

Preparación de mallas mediante electrohilado para la inhibición de la angiogénesis

L.GARCÍA-FERNÁNDEZ^{1,2}, M.R. AGUILAR^{1,2}, C.MIGLIARESI³, J. SAN ROMÁN^{1,2}

¹Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros

²Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

³Univesità degli studi di Trento

Resumen

La preparación de nanofibras por electrohilado está ganando mucho interés en la actualidad debido a su posible aplicación como sistemas de liberación controlada de fármaco. La incorporación del compuesto activo en la matriz polimérica de las fibras permite su protección frente a los procesos degradativos del organismo y su liberación controlada y localizada.

Numerosas enfermedades (psoriasis, retinopatías diabéticas, crecimiento de tumores) están relacionadas con alteraciones en la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya formados), por tanto el desarrollo de nuevos compuestos que regulen adecuadamente los procesos angiogénicos se está estudiando como una posible vía en el tratamiento de estas enfermedades. En el presente trabajo se han preparado y caracterizado nanofibras de ácido poli(D,L-láctico) cargadas con ácido 5-amino-2-naftalensulfónico o el homopolímero del ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, compuestos inhibidores de la acción de algunos factores de crecimiento proangiogénicos dependientes de heparina.

La distinta naturaleza de los compuestos activos utilizados permitieron la obtención de diferentes perfiles de liberación, dependientes de la hidrofilia del compuesto activo, su peso molecular y la biodegradabilidad del ácido poli(D,L-láctico). Ambos sistemas mostraron una alta capacidad para inhibir la mitogénesis de fibroblastos inducida por aFGF.

Palabras clave: Electrohilado, antiangiogénesis, ácido 5-amino-2-naftalensulfónico, ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico.

Abstract

Preparation of nanofibers by electrospinning is gaining much attention due to their potential application as drug delivery systems. The incorporation of the active compound in the polymeric matrix of the fibers prevents degradation and allows a controlled and localized delivery of the drug.

Many diseases (psoriasis, diabetic retinopathy, tumor growth) have been related to alterations in the angiogenic processes, therefore the control of angiogenesis is being investigated as a possible treatment for these diseases. In this work poly(D, L-lactic acid) nanofibers loaded with sulfonated active compounds that inhibit heparin-dependent proangiogenic growth factors (5-amino acid-2-naphthalene sulfonic acid and poly(2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) have been prepared and characterized.

The different nature of the active compounds gave rise different release profiles that depended on the hydrophilic nature of the drug, molecular weight, and the biodegradation of poly (D, L-lactic acid). Both systems showed a high inhibition of fibroblasts aFGF- induced mitogenesis.

Keywords: Electrospinning, antiangiogenesis, 5-amine-2-naphthalene sulfonic acid, 2 acrylamide-2-propanesulfonic acid.

Correspondencia:

L. García-Fernández

Dpto. de Biomateriales. Instituto de Ciencia y Tecnología. Juan de la Cierva 3. CP 28006, Madrid. España.

E-mail: luisgar@ictp.csic.es

Tel. +34.91.258.74.07

Fax: +34.91.564.48.53

Introducción

El diseño de nuevos sistemas de liberación de fármacos es un campo en continuo desarrollo. La preparación de sistemas que permitan una liberación controlada y mantenida en el tiempo, reduce los efectos tóxicos de los fármacos, aumenta su efectividad terapéutica [1] y permite el transporte de fármacos a través del torrente sanguíneo protegiéndolos frente a la descomposición [2-4]. En este sentido, algunos fármacos, como los anticancerígenos, llevan asociados un gran número de efectos secundarios, por lo que su incorporación en sistemas de nanofibras puede ayudar a reducir sus efectos secundarios mejorando su eficacia.

La preparación de este tipo de sistemas se puede realizar mediante la técnica del electrohilado. Esta técnica es muy versátil y permite el procesamiento de disoluciones o fundidos de polímeros en fibras continuas no tejidas con diámetros nanométricos. Este tipo de sistemas nanoestructurados están siendo aplicados en diversos campos de la investigación biomédica tales como: liberación controlada y localizada de fármacos, ingeniería de tejidos,

modificación superficial de implantes o cicatrización de heridas [5-7]. El electrohilado consiste en la formación de fibras poliméricas mediante la aplicación de un campo eléctrico sobre una gota de disolución de polímero o polímero fundido (Figura 1). Cuando un fluido moderadamente conductor es sometido a un campo eléctrico, la carga eléctrica tiende a acumularse en la interfaz del menisco que forma la gota, originándose diferentes esfuerzos mecánicos sobre el mismo. Esto provoca la deformación de la gota formando un cono denominado “cono de Taylor” y un micro-chorro de polímero que se dirige hacia el colector [8, 9]. En el camino hacia el colector la disolución de polímero se seca, depositándose fibras con diámetros entre las pocas micras y los nanómetros.

Con esta técnica se han preparado fibras de ácido poli(D,L-láctico) (PDLA) que es un polímero biodegradable muy estudiado y utilizado en el campo de la liberación de fármacos [10, 11], cargadas con ácido 5-amino-2-naftalensulfónico (ANSA) o con el homopolímero del ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (PAMPS) (Figura 2) que son dos compuestos con reconocido carácter antiangiogénico [12-14].

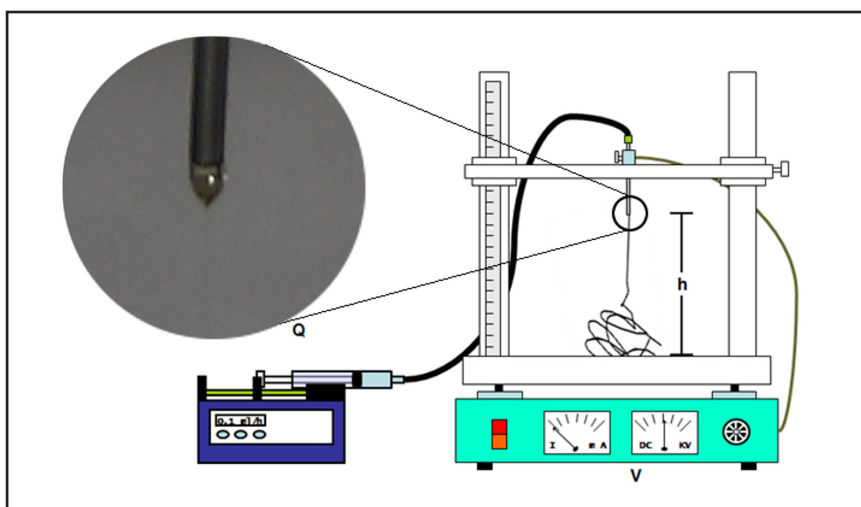


Figura 1. Esquema del proceso de producción de fibras mediante electrohilado.

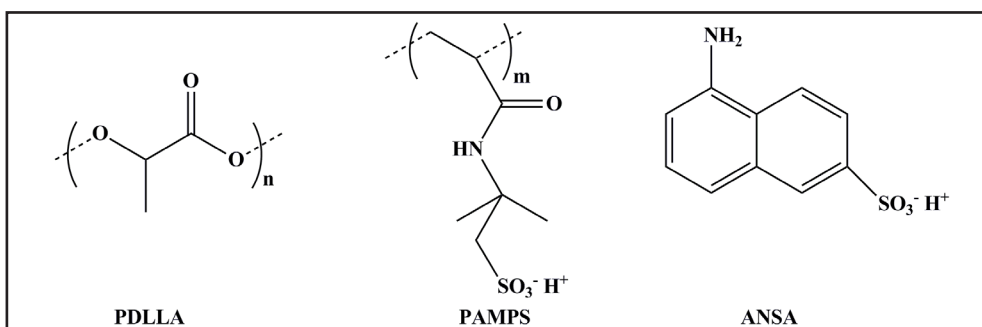


Figura 2. Estructura del PDLA, PAMPS y ANSA respectivamente.

El proceso de angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes. A pesar de ser un proceso que se da fundamentalmente durante el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas, existen numerosas enfermedades que están relacionadas con sus alteraciones: retinopatía diabética, psoriasis o el desarrollo de tumores sólidos [15-17]. Este proceso se encuentra regulado por el balance existente entre señales proangiogénicas y antiangiogénicas, y que se encuentra fuertemente influenciado por las funciones biológicas de proteoglicanos tipo heparán sulfato (HSPGs) y su capacidad de unión a numerosos factores de crecimiento implicados en el proceso de angiogénesis como son los factores de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), básico (bFGF) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La actividad de los HSPGs se basa en tres diferentes mecanismos de acción [18]:

- Incrementan la concentración local de ciertos factores proangiogénicos en las proximidades de los receptores celulares responsables de la activación de la angiogénesis.
- Inducen un cambio conformacional en dichos factores proangiogénicos facilitando su interacción con los receptores de la membrana celular.
- Inducen la oligomerización de los factores proangiogénicos permitiendo la dimerización y activación del receptor.

Por lo tanto la modulación de la interacción de los HSPGs con los distintos factores de crecimiento es una buena estrategia para la inhibición del proceso de angiogénesis y por lo tanto de las diferentes enfermedades relacionadas con sus alteraciones.

En este sentido el ANSA y el PAMPS presentan un marcado carácter antiangiogénico. Esta actividad se debe a que compiten con los HSPGs en la unión con los distintos factores de crecimiento, impidiendo que estos sean activados e interaccionen con los receptores de la membrana celular responsables de la activación del proceso de angiogénesis [19, 20].

Materiales y métodos

Para la formación de las redes de fibras nanométricas se ha utilizado un equipo de electrohilado diseñado en nuestro laboratorio. Este equipo está compuesto por una fuente de alimentación Glassman High Voltage EL50P00 que puede suministrar un voltaje de hasta 50 kV, una bomba de inyección Harvard11 Plus y un soporte para la

aguja y el colector fabricado en Teflón (Figura 1).

Para la síntesis de las mallas se ha utilizado ácido poli(D,L-láctico) (RESOMER® R207 – Boehringer Ingelheim GmbH) mezclado con la sal sódica del ácido 5-amino-2-naftalensulfónico o con el homopolímero del ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico.

Preparación de los compuestos antiangiogénicos.

La sal sódica del ANSA (95% Sigma-Aldrich) se preparó por neutralización del ANSA con una disolución de NaOH 7N.

El PAMPS se sintetizó mediante homopolimerización radical del ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (99% Avocado) en dioxano:agua (80:20) a 60°C y utilizando Azobisisobutironitrilo (AIBN) (Fluka, recristalizado en etanol) como iniciador radical. Para su purificación se precipitó varias veces en acetona y se liofilizó frente a agua utilizando una membrana de corte por peso molecular < 3000 Da.

Electrohilado

Para la obtención de las redes de fibras se utilizó una disolución de PDLLA al 10% en DMF/DCM (60:40). En la Figura 1 se presenta el esquema utilizado para la formación de las fibras mediante electrohilado. Se han optimizado las condiciones experimentales (distancia aguja-colector, intensidad del campo eléctrico y caudal de disolución de polímero) para conseguir los mejores resultados en la formación de las fibras (Tabla 1), obteniéndose diámetros de fibra inferiores a la micra. Con estas condiciones en 45 minutos se obtiene una red de fibras de unos 150 mm de diámetro y 200 μ m de espesor (Figura 3).

Estudios de degradación y liberación de compuesto activo

Para el estudio de la degradación del PDLLA y la liberación de ANSA o PAMPS se cortaron las fibras en trozos de aproximadamente 50 mg. Estos trozos se introdujeron en viales de PBS (pH = 7.4) y se mantuvieron a 37 °C con un baño termostático.

La liberación de ANSA o PAMPS se estudió mediante el análisis del medio donde se encuentran sumergidas las muestras con un detector UV/Vis (Lambda 16). Para la cuantificación de las medidas se obtuvo un recta de calibrado ($R^2=0.999$) de distintas disoluciones a $\mu=326$ nm para el ANSA o $\mu=229$ nm para el PAMPS, que corresponden al máximo de absorción de cada uno de los compuestos activos.

La degradación de las fibras se estudió mediante la variación en peso de la red y microscopía electrónica de barrido. Las muestras fueron lavadas con agua destilada y deshidratadas a vacío para comprobar la pérdida del peso del film. Posteriormente, los films secos fueron recubiertos con oro/paladio (40/60) y examinados con un equipo de microscopía electrónica de barrido (SEM) marca JEOL JSM-5600LV.

Ensayos biológicos: Capacidad de inhibición de la mitogénesis de fibroblastos inducida por aFGF

Los ensayos biológicos se llevaron a cabo introduciendo trozos de red de aproximadamente 30 mg en placas de cultivo de 24 pocillos a los que se añadió 1 ml de suspensión de fibroblastos (10000 células/ml) en DMEM completo. Las placas se incubaron durante 6 horas para permitir la fijación de los fibroblastos. A continuación se retiró el medio de cultivo y se añadió medio mínimo DMEM/Ham's F-12 con 6.4 ng/ml de aFGF y 100 µg/ml de Heparina de 3 kDa para activar el proceso de mitogénesis inducida por el aFGF. Las placas se han mantenido a 37°C y 5% CO₂ durante 72 horas.

El crecimiento celular sobre las redes de fibras se ha estudiado mediante tinción fluorescente con Calcein AM (Invitrogen). Para ello añadimos al medio una concentración de 1µl de Calcein AM

por cada 125 µl de medio y se dejó incubar durante 5 minutos. En este tiempo, las células viables metabolizan el producto adquiriendo un color verde. Para la visualización de las muestras se colocaron sobre portaobjetos, se recubrieron con medio de montaje Fluoromount-G (SouthernBiotech) y fueron visualizadas con un microscopio laser confocal (Leica TCS SP2)

La inhibición del proceso de mitogénesis inducida por aFGF se estudió mediante un ensayo MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxyfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]. Este ensayo no permite estudiar la proliferación celular debido a que el MTS es bio-reducido por las células obteniendo como subproducto una sal de formazán que es soluble en el medio de cultivo y presenta un máximo de absorbancia a 490nm. Para la realización de este ensayo se eliminó el medio de cultivo sustituyéndolo por 200 µL de medio fresco con 20 µL del reactivo MTS. Las placas se incuban durante 2 horas a 37°C y 5% CO₂, en este tiempo las células viables bio-reducen el reactivo MTS cuyo subproducto tiñe el medio de cultivo de forma proporcional al número de células presente. Tras la incubación se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (Biotech Synergy HT).



Figura 3. Red de PDLLA realizada por electrohilado.

Resultados y discusión

Redes de fibras mediante electrohilado

Utilizando las condiciones experimentales de la Tabla 1 se obtuvieron diferentes redes de PDLLA y de mezclas de PDLLA con ANSA o PAMPS. En la Figura 4 se muestran distintas imágenes de SEM de redes de PDLLA preparadas mediante la técnica del electrohilado. Las redes que se obtienen presentan una apariencia homogéneas con diámetro de fibras entre los 300-550 nm.

Cuando el proceso de electrohilado se realiza con una mezcla de PDLLA y ANSA se observa la aparición de agregados en las fibras, que pueden corresponder al ANSA, y un ligero aumento en el diámetro de las fibras entre 400-650nm (Figura 5).

El marcado carácter iónico del ANSA hace que presente una relativa incompatibilidad con el PDLLA (de carácter más hidrófobo), por lo que se agrupa formando esta serie de agregados que se observan en las fibras sin pasar a formar parte de ellas.

Las fibras obtenidas a base de PDLLA y PAMPS muestran alteraciones bastante importantes en su estructura (Figura 6). El carácter polimérico del sistema con PAMPS se pone claramente de manifiesto en la ausencia de agregados ya que forma fibras al igual que el PDLLA. Sin embargo el carácter hidrofílico e ionizable del PAMPS incompatible con el PDLLA hace que las fibras que se formen sean irregulares y de un tamaño mayor, llegando a alcanzar diámetros mayores de 1 μm .

Nombre	Materiales	Caudal (ml/min)	h (cm)	Voltaje (kV)
Control	PDLLA (100 %)	0.01	10	15
10ANSA	PDLLA-ANSA (90:10)	0.01	10	10
30ANSA	PDLLA-ANSA (70:30)	0.01	10	10
10PAMPS	PDLLA-PAMPS (90:10)	0.01	15	10
30PAMPS	PDLLA-PAMPS (70:30)	0.01	15	10

Tabla 1

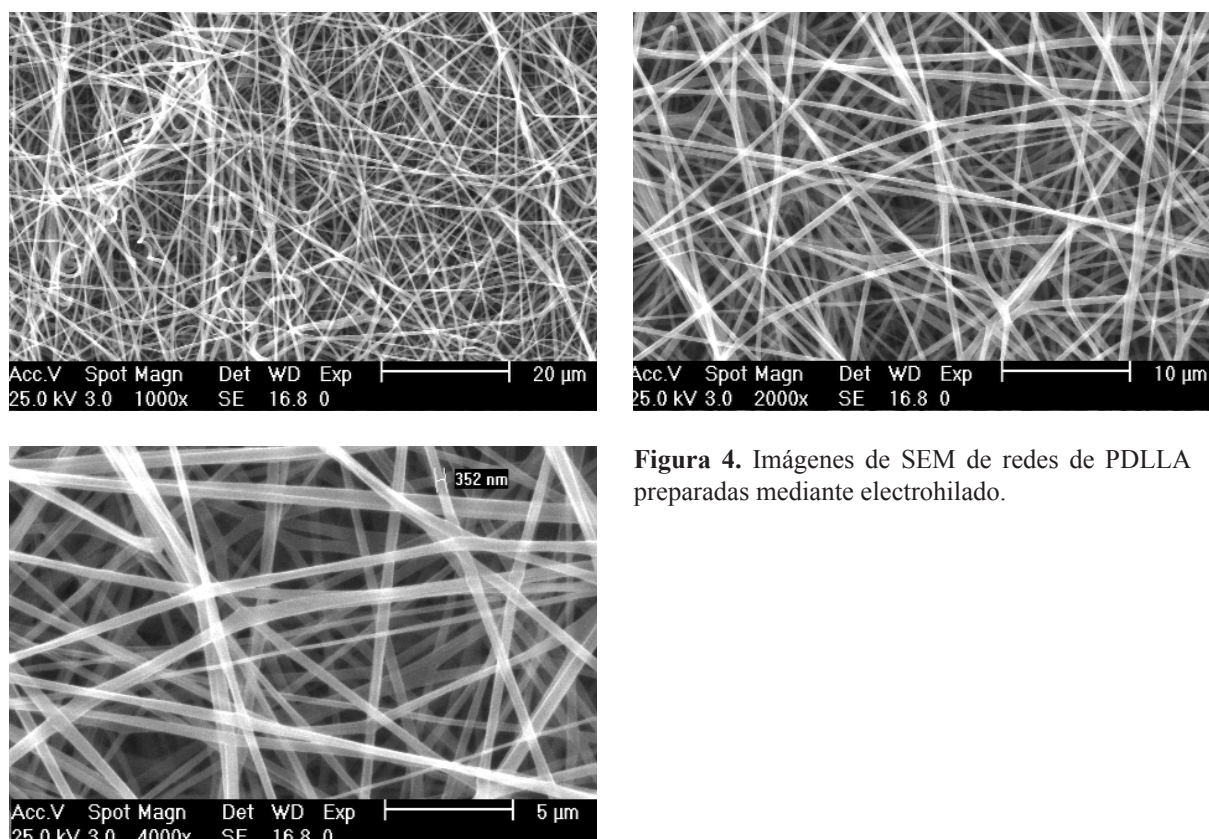


Figura 4. Imágenes de SEM de redes de PDLLA preparadas mediante electrohilado.

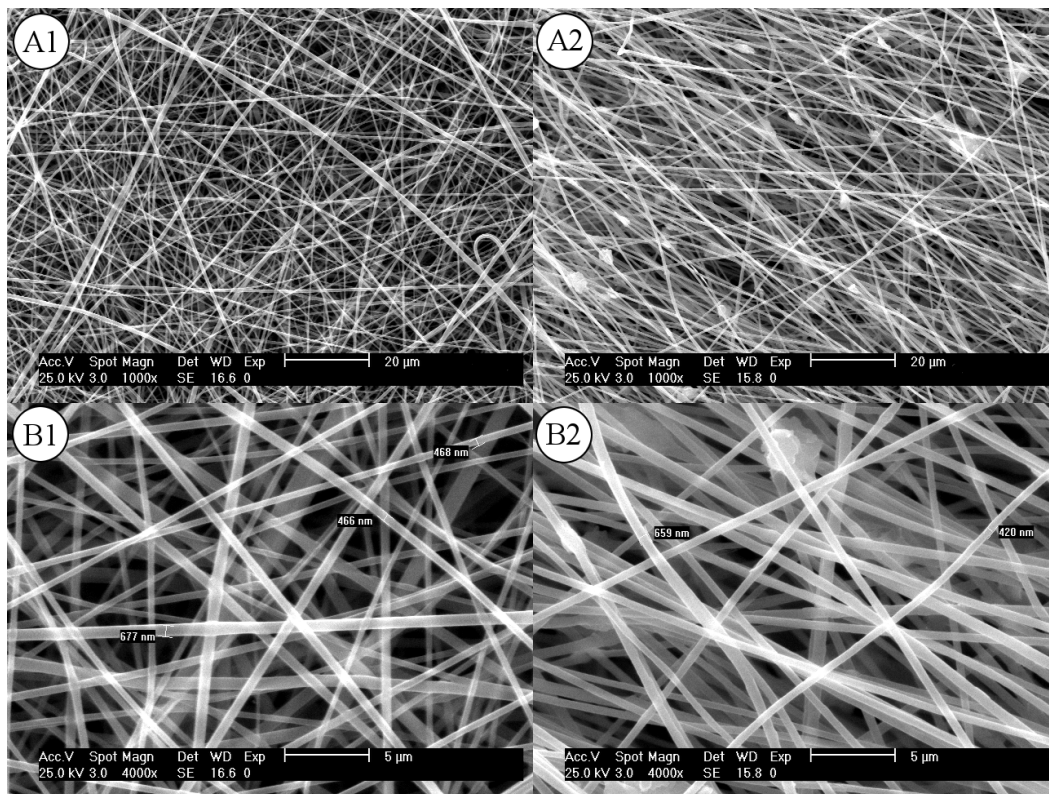


Figura 5. Imágenes de SEM de redes de PDLLA y ANSA preparadas mediante electrohilado. A) 10% ANSA, B) 30% ANSA, 1) 1000x, 2) 4000x.

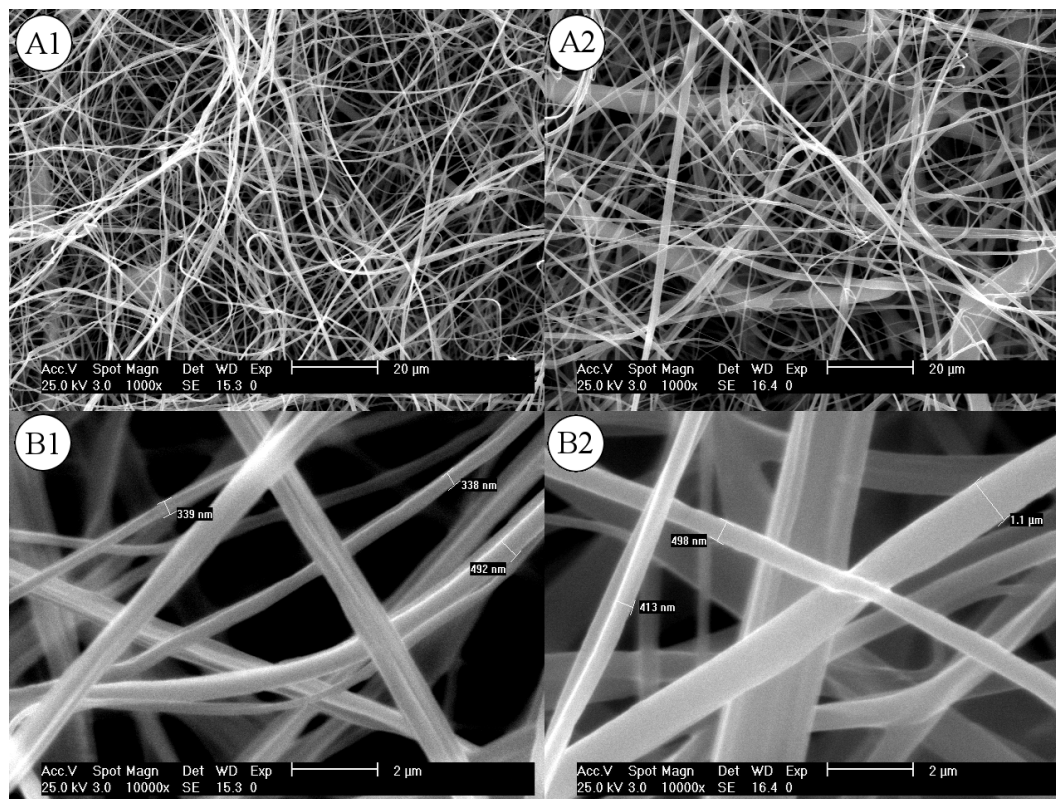


Figura 6. Imágenes de SEM de redes de PDLLA y PAMPS preparadas mediante electrohilado. A) 10% PAMPS, B) 30% PAMPS, 1) 1000x, 2) 4000x.

Liberación de compuesto activo

En la Figura 7 se muestran los resultados de la liberación del ANSA y del PAMPS para las redes cargadas con un 30 % de compuesto activo.

Se observó como el ANSA tiene una liberación prácticamente instantánea. Esto es consecuencia de la incompatibilidad entre el ANSA y el PDLLA que hace que una gran fracción del ANSA quede retenida en la superficie de las fibras formadas obteniendo una liberación inicial muy elevada, sin necesidad de que se degraden las fibras de PDLLA. El 20% de ANSA que queda sin liberar se encuentra incluido dentro de las fibras, por lo que no se liberará hasta alcanzar una degradación suficiente de estas. Esto se ha comprobado mediante mediciones de espectroscopia de rayos por energía dispersiva (EDAX) que demuestran que tras 20 días de liberación las fibras aun presentan una señal debida al grupo sulfónico del ANSA que se encuentra presente (Figura 8).

Para el caso del PAMPS su naturaleza polimérica impide relativamente la segregación del sistema ya que las cadenas de ambos polímeros se entrelazan impidiendo una que se dé una liberación rápida. Tras una liberación inicial del 40% en 4 horas, correspondiente a la fracción de polímero no entrelazado, tiene lugar una liberación más prolongada en el tiempo, llegando a alcanzar el 70% tras 20 días de liberación. Esta etapa lenta de liberación corresponde con el polímero que ha

pasado a formar parte de la fibra con el PDLLA y que no es capaz de liberarse hasta que la fibra empieza a degradarse.

Degradación de las redes de PDLLA

Durante las primeras semanas, el peso de las redes disminuye rápidamente debido a la liberación del ANSA o PAMPS. En la Figura 7 se observa como esta pérdida de peso inicial corresponde en términos de porcentaje con la liberación del compuesto activo de las redes. A tiempos mayores a 5 semanas la pérdida de peso es una combinación entre la liberación del PAMPS y la degradación de las redes de PDLLA. Esto se observa claramente en las imágenes de SEM (Figura 9) donde se aprecian claramente erosiones en las fibras de PDLLA, siendo estas mucho más acentuadas en el caso de la presencia de PAMPS o ANSA debido a que su liberación produce defectos en las fibras que aceleran el proceso biodegradativo.

Ensayos biológicos

En la Figura 10 se muestra la evolución de un cultivo de fibroblastos sobre una red de PDLLA. Se observa como las células crecen normalmente sobre la red de nanofibras sin sufrir ningún tipo de muerte por toxicidad debido a biocompatibilidad de las fibras de PDLLA.

En la Figura 11 se muestran los datos obtenidos en el ensayo de inhibición de la mitogénesis indu-

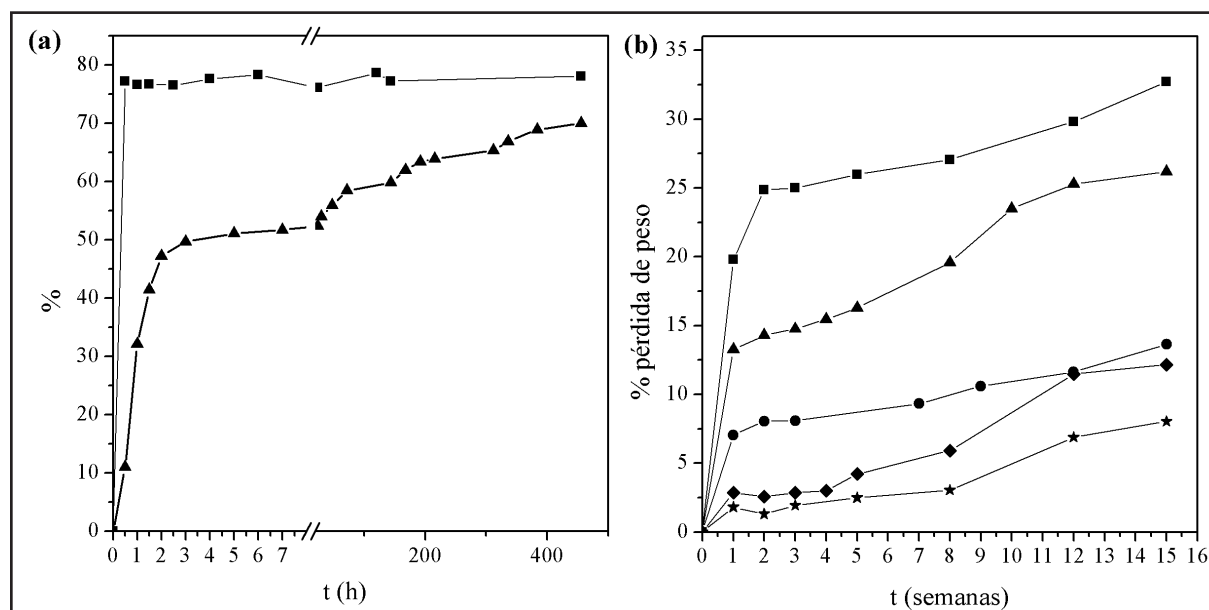


Figura 7. a) Liberación de PAMPS (triángulo) y ANSA (cuadrado) de las redes de PDLLA para los sistemas con un 30% de compuesto activo. b) Pérdida de peso de las redes sumergidas en PBS. Cuadrado: 30% ANSA, triángulo: 30% PAMPS, redondo: 10% ANSA, rombo: 10% PAMPS y estrella: PDLLA.

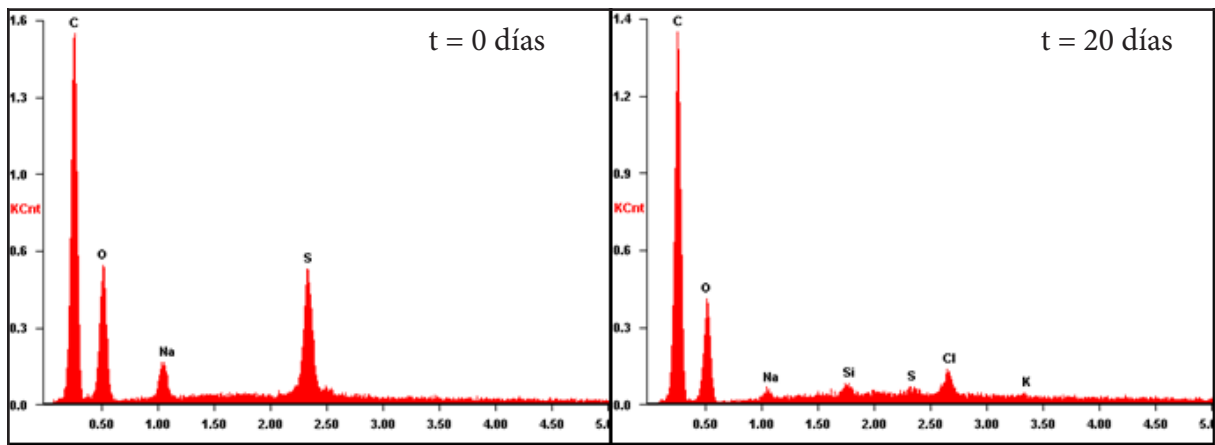


Figura 8. Análisis por EDAX de las redes de PDLLA y ANSA a 0 y 20 días.

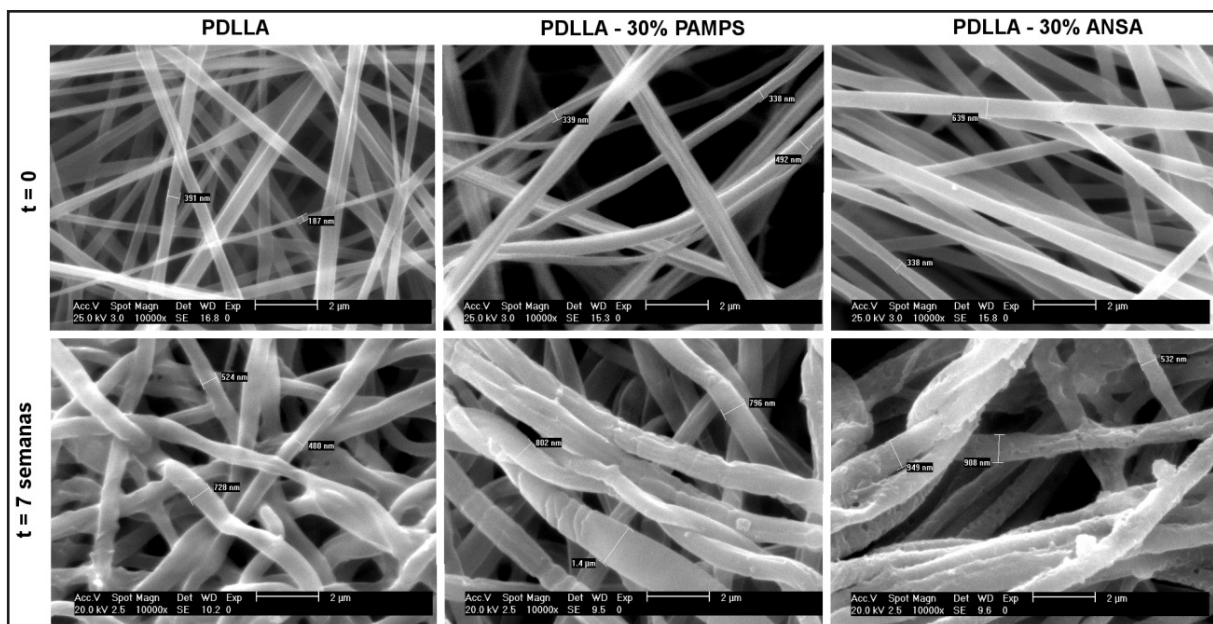


Figura 9. Imágenes de SEM de las redes de PDLLA con ANSA o PAMPS a 0 y 7 semanas.

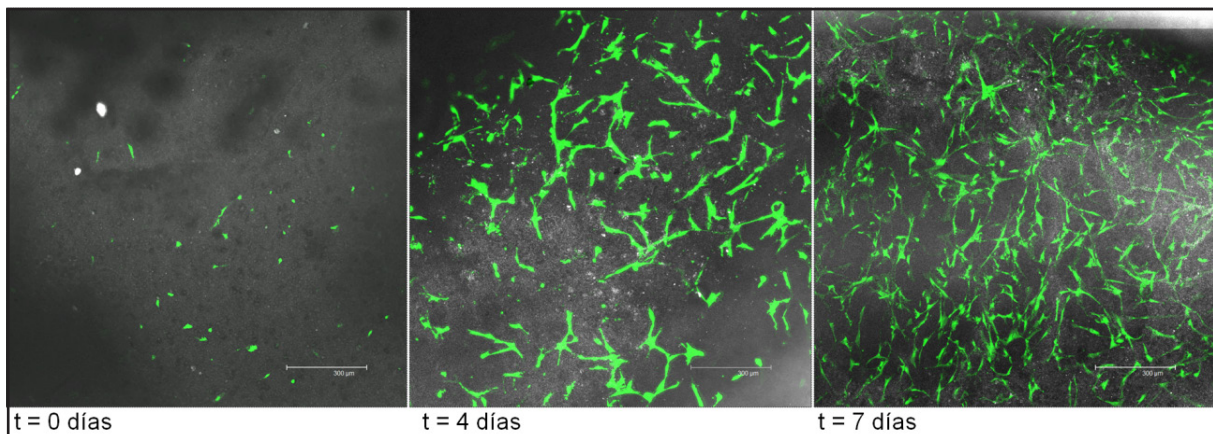


Figura 10. Imágenes de microscopía confocal de cultivos de fibroblastos sobre redes de PDLLA.

cida por aFGF. En el ensayo en ausencia del factor de crecimiento (-aFGF) se observa cómo el uso de distintos sustratos no produce un efecto significativo en el crecimiento celular. Sin embargo, la adición de aFGF al medio de cultivo (+aFGF) provoca un aumento de la proliferación celular sobre los films de PDLLA, ya que este factor de crecimiento activa el proceso de mitogénesis celular. Este efecto se ve contrarrestado cuando utilizamos las redes cargadas con ANSA o PAMPS. En este caso el proceso de mitogénesis inducida por el aFGF sufre una inhibición proporcional a la concentración de compuesto activo en la red. Esto se debe a que tanto el ANSA como el PAMPS interactúan con el aFGF impidiendo su unión con la heparina y por lo tanto impidiendo la activación del proceso de mitogénesis celular.

Conclusiones

El desarrollo de la técnica de electrohilado ha experimentado en los últimos años una considerable atención por parte de grupos de investigación de reconocido prestigio. Sus características permiten con relativa facilidad la preparación de mallas y sistemas porosos que ofrecen excelentes propiedades para ser aplicados en diferentes campos del área biomédica. En el presente trabajo se demuestra las posibilidades que ofrece para la preparación de sistemas relativamente complejos, formados por componentes de muy diferente estructura y naturaleza.

Por un lado tenemos las características inherentes a los polímeros biodegradables a base de

PDLLA, sistemas altamente hidrofóbicos pero biodegradables que en presencia de fluidos fisiológicos sufren un proceso hidrolítico autocatalítico por la presencia de grupos ácido carboxílicos que se generan en el propio proceso degradativo. Junto a este sistema polimérico hemos aplicado dos componentes bioactivos con actividad antiangiogénica por efecto de inhibición de la actividad del factor de crecimiento (aFGF):

- El ácido 5-aminonaftalensulfónico, que se incorpora al sistema polimérico físicamente y que tiene una marcada naturaleza hidrofílica e iónica. Los resultados obtenidos muestran claramente que como consecuencia de la incompatibilidad de este componente bioactivo ANSA con el polímero hidrofóbico PDLLA, una gran fracción de este compuesto de bajo peso molecular se queda retenido en la superficie del sistema electrohilado, y por lo tanto su liberación se produce de forma rápida y claramente sin necesidad de que sea necesario esperar a un proceso biodegradativo. Conociendo que los procesos hidrolíticos que originan la biodegradación del PDLLA están catalizados por la presencia de grupos ácidos carboxílicos generados durante el proceso de biodegradación, cabría esperar que el propio componente bioactivo ANSA podría catalizar el proceso biodegradativo, pero su liberación se produce de forma tan rápida que no permite que se produzca la interacción del grupo ácido sulfónico con la cadena polimérica de PDLLA. No obstante, el sistema actúa como un portador del componente bioactivo ANSA, que sin duda actúa de forma eficaz como inhibidor de la actividad del aFGF en el medio celular que se introduce.

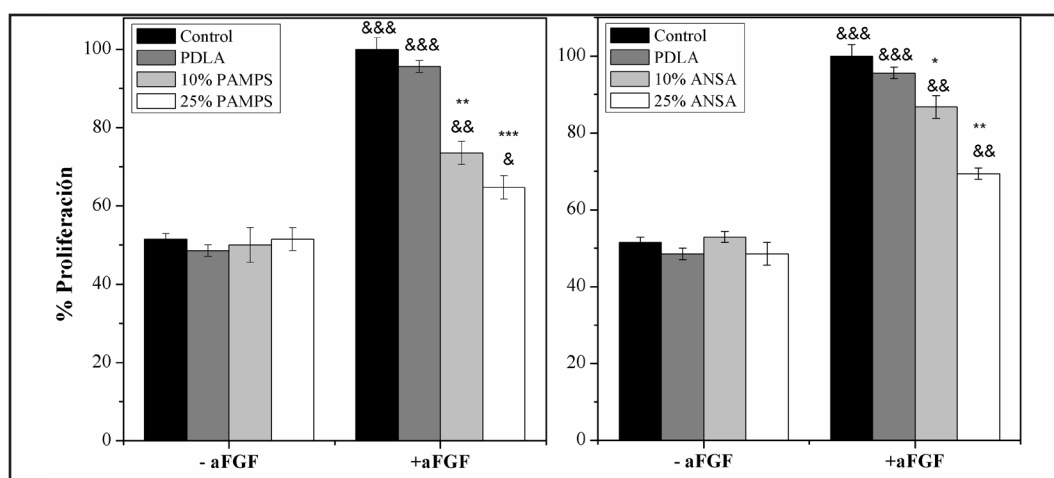


Figura 11. Ensayos de inhibición de la mitogénesis inducida por FGF de redes de PDLLA cargados con ANSA o PAMPS. Significancia estadística con ANOVA frente al control -aFGF (&: $p<0.05$, &&: $p<0.01$, &&&: $p<0.001$). Significancia estadística con ANOVA frente al control +aFGF (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$).

• Por otra parte, las características poliméricas del sistema PAMPS se ponen claramente de manifiesto al preparar el sistema PDLLA/PAMPS por electrohilado. En este caso el sistema polimérico hidrofílico e ionizable tiene una naturaleza polimérica, lo que impide relativamente la segregación del sistema, y por lo tanto la liberación del polímero bioactivo se produce en un periodo de tiempo mayor que el que corresponde al ANSA. Sin embargo su actividad se pone claramente de manifiesto en los ensayos celulares realizados y demuestra con claridad la utilidad y eficacia de la tecnología de electrohilado para la preparación de membranas porosas, mallas entrelazadas, y microfibras o nanofibras bioactivas para su aplicación en diversos medios como sistemas de control de la angiogénesis, de enorme interés en el campo biomédico.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MAT2010-18155) y el CIBER-BBN.

Referencias

1. **Hughes GA.** Nanostructure-mediated drug delivery. *Disease-a-month* 2005; 6:342-361.
2. **Barbu E, Molnár É, Tsibouklis J, Górecki DC.** The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: Overcoming the blood-brain barrier. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2009; 6:553-565.
3. **Bernards DA, Desai TA.** Nanoscale porosity in polymer films: Fabrication and therapeutic applications. *Soft Matter* 2010; 8:1621-1631.
4. **Xie G, Sun J, Zhong G, Liu C, Wei J.** Hydroxyapatite nanoparticles as a controlled-release carrier of BMP-2: Absorption and release kinetics in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2010; 6:1875-1880.
5. **Boudriot U, Dersch R, Greiner A, Wendorff JH.** Electrospinning approaches toward scaffold engineering - A brief overview. *Artificial Organs* 2006; 10:785-792.
6. **Katti DS, Robinson KW, Ko FK, Laurencin CT.** Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 2004; 2:286-296.
7. **Xie J, Wang CH.** Electrospun micro- and nanofibers for sustained delivery of paclitaxel to treat C6 glioma in vitro. *Pharmaceutical Research* 2006; 8:1817-1826.
8. **Cloupeau M, Prunet-Foch B.** Electrostatic spraying of liquids in cone-jet mode. *Journal of Electrostatics* 1989; 2:135-159.
9. **Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH.** Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics* 2001; 9:4836-4846.
10. **Blaker JJ, Nazhat SN, Maquet V, Boccaccini AR.** Long-term in vitro degradation of PDLLA/Bioglass® bone scaffolds in acellular simulated body fluid. *Acta Biomaterialia* 2011; 2:829-840.
11. **Filion TM, Xu J, Prasad ML, Song J.** In vivo tissue responses to thermal-responsive shape memory polymer nanocomposites. *Biomaterials* 2011; 4:985-991.
12. **García-Fernández L, Aguilar MR, Fernández MM, Lozano RM, Giménez G, Román JS.** Antimitogenic polymer drugs based on AMPS: Monomer distribution-bioactivity relationship of water-soluble macromolecules. *Biomacromolecules* 2010; 3:626-634.
13. **García-Fernández L, Aguilar MR, Fernández MM, Lozano RM, Giménez G, Valverde S, San Román J.** Structure, morphology, and bioactivity of biocompatible systems derived from functionalized acrylic polymers based on 5-amino-2-naphthalene sulfonic acid. *Biomacromolecules* 2010; 7:1763-1772.
14. **García-Fernández L, Halstenberg S, Unger RE, Aguilar MR, Kirkpatrick CJ, San Román J.** Anti-angiogenic activity of heparin-like polysulfonated polymeric drugs in 3D human cell culture. *Biomaterials* 2010; 31:7863-7872.
15. **Arbiser JL.** Angiogenesis and the skin: A primer. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1996; 3:486-497.
16. **Folkman J.** What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute* 1990; 1:4-6.
17. **Paleolog EM, Fava RA.** Angiogenesis in rheumatoid arthritis: Implications for future therapeutic strategies. *Springer Seminars in Immunopathology* 1998; 1-2:73-94.
18. **Iozzo RV, Zoeller JJ, Nyström A.** Basement membrane proteoglycans: Modulators Par Excellence of cancer growth and angiogenesis. *Molecules and Cells* 2009; 5:503-513.
19. **Fernández-Tornero C, Lozano RM, Redondo-Horcajo M, Gómez AM, López JC, Quesada E, Uriel C, Valverdell S, Cuevas P, Romero A, Giménez-Gallego G.** Leads for development of new naphthalenesulfonate derivatives with enhanced antiangiogenic activity. Crystal structure of acidic fibroblast growth factor in complex with 5-amino-2-naphthalenesulfonate. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 24:21774-21781.
20. **Liekens S, Neyts J, Dégrève B, de Clercq E.** The sulfonic acid polymers PAMPS [Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)] and related analogues are highly potent inhibitors of angiogenesis. *Oncology Research* 1997; 4:173-181.