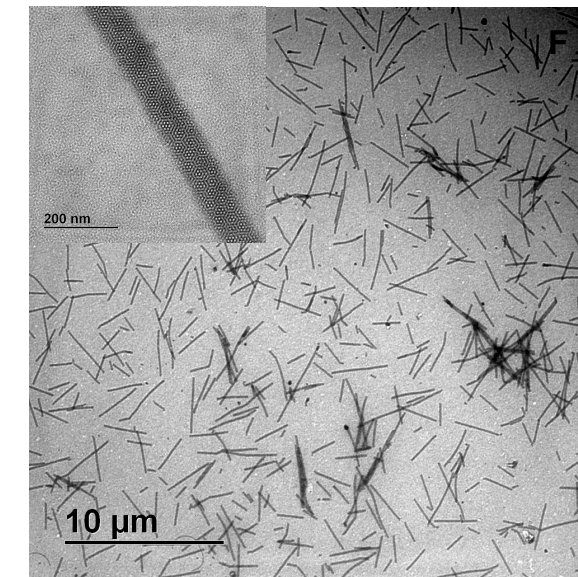
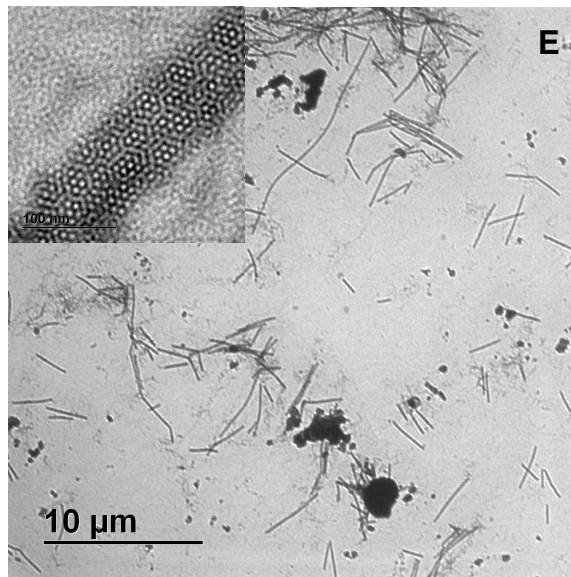
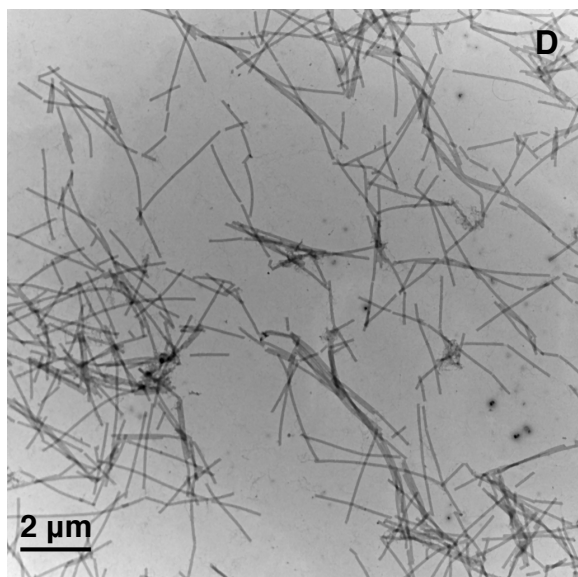
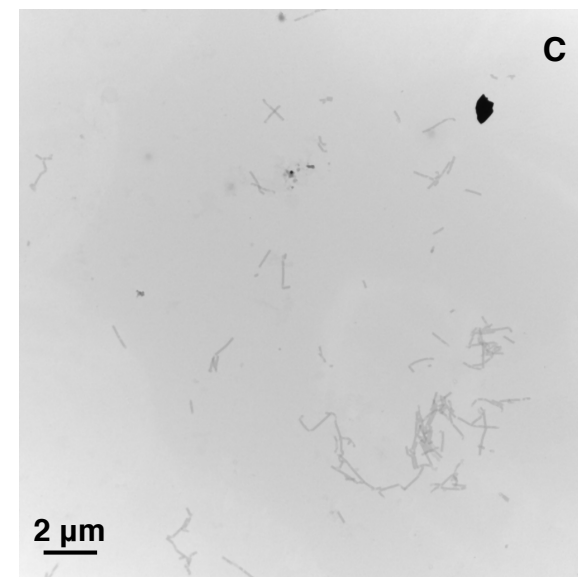
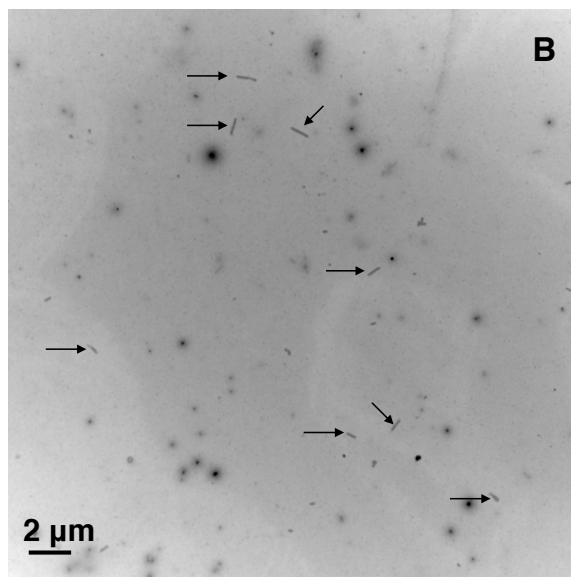
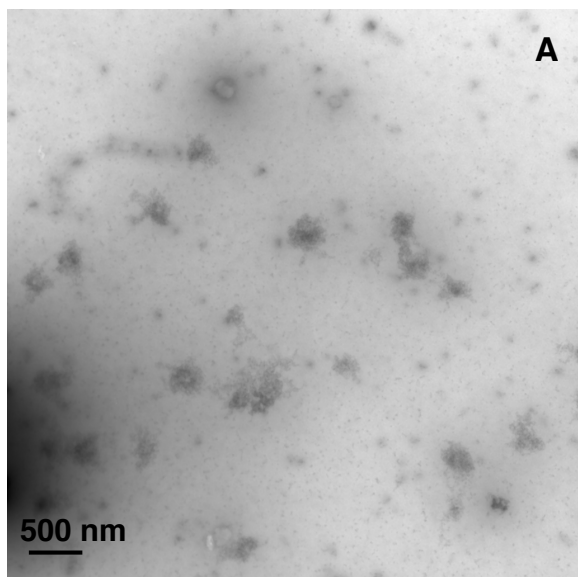


Fig 4

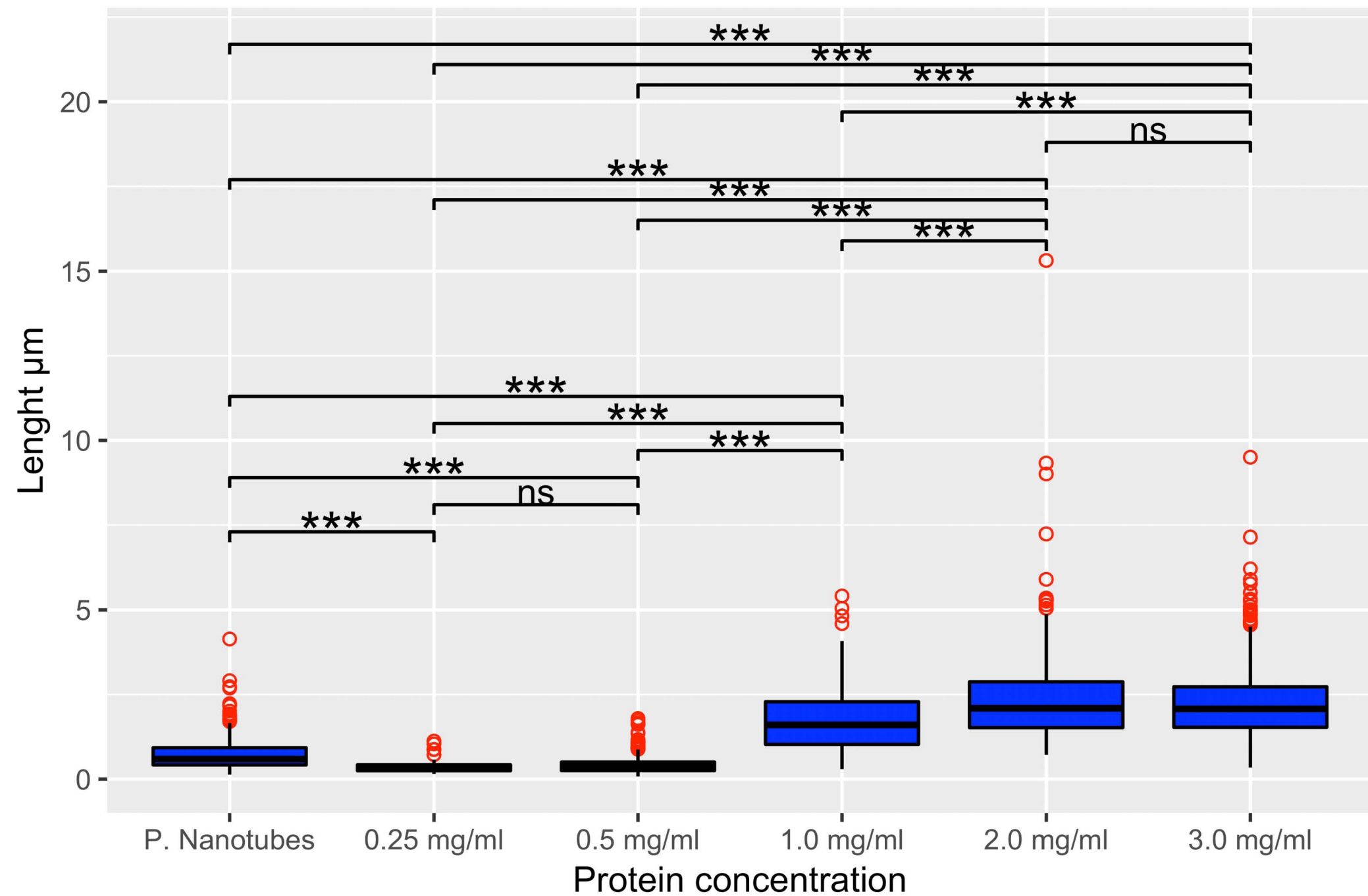


Fig 5

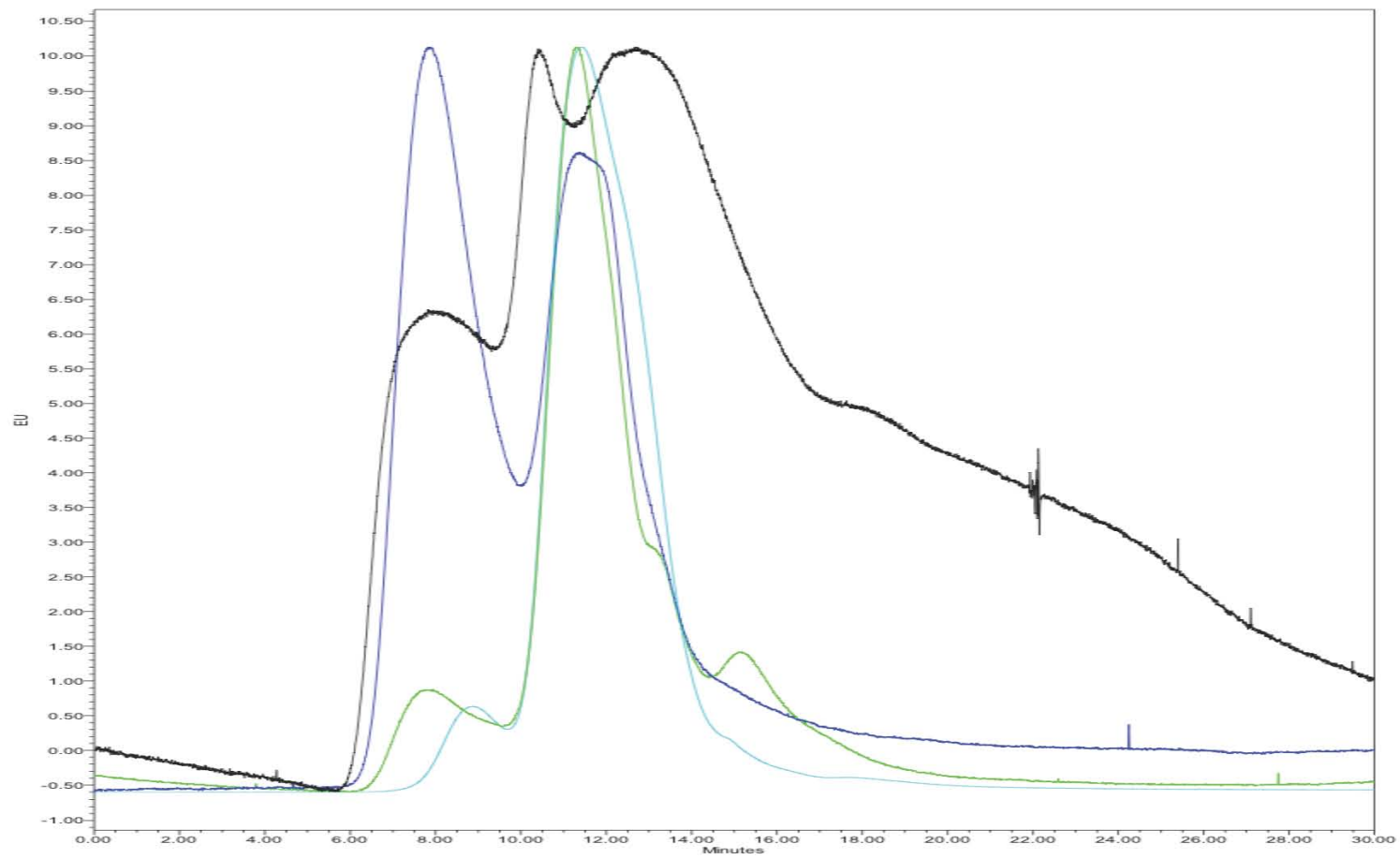


Figure 6

