

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCENCIAS  
MOLECULARES**

**APLICACIONES BIOMÉDICAS DE  
MATRICES POLIMÉRICAS  
FOTOTÉRMICAS**

**CLARA ESCUDERO DUCH  
MADRID, 2018**



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**APLICACIONES BIOMÉDICAS DE  
MATRICES POLIMÉRICAS  
FOTOTÉRMICAS**

Memoria presentada por Clara Escudero Duch, Licenciada  
en Biología, para optar al grado de Doctora

Directores

Dra. Nuria E. Vilaboa Díaz  
Dr. Francisco Manuel Martín Saavedra

**Nuria E. Vilaboa Díaz**, Doctora en Farmacia, Investigadora del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

**Francisco Manuel Martín Saavedra**, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

**CERTIFICAN:**

Que **Clara Escudero Duch**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: "Aplicaciones biomédicas de matrices poliméricas fototérmicas", que presenta como Tesis Doctoral.

Madrid, 26 de noviembre de 2018

Nuria E. Vilaboa Díaz

Francisco M. Martín Saavedra

Este trabajo se ha llevado a cabo mediante financiación concedida por los siguientes organismos: Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, PI15/01118), Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (SAF2013-50364-EXP), Comunidad Autónoma de Madrid (S2013/MIT-2862), Centro de Investigaciones Biomédicas en Red en Biomateriales, Bioingeniería y Nanomedicina CIBER-BBN y la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (Convocatoria de ayudas financiadas por Roche Farma).

*A mi familia*

*“La ciencia hace que las personas  
alcancen desinteresadamente la verdad y la objetividad  
y enseña a la gente a aceptar la realidad con asombro y admiración”  
(Lise Meitner)*

## **AGRADECIMIENTOS**

---

La presente Tesis es el resultado del esfuerzo de muchas personas que directa o indirectamente han formado parte de este trabajo.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Nuria Vilaboa, codirectora de esta tesis por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, en un momento en el que casi había perdido la esperanza de poder realizar una carrera científica. Por su paciencia, enseñanzas, dedicación y apoyo constante. Gracias Nuria.

Al Dr. Francisco M Martín-Saavedra, Pachi, codirector de esta tesis, por formarme con dedicación, tiempo y energía, estimular mi pensamiento crítico, y por tantas charlas compartidas.

Al Instituto de Salud Carlos III y al Ministerio de ciencia, innovación y universidades por la financiación del contrato predoctoral (FI14/00447) que me ha permitido desarrollar la presente tesis doctoral.

A la Universidad Autónoma de Madrid y a mi tutora durante el desarrollo de esta tesis la Dra. Carmela Calés por su ayuda.

A todos los miembros, pasados y presentes, de mi grupo de investigación por su apoyo y amistad. A Laura Saldaña y Gema por sus consejos, a María y Paco por ser siempre grandes compañeros, a Laura Muñoz, por enseñarme los secretos de las zimografías y por tantos buenos consejos, tan necesarios en esta etapa, a Fátima por servirme de brújula en el laboratorio y tener siempre una buena palabra. Por último y especialmente a Silvia (Silvi) mi compañera en este camino, por todo lo que he aprendido enseñándole, por sus ganas de trabajar, por miles de momentos compartidos, por su apoyo incondicional, y por qué sé que siempre podemos contar la una con la otra.

A todos mis compañeros de IdiPaz, por su amistad y por hacer que los días de trabajo siempre tengan ratos divertidos, especialmente a Luiz Stark, Paula, Lorena, Sonia, Mariajo... por ser gente autentica con la que siempre se puede contar.

A los técnicos de los servicios de IdiPaz, porque sin ellos todo sería más difícil, especialmente a Bea y Paula, por su ayuda y amistad. Gracias al resto de personas que trabajan en IdiPaz y que directa o indirectamente han contribuido a la realización de este trabajo.

A la Dra. Laura Benítez de la Universidad Complutense de Madrid por ayudarme a dar mis primeros pasos en este mundo. A todos mis amigos de la universidad con los que comparto amor por la ciencia, y que son muy importantes en mi vida.



## *Agradecimientos*

---

A mis amigos de Torre, mi familia elegida, por estar siempre ahí, por crecer conmigo y formar parte de mi vida, vuestro calor siempre me acompaña.

A mi familia, por quererme tanto y animarme siempre, a mi abuela por su amor incondicional, a mis tíos por su apoyo y cariño, a mis primos, que son como hermanos, por hacer mi vida mejor, y especialmente a mis padres y mi hermana porque sin ellos nada sería posible, por el inmenso amor, el apoyo vital, todos los consejos, y por cómo nos queremos y cuidamos entre los cuatro.

A los que estaban y ya no están, porque siempre están conmigo.

Y a ti amor, Juls, porque no pasa un día sin que me sienta afortunada de que nuestros caminos se juntasen, somos el mejor equipo del mundo y este trabajo no hubiera sido posible sin tu infinito amor.

Gracias

## **RESUMEN**

---

Los sistemas de liberación de agentes terapéuticos son tecnologías diseñadas para procurar su administración controlada y dirigida en el órgano o tejido necesitado de terapia. En el presente trabajo se han desarrollado hidrogeles fototérmicos como base de sistemas de liberación controlada de agentes terapéuticos. Para ello, se han combinado matrices poliméricas de diferente naturaleza con nanopartículas metálicas que presentan actividad fototérmica en el infrarrojo cercano (NIR).

La inclusión de liposomas termosensibles cargados con un fármaco antitumoral en matrices de fibrina fototérmica resultó en lipogeles capaces de responder a la energía de un láser NIR mediante la liberación del fármaco encapsulado, cuya bioactividad se comprobó tratando cultivos de células de carcinoma cervical humano. Los niveles de fármaco liberado desde el sistema son dependientes del tipo de nanopartícula y su concentración, la potencia láser y el régimen de irradiación utilizado. El sistema de liberación se optimizó añadiendo colesterol a la composición de los liposomas termosensibles, lo que disminuyó las fugas de fármaco a temperatura fisiológica e incrementó la liberación de fármaco tras tratamiento térmico.

La tecnología de matrices fototérmicas fue asimismo empleada para la obtención de andamiajes que pueden controlar la expresión transgénica mediante su respuesta a energía NIR, lo que permitiría definir patrones espaciotemporales de biodisponibilidad de productos génicos terapéuticos. Para ello, se incluyeron nanopartículas fototérmicas en matrices poliméricas basadas en fibrina, recombinámeros de elastina (ELR) y criogeles de un copolímero de 2-hidroxietilmetacrilato y ácido acrílico. Estas matrices resultaron ser biocompatibles y, en respuesta a NIR, generaron un incremento local de temperatura suficiente para activar en las células que contienen circuitos génicos inducibles por calor y dependientes de un ligando de bajo peso molecular. La incorporación de células troncales multipotentes en hidrogeles de fibrina que incluyen nanopartículas fototérmicas basadas en sulfuro de cobre (CuSNP) resultó en un incremento de la actividad metabólica, supervivencia y actividad fibrinolítica celular, así como en cambios en el transcriptoma relacionados con la respuesta angiogénica. Las células endoteliales incluidas en estos hidrogeles potenciaron la formación de estructuras pseudocapilares y la remodelación de la matriz de fibrina. La implantación a largo plazo de matrices de fibrina que incluyen CuSNP indujo una respuesta angiogénica que facilita su integración en los tejidos del hospedador mientras que la implantación de matrices de ELR y criogeles fototérmicos resulta en una baja respuesta inflamatoria y una degradación del biomaterial muy limitada.

## **SUMMARY**

---

Drug delivery systems are tools designed to administer therapeutic agents in a controlled manner to specific organs or tissues in need of therapy. In this work, we have developed photothermal hydrogels as platforms for controlled delivery of therapeutic agents. To this aim, we have included metallic nanoparticles having photothermal activity at near-infrared (NIR) wavelengths in polymeric matrices.

Incorporation of thermosensitive liposomes loaded with an antitumoral drug within photothermal fibrin matrix resulted in NIR-responsive lipogels that released their liposomal cargo after NIR irradiation. Released drug maintained their bioactivity as tested in cultures of human cervical carcinoma cells. Levels of drug released from the constructs were dependent on the type and concentration of NIR nanotransducers loaded in the lipogel, the intensity of deposited electromagnetic energy and the irradiation regime. The developed drug delivery platform was improved by the incorporation of cholesterol in thermosensitive liposomes formulation, which lessened leakiness of the liposomal cargo at physiological temperature and increased drug release after thermal treatment.

Photothermal matrices technology was also used to prepare NIR responsive scaffolds that are able to control transgenic expression, allowing to achieve spatiotemporal control over the bioavailability of therapeutic gene products. Photothermal nanoparticles were included within polymeric fibrin matrices, elastin like recombinamers (ELR) and cryogels of hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid copolymers. These matrices were biocompatible and transduced efficiently NIR energy into heat to activate transgene expression in cells harboring a gene switch triggered by heat and dependent on a low molecular weight ligand. Multipotent stem cells incorporated within fibrin hydrogels that include photothermal nanoparticles based in copper sulfide (CuSNP) increased metabolic activity, survival rate and fibrinolytic activity and displayed changes in their transcriptome related to angiogenic response. Endothelial cells entrapped within these matrices formed pseudocapillary structures and remodeled protein matrix. Long term implantation of CuSNP fibrin matrices induced an angiogenic response that facilitates its integration into the host tissue while implantation of photothermic ELR matrix and cryogels was characterized by low inflammation response and limited biomaterial degradation.

## **ÍNDICE**

---

---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1. TECNOLOGÍA LÁSER .....	9
2. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	10
2.1 NP de oro .....	11
2.2 NP de sulfuro de cobre .....	13
3. APLICACIONES BIOMEDICAS DEL LÁSER NIR Y NP METÁLICAS .....	13
3.1 Hipertermia .....	14
3.2 Sistemas de liberación de fármacos .....	15
3.3 Terapia génica .....	18
3.4 Ingeniería de tejidos.....	23
3.4.1 Matrices poliméricas.....	24
3.4.2 Control espaciotemporal de la liberación de FC .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
1. NIR-NP.....	35
1.1 Preparación y caracterización de HGNP.....	35
1.2 Preparación y caracterización de CuSNP .....	36
2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS CARGADOS CON DOX .....	36
2.1 Síntesis y caracterización de LTSL .....	36
2.2 Capacidad de encapsulación de LTSL y cinética de liberación de DOX.....	37
3. CULTIVOS CELULARES .....	38
4. MATRICES POLIMÉRICAS .....	39
4.1 Matrices basadas en fibrina .....	39
4.1.1 Preparación de hidrogeles de fibrina .....	39
4.1.2 Preparación de lipogeles .....	40
4.1.3 Caracterización de la cinética de liberación de DOX a partir de hidrogeles de fibrina .....	40
4.2 Recombinómeros de elastina.....	41
4.2.1 Síntesis y caracterización de los ELR.....	41
4.2.2 Modificaciones químicas de los ELR .....	42
4.2.3 Síntesis de ELR con grupos $\epsilon$ -amino sustituidos por azidas .....	42

4.2.4 ELR modificados con ciclooctinos .....	42
4.2.5 Conformación de geles de ELR.....	43
4.3 Criogeles .....	43
4.3.1 Síntesis de criogeles .....	43
4.3.2 Esterilización y siembra de criogeles.....	44
5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	44
6. ESPECTOMETRIA DE EMISIÓN ATÓMICA Y ESPECTOMETRIA DE ABSORCIÓN.....	45
7. REOLOGÍA .....	45
8. MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO LÁSER.....	45
9. VIABILIDAD CELULAR .....	46
10. ENSAYO DE ACTIVIDAD PLASMINA.....	46
11. IRRADIACIÓN NIR Y TERMOGRAFÍAS .....	47
12. EXPERIMENTOS EN ANIMALES .....	48
13. HISTOLOGÍA .....	49
14. CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD DEL GEN TESTIGO .....	50
15. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	50
16. ESTUDIO DE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	50
17. ZIMOGRFÍAS.....	51
18. ESTADÍSTICA.....	52
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
1. CARACTERIZACIÓN DE NIR-NP .....	55
2. LIPOGELES .....	57
2.1 Caracterización de LTSL-DOX.....	57
2.2 Lipogeles que contienen HGNP .....	58
2.2.1 Caracterización de lipogeles que contienen HGNP .....	58
2.2.2 Liberación de DOX mediante irradiación NIR .....	63
2.2.3 Optimización de la liberación de DOX mediante irradiación NIR de lipogeles fototérmicos.....	67
2.2.3.1 Incorporación de colesterol a LTSL-DOX.....	67
2.2.3.2 Lipogeles que contienen CuSNP .....	68



---

3. ESTUDIO DE INTERMEDIARIOS TISULARES BASADOS EN MATRICES POLIMÉRICAS FOTOTÉRMICAS.....	71
3.1 Hidrogeles basados en fibrina y NIR-NP.....	72
3.1.1 Caracterización de hidrogeles basados en fibrina y NIR-NP.....	72
3.1.2 Intermediarios tisulares basados en matrices fototérmicas basadas en fibrina para el control de la expresión transgénica.....	75
3.1.3 Bioactividad de matrices fototérmicas basados en fibrina y CuSNP .....	78
3.1.4 Actividad angiogénica de matrices fototérmicas basados en fibrina y CuSNP .....	86
3.2 Hidrogeles basados en ELR y NIR-NP.....	91
3.2.1 Intermediarios tisulares basados en matrices fototérmicas de ELR para el control de la expresión transgénica .....	92
3.2.2 Implantación de matrices fototérmicas basadas en ELR y NIR-NP.....	93
3.3 Criogeles basados en HEMA:AA y HGNP .....	95
3.3.1 Intermediarios tisulares basados en criogeles de HEMA:AA fototérmicos para el control de la expresión transgénica .....	96
3.3.2 Implantación de criogeles fototérmicos basados en HEMA:AA y HGNP ..	97
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
1. LIBERACIÓN CONTROLADA DE AGENTES TERAPEÚTICOS MEDIANTE LIPOGELES FOTOTÉRMICOS.....	102
2. MATRICES POLIMÉRICAS FOTOTÉRMICAS PARA LA EXPRESIÓN CONTROLADA DE GENES TERAPEÚTICOS.....	106
2.1 Matrices poliméricas fototérmicas basadas en fibrina .....	106
2.2 Matrices poliméricas fototérmicas basadas en polímeros sintéticos.....	110
2.3 Respuesta a la implantación de matrices poliméricas fototérmicas.....	112
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>119</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>147</b>

## **ABREVIATURAS**

---

- 7-AAD:** 7-aminoactinomicina D
- AA:** Ácido acrílico
- ADAM8:** Desintegrina 8
- ALDH1A1:** Aldehído deshidrogenasa 1
- Anexina V-FITC:** Anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína
- ANOVA:** Análisis de la varianza
- AOX3:** Aldehído oxidasa 3
- BMP-2:** Proteína morfogénica ósea 2
- CRIOTEM:** Criomicroscopía electrónica de transmisión
- CuSNP:** Nanopartículas de sulfuro de cobre
- DAVID:** *Database for annotation, visualization and integrated discovery*
- DMA:** N,N-dimetilacetamida
- DMEM:** *Dulbecco's modified Eagle medium*
- DMEM-20 % FBS:** *Dulbecco's modified Eagle medium* que contiene 20 % de suero fetal bovino
- DMEM-FBS:** *Dulbecco's modified Eagle medium* suplementado con suero fetal bovino
- DMF:** Dimetilformamida
- DOX:** Doxorubicina
- DPPC:** 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina
- DSC:** Calorimetría diferencial de barrido
- DSPE-PEG2000:** 1,2-Disteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-poli(etilenglicol)-2000
- EBM-2:** *Endothelial cell basal medium*
- EGM-2:** *Endothelial cell growth medium*
- eHSF1:** Factor de transcripción de choque térmico 1 endógeno
- ELR:** *Elastin-like recombinamer*
- EMEM:** *Eagle's minimum essential medium*
- EMEM-FBS:** *Eagle's minimum essential medium* suplementado con suero fetal bovino
- EPR:** Efecto de permeabilidad y retención aumentada

**FBG:** Fibrinógeno

**FBG-AF546:** Fibrinógeno humano conjugado con Alexa Flúor 546

**FBS:** Suero fetal bovino

**FC:** Factores de crecimiento

**G':** Módulo de almacenamiento

**G'':** Módulo de pérdidas

**HBS:** HEPES *buffer solution*

**HEMA:** 2-hidroxietil metacrilato

**HGNP:** Nanopartículas de oro huecas

**HSE:** Elemento de choque térmico

**HSF:** Factores de transcripción de choque térmico

**HSP:** Proteínas de choque térmico

**HUVEC:** Células humanas endoteliales de la vena del cordón umbilical

**I.V.:** Intravenosa

**IP:** Ioduro de propidio

**kPa:** Kilopascal

**LTS:** Liposomas termosensibles

**LTSL:** Liposomas termosensibles que contienen lisolípidos

**LTSL-DOX:** Liposomas termosensibles que contienen lisolípidos cargados con doxorrubicina

**LTSL-C:** Liposomas termosensibles que contienen lisolípidos y colesterol

**LTSL-C-DOX:** Liposomas termosensibles que contienen lisolípidos y colesterol cargados con doxorrubicina

**fLuc:** Luciferasa de luciérnaga

**MMP:** Metaloproteasas de matriz

**MP-AES:** Espectrometría de emisión atómica de plasma por microondas

**MSPC:** Monoestearilfosfatidilcolina

**NIR:** Infrarrojo cercano

**NOS2:** Óxido nítrico sintasa

**NP:** Nanopartículas

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PFA:** Paraformaldehído

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**qRT-PCR:** Retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RM:** Rapamicina

**RES:** Sistema reticuloendotelial

**SEM:** Microscopía electrónica de barrido

**SPR:** Resonancia localizada del plasmón de superficie

**TEM:** Microscopía electrónica de transmisión

**trp:** Promotor que responde a transactivador

**UV:** Ultravioleta

**UV-Vis-NIR:** Región del ultravioleta-visible-infrarrojo cercano

**VEGF:** Factor de crecimiento vasculoendotelial humano

**XDH:** Xantina deshidrogenasa/oxidasa

## **INTRODUCCIÓN**

---

## 1. TECNOLOGÍA LÁSER

El desarrollo de la tecnología láser fue posible gracias a los estudios teóricos realizados por Albert Einstein (1917) quien planteó que, en un medio inundado por radiaciones electromagnéticas, un fotón puede interaccionar con un átomo excitado mientras que este se halla aún en su configuración de energía superior. En su retorno al estado de energía fundamental, el átomo libera el exceso de energía en forma de un fotón idéntico al que ha inducido la transición, proceso que se denomina emisión estimulada. El hecho de que la emisión estimulada produzca dos fotones idénticos a partir de un fotón inicial es lo que permite amplificar la luz y es también responsable de que la luz generada sea coherente, es decir que los fotones emitidos estén acompañados manteniendo unos con otros una relación de fase definida. Este fenómeno, sentó las bases para la creación del láser. El término láser es un acrónimo del inglés *light amplification by stimulated emission of radiation* introducido por Gordon Gould en 1957. Tres años después Theodore Maiman construyó el primer láser funcional, un dispositivo basado en rubí capaz de generar radiación electromagnética relativamente uniforme en cuanto a longitud de onda, fase y polarización (Maiman, 1960). Las particularidades más relevantes del láser son la monocromaticidad, la sincronización en fase de sus fotones (coherencia), y su baja divergencia (colimación); resultando en haces de luz que se propagan en la misma dirección de forma paralela. Desde su aparición, la biomedicina ha tomado ventaja de las particularidades del láser para su uso en diferentes aplicaciones (Migliario y col., 2018). En función de su intensidad, los láseres utilizados en biomedicina se pueden dividir en láseres de alta y de baja energía. Los láseres de alta energía se pueden dividir a su vez en láseres de clase IV terapéuticos y quirúrgicos. Los primeros utilizan potencias por encima de 7500 mW y son capaces de penetrar 10 cm, se usan en el tratamiento de afecciones musculoesqueléticas, del dolor y para mejorar la cicatrización de heridas a través de su calentamiento. Por otro lado, los láseres de clase IV quirúrgicos se emplean en cirugía y terapias cosméticas ablativas donde el calor generado por la aplicación del láser en el órgano o tejido diana conlleva su destrucción (Worley y Cohen, 2018; van Straten y col., 2018). Los láseres de baja energía o clase III comprenden una amplia variedad de láseres con longitudes de onda entre los 600 y 1000 nm, que emplean potencias de entre 5 y 500 mW y cuyo efecto terapéutico no se asocia con el calentamiento de los tejidos biológicos. La investigación biomédica con este tipo de láseres se inició en 1967 cuando Mester y colaboradores observaron que su aplicación estimulaba el crecimiento del pelo de ratones (Mester y Tota, 1967). La terapia basada en este tipo de láser se ha utilizado en el tratamiento de la inflamación, del dolor, de enfermedades neurológicas y para promover la cicatrización de heridas. Sin embargo,

ni su eficacia terapéutica ha sido demostrada ni se conoce su mecanismo de acción, no existiendo tampoco consenso en la utilización de parámetros como la longitud de onda, la potencia de salida o el tiempo de aplicación (Chung y col., 2012).

La luz puede interactuar con los tejidos de 4 formas diferentes no excluyentes: transmisión, reflexión, dispersión y absorción. La transmisión hace referencia al paso de la luz a través de un tejido sin ningún efecto sobre éste ni en las propiedades de la luz mientras que la reflexión es el fenómeno por el cual la luz se refleja desde la superficie del tejido sin penetrar en el mismo. La dispersión implica la entrada de la luz en el tejido y, debido a la heterogeneidad de su estructura, su expansión más allá de la zona de incidencia lo que resulta en la limitación de la profundidad de penetración. Finalmente, la absorción es el fenómeno por el que los fotones de luz son captados por el tejido mediante los cromóforos presentes en éste (Carroll y Humphreys, 2006).

La absorción de energía lumínica por parte de los tejidos biológicos depende de su longitud de onda. P. ej., la radiación ultravioleta (UV) es absorbida por el DNA, los aminoácidos o la melanina de la piel; la radiación visible por la hemoglobina, y la radiación infrarroja principalmente por el agua. La región cercana del espectro infrarrojo (NIR, del inglés *near infrared*), situada entre 700 y 1200 nm, es absorbida de forma mínima por el agua y por tanto la luz consigue penetrar a mayor profundidad. Esta región del espectro, que se conoce como ventana del agua o ventana terapéutica, se caracteriza por presentar menor dispersión lumínica que la observada en las regiones del visible o UV (Sakudo, 2016). La energía NIR es capaz de alcanzar profundidades en tejidos biológicos de hasta 10 cm en pecho, 7 cm en músculo y 4 cm en cráneo o cerebro (Weissleder, 2001). El alto grado de penetración de energía NIR junto a su capacidad de interacción con ciertas nanoestructuras han permitido desarrollar avances tecnológicos en el campo de la imagen biomédica, el diagnóstico y las terapias no invasivas (Song y col., 2016).

## **2. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**

El calor que se produce al incidir energía lumínica en materiales metálicos es un efecto bien conocido. Para los metales en bloque, este fenómeno es independiente de la longitud de onda incidente dentro del espectro visible y de la forma del material. La reducción de tamaño a escala submicrométrica resulta en modificaciones de las propiedades fisicoquímicas de materiales metálicos. Las características termodinámicas, químicas, mecánicas, electrónicas, electromagnéticas o espectroscópicas se ven alteradas y, aunque se mantiene la inducción de calor



mediada por luz, en nanopartículas (NP) metálicas el aumento de temperatura pasa a ser altamente dependiente de la longitud de onda (Jaque y col., 2014; Abu-Salah y col., 2010). La posibilidad de otorgar nuevas propiedades a materiales metálicos ha propiciado el desarrollo en los últimos años de NP que posibilitan su uso en nuevas aplicaciones. En concreto, utilizando NP que actúan como agentes fototérmicos capaces de absorber energía en la región NIR (NIR-NP) se han generado herramientas diagnósticas, p. ej., agentes de contraste para imagen basada en resonancia magnética y biosensores moleculares; o bien herramientas terapéuticas, p. ej., agentes fototérmicos utilizados en protocolos de terapia antitumoral y en la liberación controlada de fármacos (Biffi y col., 2015).

## 2.1 NP de oro

Como material en bloque, el oro presenta muchas propiedades atractivas que se conservan en la escala nanométrica: es un material bioinerte, maleable, posee alta conductividad eléctrica, resistencia a la corrosión y a la oxidación. En cuanto a su interacción con la luz, el oro nanométrico experimenta una fuerte absorción de longitudes de onda específicas que está condicionada en gran medida por su morfología y la constante dieléctrica del medio (Cobley y col., 2011). Este fenómeno, denominado resonancia de plasmón de superficie (SPR, del inglés *surface plasmon resonance*), se basa en las características ópticas y fototérmicas derivadas de las oscilaciones resonantes de los electrones libres que se producen en presencia de luz de determinada longitud de onda. El fenómeno de fototermia implica que determinados tipos oro nanoestructurado sean capaces de convertir la energía lumínica absorbida en calor que se disipa al entorno provocando el aumento de temperatura del medio circundante (Ahmad y col., 2012). Este fenómeno se debe a la excitación de electrones de diferentes niveles atómicos que regresan al estado basal mediante la liberación de energía térmica. La SPR típica para nanoesferas de oro se localiza aproximadamente a una longitud de onda de 520 nm, pero puede ser desplazada a la región NIR mediante la modificación del tamaño y forma de las NP (Norouzi y col., 2018). Entre las nanoestructuras de oro capaces de desplazar su SPR hacia la región NIR se incluyen NP como *nanorods*, *nanoshells*, y *nanocages*. Este tipo de NP de oro se obtienen a través de protocolos de síntesis relativamente simples, siendo posible generar partículas uniformes en un amplio rango de tamaños. La facilidad de funcionalización de este tipo de nanomateriales ha posibilitado que su uso se popularice en múltiples aplicaciones bionanotecnológicas (Yeh y col., 2012).

Las *nanoshells* de oro huecas, conocidas también como NP de oro huecas (HGNP, del inglés *hollow gold nanoparticles*), consisten en una cubierta de oro

delgada con el interior desprovisto de material. Presentan un máximo de absorción intenso en la región NIR del espectro que viene determinado por la relación entre el diámetro y el espesor de la cubierta metálica y por la uniformidad de su tamaño (Schwartzberg y col., 2006). Las HGNP tienen varias ventajas sobre las NP macizas, como una mayor eficiencia de absorción de luz en la región NIR por unidad de masa, lo que redundaría en una reducción de la cantidad y coste del material necesario para su síntesis (Preciado-Flores y col., 2011). Además, el espacio hueco que poseen permite introducir fármacos y otras moléculas en su interior (You y col., 2012; Kumar y col., 2005). Tras irradiación con láseres que emiten en la región NIR del espectro, las HGNP han demostrado ser agentes fototérmicos eficientes tanto *in vitro* (Liu y col., 2014; Cebrián y col., 2013) como *in vivo* (Park y col., 2015; Wang y col., 2015; Martín-Saavedra y col., 2014).

Existe cierta controversia en cuanto a la biocompatibilidad de las NP de oro. Las características fisicoquímicas específicas de las distintas nanoestructuras sintetizadas, así como la variedad de metodologías y los diversos tipos celulares empleados para determinar su toxicidad, dificultan la comparación directa de resultados (You y col., 2014). Las NP se distribuyen por el organismo en función de su tamaño, siendo mayor la dispersión cuanto más pequeña es la nanoestructura (De Jong y col., 2008). En general las NP con tamaño superior a 8 nm no se excretan por la orina debido a que no es posible la filtración glomerular (Longmire y col., 2008). El sistema hepatobiliar es la ruta primaria de excreción de NP que no se excretan por vía renal. En general, las NP circulantes pueden ser captadas por hepatocitos que las eliminan por vía biliar si son metabolizables, y por células de Kupffer, que son parte del sistema retículo endotelial (RES del inglés *reticuloendothelial system*) y cuya capacidad de eliminación depende exclusivamente de procesos intracelulares. Por tanto, aquellas NP no susceptibles de degradación permanecen en las células siendo retenidas en el organismo (Chen y col., 2009). Investigaciones *in vitro* desarrolladas en nuestro grupo demuestran que concentraciones de HGNP entre 0,005 y 0,1 mg mL<sup>-1</sup> no son tóxicas en células de carcinoma cervical humano HeLa, durante un periodo de incubación de 48 h (Cebrián y col., 2013). You y colaboradores (2014) observaron que el tratamiento de células epiteliales de riñón de cerdo LLC-PK1 o de células de carcinoma hepatocelular humano Hep2G durante periodos superiores a 24 h con concentraciones superiores a 0,1 mg mL<sup>-1</sup> de HNGP pegiladas ya resultaba en efectos citotóxicos. Estos mismos autores no detectaron toxicidad asociada a la administración intravenosa (I.V.) en ratones de 10 dosis de 12,5 mg kg<sup>-1</sup> de NP distribuidas a lo largo de dos semanas. El análisis cuantitativo del oro depositado en hígado, bazo y riñón indicó una pérdida gradual pero lenta de las NP, cuya eliminación total necesita de

periodos de tiempo indeterminados. Guo y colaboradores (2013) observaron que 30 días después de la administración I.V. de 20 mg kg<sup>-1</sup> de HGNP pegiladas a ratones BALB/c, éstas aún se detectaban en la sangre mientras que tres meses después, el 70 % del oro inyectado permanecía en el hígado.

## **2.2 NP de sulfuro de cobre**

Los sulfuros de cobre son materiales inorgánicos binarios cuya fórmula general es Cu<sub>x</sub>S<sub>y</sub>. Se presentan como minerales en la forma de CuS (covelina) y Cu<sub>2</sub>S (chalcocita) así como materiales sintéticos. La versatilidad, disponibilidad y naturaleza poco tóxica de estos semiconductores tipo P los convierten en materiales muy interesantes para ciertas aplicaciones biomédicas. Es posible encontrarlos en diferentes estados que van desde compuestos ricos en cobre (Cu<sub>2</sub>S) a ricos en azufre (CuS), naturaleza que, entre otras propiedades, determina su comportamiento fotoeléctrico. El sulfuro de cobre no estequiométrico puede experimentar absorción plasmónica en la región NIR debido a la generación de portadores de carga libre (Roy y Srivastava, 2015; Shamraiz y col., 2016). Tal y como se ha descrito para el oro, la reducción de CuS a escala nanométrica resulta en alteraciones significativas de sus propiedades físicas, químicas, superficiales, magnéticas y ópticas respecto a las del material en bloque. El creciente interés por las NP de CuS (CuSNP) se puede atribuir a la facilidad para modular algunas de estas propiedades (Goel y col., 2014). Las CuSNP son capaces de absorber energía NIR y transformarla en calor mediante transiciones directas, transiciones indirectas o fotoexcitación plasmónica (Smith y col., 2015). Entre otras aplicaciones biomédicas, recientemente se ha explorado el uso de las CuSNP como herramientas analíticas en inmunoensayos o en plataformas de detección electroquímica (Yang y col., 2016, Peng y col., 2015), imagen diagnóstica (Ding y col., 2015), terapia fototérmica (Li y col., 2018; Li y col., 2010; Shi y col., 2018) y liberación controlada de fármacos (Ramadan y col., 2012; Bi y col., 2016). En contraposición a las HGNP, las CuSNP se degradan en sistemas acuosos y por tanto son susceptibles de eliminación por parte del organismo. En el trabajo de Guo y colaboradores (2013) se comparó la toxicidad y degradabilidad de dosis equivalentes de HGNP y CuSNP pegiladas y administradas por vía I.V., observando que solo las segundas son eliminadas al completo mediante excreción renal y hepatobiliar.

## **3. APLICACIONES BIOMEDICAS DEL LÁSER NIR Y NP METÁLICAS**

Como ya se ha comentado, la alta penetrabilidad de la energía NIR en tejidos biológicos, la disponibilidad de tecnología láser para su aplicación no invasiva y la

actividad fototérmica de NIR-NP metálicas biocompatibles, son factores que han estimulado en gran medida el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas.

### **3.1 Hipertermia**

La hipertermia se utiliza en clínica como una terapia adyuvante en el tratamiento del cáncer desde los años 70. Los tratamientos basados en hipertermia persiguen exponer el tejido tumoral a un calentamiento que lo destruya, fenómeno denominado “ablación térmica”. Temperaturas de 46 °C en adelante desencadenan daño celular irreversible, aumentando la probabilidad de necrosis en un alto porcentaje de células a tiempos de exposición tan cortos como 10 minutos. Temperaturas entre 46 y 52 °C reducen el tiempo de exposición necesario para provocar la muerte celular y provocan trombosis microvascular, isquemia e hipoxia comprometiendo seriamente la viabilidad del tejido. Temperaturas superiores a 60 °C provocan muerte celular instantánea mediante una desnaturalización rápida de las proteínas y la desestabilización de membranas lipídicas. En el rango de temperatura comprendido entre los 41 y 45 °C, la hipertermia puede ser empleada para aumentar la susceptibilidad de células tumorales a otros tratamientos, fenómeno que se denomina “sensibilización térmica”. El aumento moderado de temperatura en los tejidos provoca cambios en la permeabilidad vascular, aumentando el flujo sanguíneo y potenciando la acción de los agentes quimioterápicos (Hurwitz, 2010; Beik y col., 2016). Al deprimir la actividad metabólica de las células tumorales, el calor reduce la demanda de oxígeno en el tumor incrementando la oxigenación del tejido tumoral, convirtiendo a la hipertermia en un potente radiosensibilizador (Griffin y col., 2010). Los resultados de varios ensayos clínicos muestran que, en comparación con pacientes que solo reciben radioterapia o quimioterapia, el tratamiento adyuvante con hipertermia incrementa la supervivencia general de pacientes afectados por diferentes tipos de tumores sólidos, como el cáncer de mama, el melanoma, el sarcoma y el cáncer cervical localmente avanzado (Hurwitz, 2010; Moros y col., 2010; Issels y col., 2010). Las microondas, los ultrasonidos, la radiofrecuencia y el láser NIR son fuentes utilizadas para generar hipertermia en tejidos tumorales. El láser NIR, en virtud de la penetrabilidad de su longitud de onda y alto grado de focalización, está siendo activamente explotado en combinación con agentes fototérmicos (Wang y col., 2015; Norouzi y col., 2018). Una gran cantidad de nanomateriales, incluyendo varios basados en oro, han sido propuestos como agentes fototérmicos antitumorales (Park y col., 2015; Liu y col., 2014; Cebrián y col., 2013). Una de las principales limitaciones de esta aproximación terapéutica es la dificultad de la energía NIR para alcanzar tumores muy profundos (Li

y col., 2015). Actualmente se trabaja en eludir este problema empleando sondas capaces de conducir hasta zonas profundas fibras ópticas emisoras de energía NIR. Se trata de un procedimiento mínimamente invasivo denominado terapia láser intersticial, cuya efectividad está siendo validada en un ensayo clínico de ablación térmica de tumor de próstata (Stern y col., 2016).

### **3.2 Sistemas de liberación de fármacos**

El desarrollo de sistemas capaces de mejorar la absorción, biodisponibilidad y farmacocinética de agentes terapéuticos es un objetivo prioritario de la investigación biomédica (Biffi y col., 2015). Se persigue liberar la mayor cantidad posible del fármaco administrado en el órgano o tejido diana, impidiendo o minimizando su acceso y acumulación en localizaciones inespecíficas. En la práctica clínica, existe una necesidad creciente de optimizar sistemas de liberación controlada de fármacos para mejorar la eficacia terapéutica y minimizar riesgos (Kwon y col., 2012). Un ejemplo es la optimización de sistemas de liberación de fármacos antitumorales para evitar los efectos secundarios derivados de la administración de quimioterapéuticos sistémicos (Park, 2007). En los últimos años se han desarrollado sistemas que conjugan diferentes fármacos con NP para prolongar su vida media y mejorar su biodistribución, además de permitir la utilización de vías de administración alternativas. Un ejemplo de esto es la conjugación de HGNP y *nanorods* de oro que absorben en la región NIR con fármacos como la doxorubicina (DOX) (Arunkumar y col., 2015). Este fármaco quimioterapéutico de la familia de las antraciclinas presenta un amplio espectro de actividad frente a distintos tipos de cánceres humanos. Se usa, solo o en combinación con otros fármacos, para tratar una gran variedad de tumores sólidos y hematológicos. Sin embargo, su utilidad clínica se ha visto limitada debido a su alta toxicidad, siendo la cardiotoxicidad el efecto secundario grave más frecuente (Cappetta y col., 2017). You y colaboradores (2012), prepararon HGNP pegiladas como vehículos para transportar DOX. Observaron que la toxicidad de estas NP, administradas por vía I.V. a ratones desnudos, era menor que la de dosis equivalentes de DOX libre. Empleando un modelo xenográfico de carcinoma de mama humano en estos animales, estos mismos autores detectaron que la irradiación con un láser NIR de los tumores, en los que se acumulaban las NP, resultaba en mayor eficacia antitumoral que la observada en animales tratados con la misma concentración de DOX libre.

Los sistemas de liberación controlada de fármacos basados en sistemas liposomales han sido extensamente investigados debido a su potencial terapéutico en un amplio rango de aplicaciones clínicas. Los liposomas son vesículas compuestas por al menos una bicapa lipídica alrededor de un lumen acuoso que posibilitan la

encapsulación de moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas. Los sistemas liposomales son muy atractivos debido a la facilidad para modificar su composición química, su estructura y su tamaño coloidal (Dou y col., 2017; Lamichhane y col., 2017), lo que ha permitido el desarrollo de numerosas formulaciones farmacológicas (Johnston y col., 2006; Laginha y col., 2005). Problemas inherentes a los sistemas liposomales son el bajo grado de retención de ciertos fármacos en la vesícula, o la baja eficiencia de liberación del fármaco tras la exposición del liposoma a las proteínas del suero. Estos problemas están siendo atajados mediante la manipulación de la composición lipídica de las membranas liposomales. La adición de colesterol, que es capaz de modular la rigidez el espesor, la estabilidad y la fluidez de las membranas, permite reducir las pérdidas del contenido liposomal (Allen y Cullis, 2013; Kaddah y col., 2018). Por otro lado, se han diseñado diferentes sistemas para desencadenar la liberación de fármacos y conseguir la liberación controlada del contenido liposomal en una localización concreta. Para ello se han generado composiciones lipídicas capaces de liberar su contenido en respuesta a estímulos activadores que pueden ser locales y específicos de determinados órganos, tejidos, tipos celulares o localizaciones subcelulares, como p. ej., cambios de pH o actividades enzimáticas; o bien en respuesta a agentes físicos externos que, tras su aplicación, activan la liberación del contenido liposomal. Estímulos activadores externos frecuentemente utilizados para la liberación del contenido liposomal son los ultrasonidos, los campos magnéticos, la radiofrecuencia y la luz (Ponce y col., 2006; Puri y col., 2009; Bibi y col., 2012; Du y col., 2015; Graham y col., 2014), destacando aquellos cuyo mecanismo de acción se basa en un incremento de la temperatura.

Los liposomas termosensibles (LTS) son formulaciones ideadas por Yatvin y colaboradores (1978). Anyarambhatla y Needham (1999) sintetizaron una nueva clase de liposomas termosensibles que albergan lisolípidos en su estructura. En respuesta a un aumento de temperatura, estos fosfolípidos con una sola cadena de ácidos grasos desestabilizan la membrana lipídica abriendo poros que permiten la liberación de las moléculas encapsuladas mientras que a temperatura fisiológica la membrana se encuentra estabilizada. Así, los liposomas termosensibles que incluyen lisolípidos (LTSL) liberan su contenido a la temperatura de transición de fase con mayor rapidez que los LTS de los que derivan. Por otra parte, la adición de lisolípidos disminuye la temperatura de transición del LTS original hasta rangos que oscilan entre 39 y 41 °C, temperaturas fácilmente alcanzables en clínica mediante las tecnologías actualmente disponibles (Mills y Needham, 2005; Needham y col., 2000). En este rango de temperaturas, coexisten los estados sólido y fluido de las membranas lipídicas aumentando su permeabilidad a pequeñas moléculas como iones y fármacos como

DOX, y los lisolípidos actúan como estabilizadores (Landon y col., 2011; Forbes y col., 2014). Empleando LTSL se ha conseguido liberar DOX encapsulada en respuesta a un aumento local de temperatura mediado por ultrasonidos de alta intensidad (Grull y Langereis., 2012) o por inmersión en baño de agua termostatizado (López-Noriega y col., 2014). Un ejemplo de LTSL es Thermodox<sup>®</sup>, una formulación liposomal de DOX que se administra por vía I.V. y que emplea el calor generado en tejidos irradiados con radiofrecuencias para liberar el fármaco a temperaturas que exceden los 40 °C. Thermodox<sup>®</sup>, es la primera y única formulación liposómica termosensible que ha alcanzado desarrollo clínico de fase III (Dou y col., 2017). Su efectividad está siendo evaluada en combinación con ablación térmica por radiofrecuencia, una fuente de energía no focalizable, en el tratamiento de carcinoma hepatocelular en el ensayo clínico OPTIMA (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02112656>), que surgió a raíz de los resultados prometedores obtenidos a partir de los análisis *post hoc* del ensayo clínico HEAT (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00441376>).

Un factor crucial para el éxito de los tratamientos antitumorales basados en formulaciones liposomales es el acceso de las vesículas en circulación al tumor en concentración suficiente para que el fármaco tenga efecto terapéutico. El efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR del inglés, *enhanced permeability and retention effect*) explica cómo las formulaciones liposomales son capaces de atravesar el endotelio de los vasos sanguíneos y acumularse en el tumor (Matsumura y Maeda, 1986). Una de las características más importantes que distingue al tejido tumoral es que estimula la angiogénesis con el fin de facilitar el crecimiento anormal de células cancerosas, dando lugar a un crecimiento de vasos sanguíneos con arquitectura defectuosa que presentan fenestraciones con diámetros que oscilan entre 100 y 800 nm (Sapra y Allen, 2003). Esta fisiopatología, en combinación con un pobre drenaje linfático, es la causante del efecto EPR (Fenaroli y col., 2018). Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de la administración sistémica de liposomas es la falta de homogeneidad en su distribución, accediendo a zonas alejadas de la vasculatura tumoral, lo cual puede comprometer su efectividad clínica. Actualmente se trabaja en el desarrollo de tecnologías para dirigir y concentrar de forma precisa liposomas en la región tumoral, p. ej., mediante la funcionalización de éstos con anticuerpos específicos de proteínas sobreexpresadas o específicas de células tumorales (Wang y col., 2018). Este tipo de estrategias, en combinación con fuentes de energía focalizables para generar hipertermia local, son recursos que potencialmente maximizan la eficacia terapéutica de sistemas de liberación controlada basados en LTSL.

Los polímeros biodegradables y biocompatibles han emergido durante los últimos años como prometedores sistemas de liberación de fármacos. Se han utilizado polisacáridos como alginato, dextrano o quitosano, proteínas como fibrina o colágeno y también polímeros sintéticos (Ahmad y col., 2015). Los hidrogeles se definen como redes tridimensionales de polímeros que contienen un alto porcentaje de agua y como biomateriales poseen dos características fundamentales: 1) son materiales blandos y elásticos a un nivel similar al de tejidos biológicos no mineralizados y 2) son sistemas abiertos capaces de intercambiar sustancias con el medio circundante (Kamata y col., 2015). Dadas estas características, los hidrogeles constituyen un tipo particularmente atractivo de sistema de administración de fármacos que ha sido exitosamente ensayado en campos como la cardiología, oncología, o inmunología (Li y Mooney, 2016). La inclusión en el interior de hidrogeles de liposomas cargados con fármacos evita su difusión pasiva (Chung y col., 2006; Wang y col., 2008), constituyendo una nueva plataforma para la liberación de fármacos que se denominada "lipogel". En los últimos años, este tipo de sistemas se han ensayado en escenarios de medicina regenerativa como es el caso de polímeros de quitosano o colágeno que contienen LTSL y que cargan respectivamente, el fármaco angiogénico deferoxamina (O'Neill y col., 2017) o PTHrP(107-111), proteína osteogénica relacionada con la hormona paratiroidea (López-Noriega y col., 2014).

### **3.3 Terapia génica**

La terapia génica es una herramienta terapéutica cuyo objeto es la introducción de ácidos nucleicos en células o tejidos diana para corregir o restaurar su funcionalidad. Su aplicabilidad se extiende desde enfermedades monogénicas como la fibrosis quística hasta las enfermedades adquiridas como el cáncer o las infecciones. La terapia génica emplea diferentes estrategias: inserción de un gen normal para compensar un gen deletado, sustitución de un gen mutante por un gen silvestre, reparación de un gen no funcional introduciendo una mutación selectiva o bien el control de la expresión de un gen de interés mediante la estimulación o represión de secuencias reguladoras. El material genético terapéutico se transfiere a las células diana utilizando vectores que tradicionalmente han sido clasificados como virales y no virales. Los vectores virales han sido ampliamente utilizados, habiéndose empleado hasta la fecha en la realización de más de 2800 ensayos clínicos (Ginn y col., 2018). Aunque presentan grandes ventajas como su alta eficiencia en la transferencia de transgenes, los vectores virales presentan importantes limitaciones como su escasa capacidad para transferir material genético de gran tamaño, inmunogenicidad,



toxicidad, problemas de producción a gran escala, almacenaje y, en el caso de vectores virales integrativos, los riesgos asociados a la inserción de material genético en el genoma. Por estas razones, el desarrollo de vectores no virales resulta de gran interés ya que pueden proporcionar ventajas con respecto al perfil de seguridad y teóricamente carecen de limitación en cuanto a la capacidad de la información genética que pueden transferir (Foldvari y col., 2016). La terapia génica *in vivo* administra directamente los vectores, de forma sistémica o bien local en el tejido u órgano diana. En la terapia génica *ex vivo*, el gen de interés se transfiere *in vitro* a una población celular para posteriormente seleccionar y administrar las células modificadas genéticamente. Desde un punto de seguridad clínica, la terapia génica *ex vivo* es una aproximación más conveniente ya que minimiza la respuesta inmune y los efectos tóxicos que pueden generar las partículas virales (Heyde y col., 2007).

Gran parte de las estrategias ensayadas en el ámbito de la terapia génica se han apoyado en el uso de promotores constitutivamente activos, de forma que la producción del transgén no puede ser regulada. Se han desarrollado aproximaciones más sofisticadas que utilizan circuitos génicos que permiten la producción fisiológica de transgenes terapéuticos en una ventana temporal susceptible de ser controlada. De forma general, consisten en un transactivador quimérico que es activado o inactivado por un ligando específico, y en un promotor que es activado por el transactivador para regular la expresión del transgén terapéutico. En estos sistemas, la ventana temporal de expresión transgénica está condicionada por la presencia o ausencia del ligando. Un ejemplo de estos circuitos son los que responden a tetraciclina, basados en los elementos reguladores que controlan el operón de resistencia a tetraciclina en bacterias (Hillen y Wissman, 1989). Otro tipo de circuitos génicos utilizan transactivadores derivados de receptores de esteroides, como el receptor de ecdisona, hormona esteroidea de insectos; o de un mutante del receptor de progesterona activable por mifepristona o ulipristal, antagonistas de la progesterona (No y col., 1996; Bloom y col., 2015). Otro tipo de sistemas de expresión génica que se han utilizado para regular temporalmente la expresión transgénica son aquellos que se basan en transactivadores quiméricos activados por dimerizadores. Estos sistemas utilizan un factor de transcripción heterodimérico en el que el dominio de unión al DNA y el de transactivación se expresan de forma independiente y carecen de afinidad entre sí. En presencia de un ligando específico del sistema, ambos módulos dimerizan posibilitando la formación de un transactivador funcional con capacidad para activar el promotor que controla la expresión del transgén terapéutico (Rivera y col., 1996). Además de regular temporalmente la expresión transgénica, también se han desarrollado sistemas que permiten restringir la expresión de transgenes terapéuticos

en localizaciones anatómicas concretas. Las primeras estrategias se basaban en el empleo de promotores específicos de células o tejidos (Beck y col., 2004; Melo y col., 2004). Sin embargo, estas aproximaciones presentan importantes limitaciones como la ausencia de total especificidad de los promotores, la dificultad para modular el nivel de activación y la necesidad de usar diferentes promotores para cada órgano o tejido diana. Una estrategia alternativa emplea promotores que pueden activarse virtualmente en cualquier localización anatómica en respuesta a un estímulo físico, como p. ej., la radiación ionizante, que activa la transcripción de genes de expresión rápida como *EGR1*. De este modo, el promotor de *EGR1* ha sido utilizado en combinación con radioterapia para sobreexpresar el factor de necrosis tumoral en diferentes tumores sólidos (Weichselbaum y Kufe, 2009; Chang y col., 2012; Hecht y col., 2012). Otros sistemas de control espacial de la expresión transgénica son inducibles por luz con diferente longitud de onda, como el sistema activable por luz azul (480 nm) (Ye y col., 2011), por luz roja (645-700 nm) (Müller y col., 2013a) o por luz UVB (10-400 nm) (Müller y col., 2013b). Los sistemas inducibles por luz presentan importantes limitaciones ya que los componentes que los constituyen no están humanizados, pudiendo generar problemas de inmunogenicidad. Además las longitudes de onda de las que depende su activación se caracterizan por su escasa capacidad de penetración en tejidos biológicos lo que compromete seriamente su aplicabilidad.

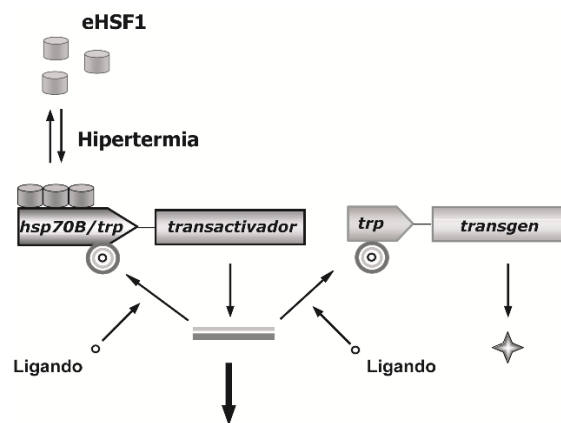
Los sistemas inducibles por calor han sido exhaustivamente explorados con el fin de regular la actividad transgénica (Vilaboa y Voellmy, 2015). Como se ha comentado anteriormente, el calor es un estímulo factible de aplicar en una región anatómica de interés. Los sistemas inducibles por calor emplean los promotores de genes que codifican para las proteínas de choque térmico (HSP, del inglés *heat shock protein*) que constituyen un grupo de moléculas altamente conservadas que se inducen en respuesta a aumento en la temperatura de los organismos y actúan como chaperonas moleculares. La nomenclatura de estas proteínas, también conocidas como proteínas de estrés, se relaciona con su peso molecular en kDa. A temperatura fisiológica, esta familia de proteínas participa en numerosas funciones celulares, incluyendo la maduración y plegamiento de proteínas, el ensamblaje de complejos multiproteicos, la regulación de la actividad de moléculas de señalización o el tráfico intracelular. Las HSP ejercen un papel fundamental en procesos de estrés celular causados no solo por el aumento de temperatura sino por agentes estresantes como p. ej., ciertos agentes químicos. Ante un estímulo estresante, los promotores de genes *HSP* se activan conduciendo al aumento de los niveles de proteínas de estrés que contribuyen al correcto plegamiento de proteínas desestabilizadas como consecuencia

del agente estresante, o bien a su eliminación cuando el replegamiento no es posible (Voellmy y col., 1985; Schiller y col., 1988; Dreano y col., 1986). Los promotores de genes *HSP* contienen los denominados elementos de choque térmico (HSE del inglés *heat shock elements*), que confieren la capacidad de regulación térmica a estos promotores. Están compuestos por tres o más repeticiones de la secuencia pentamérica 5'-nGAAn-3', reconocidas por los factores de transcripción de choque térmico (HSF del inglés *heat shock factor*) que actúan como activadores transcripcionales. Las células de mamíferos expresan varios tipos de HSF, siendo HSF1 el que ejerce el papel más relevante durante los procesos de estrés celular. En ausencia de este factor no se observa la inducción por calor de la expresión de los genes *HSP* (Christian y Benjamin, 2006). En condiciones fisiológicas, HSF1 se encuentra en el citoplasma en forma de monómero inactivo. La exposición a estrés induce la homotrimerización del factor, que se transloca al núcleo donde tras unirse a los HSE adquiere capacidad transcripcional e induce la expresión de genes *HSP*. El estímulo estresante condiciona la magnitud de la activación de los promotores de genes *HSP* que, dentro de ciertos límites, es proporcional a la intensidad de dicho estímulo. Una vez decae el estímulo estresante, HSF1 se transloca de nuevo al citoplasma mediante mecanismos aún no bien definidos, lo que conduce a la inactivación de los promotores de genes *HSP*.

El promotor del gen humano *HSP70B* presenta una actividad basal muy baja que puede incrementar hasta tres órdenes de magnitud una vez la célula es sometida a estrés térmico de cierta intensidad (Voellmy y col., 1985). Estas características lo convierten en una herramienta muy poderosa para regular la expresión inducible de transgenes con actividad terapéutica. Desde la década de los 90 se ha estudiado la posibilidad de utilizar este promotor para el control localizado de la expresión de transgenes. Los métodos más sencillos para administrar calor a células o animales de experimentación se basan en el contacto con una superficie o líquido con una temperatura determinada. Los métodos más sofisticados se basan en microondas (Fujita y col., 2012), radiación infrarroja (Deguchi y col., 2009) y ultrasonidos (Guilhon y col., 2003; Deckers y col., 2009) y permiten administrar el calor de forma no invasiva e incluso focalizada al órgano o tejido diana. Asimismo, se ha utilizado la luz NIR para irradiar nanotransductores como *nanohorns* de carbono o HGNP con el fin de activar la expresión de transgenes controlados por el promotor *HSP70B* (Miyako y col., 2012, Cebrián y col., 2013).

Debido a la regulación a la que están sujetos, los promotores de genes *HSP* se inactivan unas pocas horas después de la aplicación del estrés térmico, limitando así la duración de la actividad transgénica. Por otro lado, este tipo de promotores son

susceptibles de una activación fortuita a consecuencia de una elevación de la temperatura asociada a enfermedad, inflamación local, ejercicio extenuante o al efecto de determinados fármacos (Locke y col., 1995; Venkataseshan y Marquet, 1996; Salminen y col., 1997; Moseley, 1998; Shastry y col., 2002). Para atajar esta limitación nuestro grupo ha desarrollado circuitos génicos que permiten ampliar la ventana temporal de la expresión transgénica y que combinan un promotor *HSP70B* con un transactivador activable por un ligando de bajo peso molecular (Fig. 1) (Vilaboa y col., 2005). El transactivador se expresa bajo el control de un promotor híbrido que combina secuencias del promotor *HSP70B* y secuencias de reconocimiento del transactivador activado. Un estímulo térmico de suficiente intensidad dispara la expresión del transactivador quimérico regulado por el promotor híbrido. Tras su unión al ligando específico del sistema, el transactivador adquiere capacidad para activar el promotor que controla la expresión del transgén terapéutico mientras que también regula su propia expresión. Este sistema asegura que la expresión transgénica, una vez inducida, se mantenga en tanto en cuanto el ligando esté presente.



**Figura 1. Circuito de expresión génica activable por calor y dependiente de ligando de bajo peso molecular.** El circuito se compone de un transactivador controlado por un promotor híbrido que contiene secuencias del promotor *HSP70B* y de un promotor activable por el transactivador (*trp*, del inglés *transactivator-responsive promoter*). El ligando activa la capacidad transcripcional del transactivador, que incrementa la expresión del transgén de interés a través de la activación del promotor *trp*, así como la del propio transactivador. La flecha gruesa que señala hacia abajo representa la degradación del factor. eHSF1: HSF1 endógeno.

El diseño de este tipo de circuitos génicos asegura, asimismo, que la expresión transgénica no se induzca a menos que exista activación térmica en presencia del ligando, excluyendo la posibilidad de activación fortuita. Se han construido circuitos génicos que emplean transactivadores derivados de receptores de esteroides, que han demostrado ser capaces de regular la expresión del gen reportero luciferasa de luciérnaga (fLuc) (Vilaboa y col., 2005), así como de genes esenciales para la replicación de herpes virus (Bloom y col., 2015). Un segundo tipo de circuitos emplea

un factor de transcripción activable por el dimerizador rapamicina (RM) (Martín-Saavedra y col., 2013). La RM, cuyo uso en humanos está aprobado, sigue un modelo de distribución monocompartmental capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y en clínica destaca por su uso como inmunosupresor no esteroideo. En mamíferos la RM tiene como diana mTOR, miembro de la familia de las proteínas quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol-3-quinasa e implicada en la regulación de la proliferación, supervivencia y motilidad celular (Abraham, 1998). Un avance importante para la traslación clínica de los circuitos génicos dependientes de RM ha sido el desarrollo de rapálogos, análogos de RM que retienen la capacidad de heterodimerización del transactivador quimérico mientras que la actividad inmunosupresora se reduce en el orden de  $10^3$  (Indraccolo y col., 2006). Estudios de nuestro grupo indican que es posible controlar el patrón espaciotemporal de la expresión de distintos transgenes tras la irradiación con láser NIR de constructos implantados que incluyen HGNP y células que albergan el circuito dependiente de calor y activable por RM (Martín-Saavedra y col., 2014). Asimismo, este tipo de circuitos han demostrado ser capaces de responder a la hipertermia generada por ultrasonidos focalizados, induciendo expresión transgénica en constructos celulares que carecen de HGNP (Wilson y col., 2014).

### **3.4 Ingeniería de tejidos**

La ingeniería tisular es un campo de estudio interdisciplinario orientado hacia el desarrollo de sustitutos biológicos capaces de recuperar, mantener o mejorar las funciones de un tejido natural (Langer y Vacanti, 1993; Dvir y col., 2010). Una de las estrategias que se contemplan actualmente es la preparación *ex vivo* de intermediarios tisulares mediante la siembra de células en andamiajes o matrices de soporte cuya geometría depende del tejido a reemplazar. Estos sustratos deben facilitar la adhesión, migración y proliferación celular para que, una vez implantados, garanticen una integración exitosa en los tejidos del hospedador (Place y col., 2009). Para proporcionar la base para la supervivencia celular y crecimiento de tejido, las matrices celulares utilizadas en ingeniería tisular deben facilitar la vascularización (Shiek y col., 2018). Una de las características más deseables de las matrices utilizadas en ingeniería de tejidos es la biodegradabilidad, de modo que idealmente puedan ser reemplazadas completamente por el tejido regenerado. Las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas de los materiales biodegradables sufren cambios tras la implantación, siendo especialmente relevante que los productos resultantes de su degradación no sean tóxicos, se metabolicen fácilmente y se eliminen del organismo de manera eficiente (Song y col., 2018). En este sentido, en

los últimos años se han realizado importantes esfuerzos en el desarrollo de matrices porosas de naturaleza polimérica que cumplan los requerimientos indicados.

### 3.4.1 Matrices poliméricas

Los materiales poliméricos destacan por permitir el control de ciertas características claves para las matrices utilizadas en ingeniería tisular como son el tamaño de poro, el porcentaje de porosidad, la solubilidad y la biocompatibilidad (Ghassemi y col., 2018). En general, las matrices poliméricas pueden dividirse en dos categorías: sintéticas y naturales. Los polímeros naturales son biocompatibles, biodegradables, pueden regular el comportamiento celular, presentan escasa inmunogenicidad y su fabricación implica un bajo coste, si bien se caracterizan por un comportamiento mecánico limitado (Wubneh y col., 2018). Los polímeros naturales utilizados frecuentemente para generar matrices son el colágeno, componente mayoritario de la matriz extracelular de la que retiene muchas de sus propiedades (Goh y Holmes, 2017); el quitosano que presenta propiedades antimicrobianas y es fácilmente modificable (Muxika y col., 2017); el alginato, ampliamente utilizado por su biocompatibilidad; así como el ácido hialurónico, la fibroína de la seda o la fibrina. Las matrices generadas a partir de estos polímeros se han explorado en ingeniería de tejidos óseo y cartilaginoso (Cheng y col., 2018). Las matrices basadas en polímeros sintéticos cuentan con condiciones de producción muy controladas que permiten un cierto grado de modulación de sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas finales, y que redundan en la buena reproducibilidad de su síntesis (Song y col., 2018). Sin embargo, no siempre son biocompatibles y sus productos de degradación pueden ser tóxicos (Wubneh y col., 2018). Algunos ejemplos de este tipo de matrices poliméricas son aquellas basadas en ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona y sus copolímeros (Ghassemi y col., 2018).

La combinación de matrices poliméricas con diferentes tipos de NP otorga propiedades ventajosas a los andamiajes. Como se ha comentado, las propiedades mecánicas de las matrices juegan un papel importante en su papel *in vivo*, especialmente en aplicaciones de ingeniería tisular de hueso dado que estos implantes están sometidos a estrés mecánico incluyendo fuerzas de tensión, torsión y compresión (Little y col., 2011). Así, Zhang y colaboradores (2012) mejoraron las propiedades mecánicas de matrices de ácido poliláctico mediante la incorporación de nanodiamantes. Asimismo se ha explorado la incorporación de NP cargadas con fármacos y factores de crecimiento (FC) en matrices poliméricas con el fin de generar sistemas de liberación sostenida. Un ejemplo de este tipo es el trabajo de Zhang y

colaboradores (2017), que observaron regeneración ósea en un modelo de defecto óseo practicado en radio de conejo en los que se implantaron constructos celulares basados en ácido poli (láctico-co-glicólico) conteniendo NP de hidroxapatita en las que se encapsuló proteína morfogénica ósea (BMP-2, del inglés, *bone morphogenetic protein 2*). La inclusión de NP transductoras de energía NIR en matrices poliméricas dota al material de nuevas funciones que le habilitan como un dispositivo para la administración controlada de fármacos, FC y genes mediante su activación con una fuente de energía externa (Verma y col., 2011).

El fibrinógeno (FBG) es una glicoproteína de 340 kDa presente en el plasma humano a concentraciones que oscilan entre 1,5 y 4 g L<sup>-1</sup> y es esencial en la hemostasia, cicatrización, inflamación y angiogénesis. Es una macromolécula soluble compuesta por tres pares de cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro (Weisel y Litvinov, 2017). La trombina es una serín proteasa del plasma que se forma durante la cascada de coagulación tras una lesión vascular, a partir de la escisión proteolítica de la protrombina (Rowe y col., 2007). La trombina escinde los extremos C-terminal de las cadenas polipeptídicas del FBG, lo que da lugar a la formación del coágulo insoluble de fibrina (Ahmad y col., 2015) cuyo papel es clave en el proceso de coagulación. Con el fin de evitar la formación de trombos, los coágulos de fibrina serán posteriormente disueltos por el sistema fibrinolítico. La fibrinólisis es un proceso enzimático en el que una serie de activadores e inhibidores regulan la conversión de la proenzima circulante plasminógeno en la enzima plasmina que media la lisis de la fibrina (Collen y Lijnene, 1991). La adición de trombina a soluciones de FBG ricas en Ca<sup>2+</sup> permite preparar hidrogeles de fibrina que pueden ser conformados en una gran variedad de formatos como geles macroscópicos, películas, filamentos, microesferas o NP (Li y col., 2015). Este tipo de hidrogeles, que se han utilizado como selladores quirúrgicos durante más de un siglo, se investigan actualmente como biomaterial para la liberación controlada de fármacos con radios hidrodinámicos menores a los de los poros que conforman la matriz proteica (Ahmad y col., 2015; Vermonden y col., 2012). La fibrina también se ha utilizado como matriz polimérica natural en ingeniería tisular, gracias a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y a sus características físicas como porosidad, elasticidad, o capacidad de deformación (Ahmed y col., 2008). Por todo ello, las matrices de fibrina, solas o en combinación con otros materiales, han sido utilizadas como andamiajes de células troncales con el fin de regenerar, entre otros, hueso, músculo estriado, hígado, piel, cartílago, tendones y ligamentos (Weisel y col., 2017).

Los recombinámeros tipo elastina (ELR, del inglés *elastin-like recombinamers*) presentan una estructura basada en secuencias repetidas de los

dominios elastoméricos de la elastina, proteína de la matriz extracelular (Girotti y col., 2004). La secuencia básica consiste en repeticiones de la unidad (VPGXG) donde X es cualquier aminoácido natural a excepción de la prolina. Esta secuencia puede ser manipulada para modular las propiedades mecánicas del material así como para incluir diferentes secuencias bioactivas que promueven la adhesión celular (Rodríguez-Cabello y col., 2011). Este material biocompatible es capaz de retener la mayoría de las propiedades mecánicas de la elastina. Los ELR son solubles en agua a temperaturas inferiores a la de su temperatura de transición, mientras que a temperaturas superiores se autoensamblan en estructuras supramoleculares por interacciones hidrófobas, dando lugar a la formación de nano- y microagregados no solubles (González de Torre y col., 2013). Así, los ELR son capaces de formar hidrogeles estables con características mecánicas y estructurales controladas. Las matrices basadas en ELR pueden ser obtenidas de forma sencilla mediante reacciones químicas tipo *click*. Estas reacciones, introducidas por Kolb y colaboradores en 2001, implican una cicloadición de azidas y alquinos usando un catalizador de cobre a temperatura ambiente. Son reacciones estereoespecíficas, sencillas de realizar en solución acuosa y de gran rendimiento. Además, las modificaciones químicas necesarias para dar lugar a estas reacciones son compatibles con la mayoría de grupos funcionales presentes en las proteínas (González de Torre y col., 2013). Utilizando diferentes concentraciones y temperaturas, se han obtenido hidrogeles con diferentes propiedades con potencial aplicación como sistemas de administración de fármacos o matrices para ingeniería tisular (Testera y col., 2015). El hecho de que los ELR sean solubles en solución acuosa a temperaturas menores que la de transición, permite que puedan ser inyectados para formar geles *in situ* (Jiang y col., 2014). En los últimos años, se ha investigado el uso de estas matrices en la reparación de cartílago (Moss y col., 2011), tejido cardiovascular (de Torre y col., 2015) y en ingeniería del tejido ocular (Martínez-Osorio y col., 2009).

La criopolimerización es un método de procesamiento que aplica un tratamiento térmico criogénico sobre un sistema capaz de polimerizar, generando materiales con alta porosidad y elasticidad. Los criogeles son geles sintetizados a -20 °C mediante la polimerización de unidades monoméricas utilizando un agente reticulante. Durante el proceso, una parte del solvente se congela formando cristales de hielo, que actúan como porógenos, mientras que otra parte del solvente permanece en estado líquido siendo ésta la fracción donde se concentra la solución polimérica. En la fase líquida se suceden las reacciones químicas que conducen a la formación del criogel mientras que la posterior descongelación del agua genera poros en la estructura del criogel dando lugar a una red polimérica elástica de macroporos



altamente interconectados (Lozinsky y col., 2003; Strachota y col., 2017). A diferencia de otros procesos para el desarrollo de matrices poliméricas, la síntesis de criogeles es un proceso relativamente sencillo. Esta técnica se ha utilizado con distintos materiales poliméricos como N-isopropilacrilamida (Pérez y col., 2008) o quitosano (Kirsebom y col., 2007) para generar matrices porosas capaces de servir como andamiajes celulares. Los criogeles copolimerizados de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), polímero sintético no iónico y biocompatible (Choudhury y col., 2018), y ácido acrílico (AA), ionizable y de carácter hidrofílico (Cools y col., 2018), se han utilizado como andamiaje para el crecimiento de células troncales en ingeniería tisular ósea (Rodríguez-Lorenzo y col., 2012).

### 3.4.2 Control espaciotemporal de la liberación de FC

Los FC son polipéptidos secretados por diferentes tipos celulares que transmiten señales para regular funciones celulares como migración, diferenciación, proliferación, apoptosis o metabolismo celular. Se unen a receptores específicos de las células diana, iniciando una cascada de transducción que normalmente se inicia con una fosforilación del dominio citosólico del receptor (Koria, 2012). La regeneración de los tejidos dañados se puede potenciar mediante la liberación controlada de FC en la ventana espaciotemporal adecuada (Andreadis y Geer, 2006; Kobsa y Saltzman, 2008). Aproximaciones terapéuticas apoyadas en la administración de FC como p. ej., BMP-2 en la reparación de fracturas (Garrison y col., 2007) o VEGF (del inglés, *vascular endothelial growth factor*) en el tratamiento tópico para úlceras diabéticas (Hanft y col., 2008) han demostrado efectividad a nivel regenerativo. Sin embargo, una vida media limitada y la rápida degradación *in vivo* de los FC administrados constituyen importantes desventajas. Para resolver este problema se ha recurrido a la administración de altas dosis de FC, resultando en una relación subóptima del coste/beneficio de la terapia y en efectos secundarios contraproducentes. Ejemplos de este tipo son el exceso de la concentración de BMP-2 administrada, capaz de inducir la apoptosis en osteoblastos, células troncales y células del periostio (Hyzy y col., 2012), o de generar osificación heterotópica (Epstein, 2013); o bien concentraciones locales elevadas de VEGF que promueven la formación de vasos sanguíneos aberrantes con permeabilidad aumentada (Ozawa y col., 2004). Estos inconvenientes impulsan el desarrollo de sistemas de liberación que generen concentraciones fisiológicas de FC en el sitio de acción.

Las matrices poliméricas, además de servir como soporte físico a las células, pueden ser utilizadas como vehículos para liberar FC en la zona del tejido dañado (Zhang y Uludağ, 2009) a la vez que evitan su degradación prematura. Su

incorporación puede realizarse mediante uniones covalentes, electroestáticas o por simple adsorción. Tras la implantación de la matriz, los FC pueden liberarse por difusión pasiva y ocasionalmente mediante la degradación del biomaterial. Otras aproximaciones contemplan la inclusión de componentes en la matriz que la habilitan para responder con un cambio conformacional a condiciones locales del ambiente, como cambios de pH o temperatura, o bien a la presencia de enzimas, fármacos o iones, resultando en la liberación del FC cargado. Asimismo, se está explorando la aplicación externa de estímulos físicos como campos eléctricos, magnéticos, luz y ultrasonidos para promover la liberación deliberada de FC desde matrices poliméricas (Sood y col., 2016).

La terapia génica constituye una herramienta alternativa para modular la biodisponibilidad de FC. La administración de genes permite controlar la concentración, localización y el marco temporal de producción de estos factores (Evans, 2012). Se han desarrollado matrices para administrar genes que funcionan como un depósito de éstos mientras que se proporciona soporte estructural en la región anatómica tratada (Tierney y col., 2012). Un ejemplo de este tipo es la producción de hueso nuevo inducida en defecto óseos de calvaria de rata tratados con un andamiaje de gelatina cargado con adenovirus que expresan BMP-2 de manera constitutiva (Hu y col., 2016). Una aproximación alternativa consiste en la expansión *ex vivo* de células que se modifican genéticamente con vectores que codifican FC y posteriormente se siembran en matrices que se implantan en el tejido a reparar (Frohlich y col., 2008). En esta estrategia, las células troncales mesenquimales se revelan como receptores idóneos debido a la baja inmunogenicidad que ostentan junto a su destacado papel inmunomodulador y regulador mediado por su actividad autocrina y paracrina (Myers y col., 2010). Con el fin de regular el marco espaciotemporal de la expresión transgénica, nuestro grupo ha integrado en células troncales murinas C3H/10T1/2 el circuito génico activable por calor y dependiente de RM/rapálogo. Estas células se incluyeron en matrices de fibrina que se implantaron en ratones habiéndose empleado diferentes métodos para generar el aumento de temperatura necesario para activar la expresión transgénica, p. ej., mediante inmersión de la región implantada en baño de agua termostatzado (Martín-Saavedra y col., 2013) o, en una aproximación menos invasiva, irradiando con láser NIR matrices que incluían HGNP fototérmicas (Martín-Saavedra y col., 2014). Ambos tipos de metodologías para incrementar la temperatura del implante se han demostrado eficaces para inducir la expresión *in vivo* de VEGF transgénico (Martín-Saavedra y col., 2013, Martín-Saavedra y col., 2014).

## **OBJETIVOS**

---

En base a los antecedentes expuestos, los objetivos propuestos para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

1. Evaluar la capacidad de lipogeles de fibrina que contienen liposomas termosensibles y NP fototérmicas como sistemas de liberación controlada en respuesta a láser NIR.
2. Evaluar la capacidad de matrices poliméricas que contienen NP fototérmicas para controlar expresión transgénica inducida en respuesta a irradiación con láser NIR.
3. Evaluar el potencial como intermediario tisular de matrices poliméricas que contienen NP fototérmicas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 1. NIR-NP

Las NIR-NP ensayadas en este trabajo han sido generadas y caracterizadas por el Grupo de Superficies y Partículas Nanoestructuradas del Instituto de Nanociencia de Aragón (NFP-INA) en Zaragoza.

### 1.1 Preparación y caracterización de HGNP

Las HGNP se sintetizaron siguiendo el protocolo descrito previamente por Preciado-Flores y colaboradores (2011), con algunas modificaciones. Se dispusieron en un matraz de fondo redondo 800  $\mu$ L de cloruro de cobalto hexahidratado 0,4 M, 1,6  $\mu$ L de citrato de sodio dihidratado 0,1 M y 400 mL de agua Milli-Q. La solución se desgasificó mediante inyección de un flujo de argón durante 45 min. A esta solución se añadieron, bajo agitación empleando un agitador magnético, 4 mL de una solución de polivinilpirrolidona (PVP) (55 kDa) al 1 % y 900  $\mu$ L de borohidruro de sodio 0,1 M. La solución viró de rosa pálido a marrón oscuro en pocos segundos, indicando la formación de NP de cobalto. Con el fin de completar la hidrólisis del borohidruro de sodio, la dispersión de NP se mantuvo bajo agitación magnética e inyección de argón durante 15 min adicionales. Finalmente se añadieron bajo agitación magnética 100 mL de ácido cloroáurico 0,38 mM a 380 mL de la dispersión de NP para dar lugar a la formación de cloruro de cobalto y a la reducción del  $\text{Au}^{3+}$ . Esta dispersión se mantuvo en agitación durante 30 min para permitir el desplazamiento galvánico del cobalto por oro. El cambio de color en la dispersión de marrón a verde indicó la formación de HGNP. Tras la síntesis, las HGNP se lavaron con agua desionizada, centrifugando cada vez a 13000 x g durante 12 min, y se resuspendieron finalmente en agua Milli-Q. Todos los productos químicos empleados para la síntesis de HGNP fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE.UU.) y se utilizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Para determinar el contenido en oro de las HGNP se utilizó la técnica de espectrometría de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES), empleando un equipo 4100 MP-AES (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). Las HGNP se filtraron a través de un filtro de 0,25  $\mu$ m de poro y se suplementaron con 0,1 volúmenes de agua regia. La determinación se realizó a longitudes de onda de 268 y 243 nm con una posición de visualización de 0° y presión de nebulización de 120 kPa.

El espectro de absorción en la región del ultravioleta-visible-infrarrojo cercano (UV-Vis-NIR) de las HGNP en suspensión acuosa se determinó utilizando un espectrofotómetro modelo 8453 (Agilent Technologies Inc.).

## **1.2 Preparación y caracterización de CuSNP**

Las CuSNP se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Ortiz de Solórzano y colaboradores (2016), con algunas modificaciones. Se dispusieron en un matraz de fondo redondo 50 mL de agua Milli-Q, 480 mg de PVP (40 kDa) y 200  $\mu$ L de cloruro cúprico 0,5 M, y se mezclaron con 50 mL de hidróxido sódico 0,8 mM. Posteriormente, se añadieron 12,8  $\mu$ L de hidracina al 35 % bajo agitación magnética e incrementando la temperatura a 60 °C, con el fin de formar NP de óxido de Cu. Una vez alcanzada esta temperatura, se agregaron 400  $\mu$ L de sulfuro de sodio 1,33 M, dejándose reaccionar durante 2 h. Las CuSNP obtenidas se lavaron con agua desionizada, centrifugando a 3500 x g durante 15 min y se resuspendieron en agua Milli-Q. Posteriormente, las NP se liofilizaron utilizando un liofilizador modelo LyoQuest (Telstar S.L. Barcelona, España) y manteniéndose a -20 °C hasta su utilización. Todos los productos químicos empleados para la síntesis de CuSNP fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y se utilizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor.

La cantidad de metal que contienen las CuSNP se cuantificó utilizando un analizador termogravimétrico modelo Q5000IR (TA Instruments, New Castle, DE, EE.UU.).

El espectro de absorción en la región del UV-Vis-NIR de las CuSNP en suspensión se determinó utilizando un espectrofotómetro modelo 8453 de Agilent Technologies Inc.

## **2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS CARGADOS CON DOX**

Los liposomas utilizados en este trabajo han sido preparados y caracterizados en el Departamento de Farmacia del Instituto de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Utrecht, Holanda.

### **2.1 Síntesis y caracterización de LTSL**

Los fosfolípidos 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-poli (etilenglicol)-2000 (DSPE-PEG2000) se adquirieron en Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemania). El lípido monoestearilfosfatidilcolina (MSPC) se adquirió en Avanti Polar Inc. (Alabaster, AL, EE.UU.). El resto de reactivos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich.

Para preparar LTSL se disolvieron DPPC, MSPC y DSPE-PEG200 en cloroformo, empleando la razón molar 86:10:4. Para preparar LTS que contienen colesterol (LTSL-C) se disolvieron DPPC, MSPC, DSPE-PEG200 y colesterol en cloroformo, empleando la razón molar 81,7:9,5:3,8:5. Las películas lipídicas se formaron tras evaporar el solvente orgánico en un rotavapor en condiciones de vacío a

40 °C. Con el fin de eliminar el exceso de solvente, las películas se sometieron a una corriente de gas nitrógeno durante 1 h. Posteriormente, se llevó a cabo la hidratación de las películas lipídicas con un tampón de sulfato amónico 240 mM pH = 5,5 a 60 °C, hasta alcanzar una concentración lipídica de 25 mg mL<sup>-1</sup>. Los liposomas resultantes se sometieron a extrusión a 60 °C empleando membranas de policarbonato con tamaño de poro decreciente (650, 200 y 100 nm). A continuación se incorporó la DOX al interior de los liposomas LTSL y LTSL-C, dando lugar a los liposomas denominados LTSL-DOX y LTSL-C-DOX respectivamente. Se empleó una razón molar DOX:lípidos de 1:20 y se utilizó el método de gradiente de pH descrito por Fritze y colaboradores (2006), que promueve el aumento de la concentración de protones dentro de los liposomas. La disminución del pH del interior del liposoma mejora la solubilidad de DOX en su interior. La dispersión liposomal se sometió a tres ciclos de diálisis usando membranas con un umbral de retención de 10 kDa, empleando un volumen 500 veces superior de medio de diálisis HBS (del inglés HEPES *buffer solution*; HEPES 20 mM, cloruro sódico 150 mM pH = 7,4). Para incluir el fármaco en los liposomas se realizó una incubación a 37 °C durante 1 h. La DOX no incorporada se eliminó mediante filtración en resina Sephadex G-25. Los LTSL-DOX y los LTSL-C-DOX se resuspendieron en HBS y se almacenaron a 4 °C.

El tamaño final de los liposomas se determinó mediante la técnica de dispersión de luz dinámica utilizando un goniómetro Malvern 4700 (Malvern Panalytical Ltd. GmbH, Malvern, Reino Unido). La estabilidad térmica de los liposomas se determinó mediante un calorímetro diferencial de barrido dotado con un sensor de alta sensibilidad (Mettler-Toledo S.A.E, Barcelona, España). Se realizaron barridos en el rango de 20-50 °C con una rampa de calentamiento de 0,5 °C min<sup>-1</sup>, utilizando el tampón HBS como control.

## 2.2 Capacidad de encapsulación de LTSL y cinética de liberación de DOX

La DOX es una molécula con propiedades fluorescentes. En condiciones que favorecen la agregación, como sucede cuando la DOX es encapsulada en la fase acuosa de liposomas, la molécula se autoensambla formando dímeros y oligómeros de orden superior (Fülöp y col., 2013). La absorción de la DOX monomérica se localiza en la región del espectro electromagnético del azul-verde dando lugar a una emisión fluorescente con un máximo entorno a los 600 nm. La intensidad de este fenómeno se ve reducida en dímeros y oligómeros de DOX (Changenet-Barret y col., 2013). De este modo, las moléculas de DOX que se liberan al medio desde los liposomas ven incrementada su fluorescencia al disminuir su estado de agregación. Esta propiedad se ha empleado para cuantificar la eficacia de encapsulación y la cinética de liberación



del DOX contenido en formulaciones liposomales. La estimación del DOX liposomal se cuantificó mediante el tratamiento con Tritón X-100 al 2 % en tampón fosfato salino (PBS) pH = 7,4. La cuantificación de la fluorescencia se realizó en un espectrofluorímetro Synergy4 Multimode Plate Reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.) utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y cuantificando la fluorescencia emitida a 600 nm. Como referencia, se emplearon cantidades conocidas de DOX disueltas en medio de cultivo. La cinética de liberación de DOX a partir de LTSL-DOX se monitorizó mediante fluorimetría tras diluir la muestra en HBS pH = 7,4 e incubar en baño de agua termostatzado a 37-43 °C.

### **3. CULTIVOS CELULARES**

Las células multipotentes embrionarias de ratón C3H/10T1/2 (ATCC CCL-226) se cultivaron en medio comercial EMEM (*Eagle's minimum essential medium*; Lonza, Barcelona, España) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.) inactivado por tratamiento térmico a 56 °C durante 30 min (FBS), 1 % L-glutamina (Lonza), 5 UI mL<sup>-1</sup> de penicilina y 5 UI mL<sup>-1</sup> de estreptomicina (Lonza) (EMEM-FBS). La línea clonal C3H/10T1/2-fLuc derivada de C3H/10T1/2 (Martín-Saavedra y col., 2013), la línea de fibroblastos murinos NIH/3T3 (ATCC CRL-1658) y la línea celular de carcinoma cervical humano HeLa (ATCC No. CCL-2) se mantuvieron en medio comercial DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*, Lonza,) conteniendo 10 % de FBS, 5 UI mL<sup>-1</sup> de penicilina y 5 UI mL<sup>-1</sup> de estreptomicina (DMEM-FBS). En el caso de las células C3H/10T1/2-fLuc el medio se suplementó con 1200 µg mL<sup>-1</sup> de G418 y 600 µg mL<sup>-1</sup> de higromicina B (ambos de Invivogen, San Diego, CA, EE. UU.), como antibióticos de presión selectiva para la línea celular. Las células humanas endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVEC) disponibles comercialmente (Lonza), se expandieron en el medio definido EGM-2 (*endothelial cell growth medium*, Lonza). El medio EGM-2 consiste en medio EBM-2 (*endothelial cell basal medium*, Lonza) suplementado con SingleQuots® (Lonza), conteniendo: FBS al 2 %, hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos humanos, factor de crecimiento vasculoendotelial humano (VEGF), factor de crecimiento insulínico humano, ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico humano, gentamicina, anfotericina B y heparina. Todas las líneas celulares se incubaron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad relativa (37 °C/5 % CO<sub>2</sub>).

## 4. MATRICES POLIMÉRICAS

### 4.1 Matrices basadas en fibrina

#### 4.1.1 Preparación de hidrogeles de fibrina

Con el fin de generar hidrogeles basados en fibrina se disolvió FBG bovino (Sigma-Aldrich) a una concentración de  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  de proteína coagulable, en medio DMEM suplementando con  $5 \text{ UI mL}^{-1}$  de penicilina y  $5 \text{ UI mL}^{-1}$  de estreptomicina atemperado a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las HGNP o CuSNP se resuspendieron a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  en agua Milli-Q y posteriormente se sonicaron durante 10 min en un baño de ultrasonidos operando a 40 kHz y 80 W de potencia de salida (Bransonic 12, Branson Ultrasonidos S.A.E., Barcelona, España). A un volumen de la solución de FBG se le añadieron 0,2 volúmenes de HGNP o CuSNP diluidas en medio DMEM, para alcanzar una concentración final en la mezcla precursora del hidrogel de entre 0,01 y  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ . A continuación se añadieron 0,7 volúmenes de medio DMEM o de medio DMEM conteniendo células C3H/10T1/2-fLuc, C3H/10T1/2 o NIH/3T3 a una concentración de  $2,5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Finalmente, para catalizar la polimerización de fibrina se adicionaron 0,1 volúmenes de trombina bovina (Merck, Darmstadt, Alemania) disuelta a  $40 \text{ UI mL}^{-1}$  en medio DMEM. Mediante pipeteo, la suspensión se dispuso a razón de 0,25 mL por pocillo en placas de cultivo celular de 48 pocillos (Sigma-Aldrich) pretratados con 0,25 mL de FBS. Las suspensiones se dejaron polimerizar a  $37 \text{ }^\circ\text{C}/5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$  durante 30 min. A continuación se añadió 1 volumen de medio DMEM que contenía 20 % de FBS (DMEM-20 % FBS), y los hidrogeles se incubaron durante 1 h a  $37 \text{ }^\circ\text{C}/5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$ . Tras esta incubación, el medio DMEM-20 % FBS se reemplazó con el medio fresco específico para cada línea celular.

En aquellos experimentos en los que se cuantificó la degradación de la matriz de fibrina, durante la preparación del hidrogel se añadieron  $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de FBG humano conjugado con Alexa Flúor 546 (FBG-AF546; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La cuantificación del FBG-AF546 liberado desde el hidrogel al medio de cultivo se realizó mediante fluorimetría en un equipo Synergy4, utilizando una longitud de onda de excitación a 588 nm y de emisión a 573 nm.

En el caso de la preparación de hidrogeles conteniendo células HUVEC, se utilizó el protocolo descrito anteriormente con las siguientes modificaciones: el hidrogel se preparó empleando EBM-2 en lugar de medio DMEM, utilizando una concentración de FBG coagulable de  $6 \text{ mg mL}^{-1}$  y, tras ser conformados, los hidrogeles se incubaron en medio EGM-2.

#### **4.1.2 Preparación de lipogeles**

Para la preparación de lipogeles se generó una matriz de fibrina en la que se incluyeron HGNP o CuSNP y liposomas. Para ello, se disolvió FBG bovino en medio DMEM a una concentración de 40 mg mL<sup>-1</sup> de proteína coagulable. Las HGNP o CuSNP se resuspendieron a 1 mg mL<sup>-1</sup> en agua Milli-Q y se sonicaron como se describe en el apartado 4.1. Posteriormente se diluyeron en medio DMEM y se adicionaron 0,1 volúmenes de las suspensiones de HGNP o CuSNP a 1 volumen de la solución de FBG, para alcanzar una concentración final de la mezcla precursora de los lipogeles de entre 0,01 y 0,05 mg mL<sup>-1</sup>. A continuación, se añadieron 0,8 volúmenes de medio DMEM conteniendo LTSL-DOX o LTSL-C-DOX para alcanzar una concentración final de 0,05 mg mL<sup>-1</sup>. Finalmente, se agregaron 0,1 volúmenes de trombina bovina disuelta en medio DMEM a 40 UI mL<sup>-1</sup>. Todos los componentes del lipogel y sus mezclas se prepararon a 4 °C. Tras la homogeneización de los componentes mediante pipeteo, las mezclas se dispusieron en placas de cultivo multipocillo. Los lipogeles se conformaron en dos volúmenes diferentes: de 1 mL, polimerizados en placas de 12 pocillos, para los experimentos de irradiación NIR seriada; y de 0,25 mL, en placas de 48 pocillos, para el resto de experimentos. Antes de la dispensación de las mezclas precursoras de los lipogeles, los pocillos fueron pretratados con 1 volumen de FBS. Las suspensiones se dejaron polimerizar tal y como se describe en el apartado 4.1.1. Como paso previo a los tratamientos químicos, térmicos o electromagnéticos, los lipogeles se lavaron dos veces con 10 volúmenes de PBS, para después ser sumergidos en 40 volúmenes de PBS e incubados a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> durante 16 h. Para determinar la cantidad de DOX contenida en los lipogeles, éstos se sumergieron en 1 volumen de Tritón X-100 al 10 % en PBS y se incubaron a temperatura ambiente bajo agitación, en agitador orbital, a 300 rpm durante 24 h.

#### **4.1.3 Caracterización de la cinética de liberación de DOX a partir de hidrogeles de fibrina**

Con el fin de caracterizar la cinética de liberación de DOX desde hidrogeles de fibrina, estos se conformaron en un volumen de 0,25 mL conteniendo 0,06 mg mL<sup>-1</sup> de DOX. Los hidrogeles se incubaron con DMEM-FBS durante 2 h. Durante este periodo, se recogió la solución acuosa cada 10 min reemplazándose con un volumen idéntico de DMEM-FBS. La concentración de DOX en las soluciones acuosas se calculó por fluorimetría del modo descrito en el apartado 2.2, utilizando como referencia cantidades conocidas de DOX disueltas en medio de cultivo.

## 4.2 Recombinómeros de elastina

Los ELR utilizados en este trabajo han sido generados y caracterizados por el grupo Bioforge de la Universidad de Valladolid.

### 4.2.1 Síntesis y caracterización de los ELR

Para la producción de este polímero proteico recombinante, basado en los dominios elastoméricos de la proteína elastina humana, se siguió el procedimiento de Girotti y colaboradores (2004) que describe su diseño y biosíntesis. El gen que codifica el péptido monómero se obtuvo mediante la amplificación del DNA en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) utilizando cebadores sintéticos de una secuencia de DNA que codifica para un péptido con la secuencia: VG VPGVG VPGKG(VPGVG)<sub>5</sub> flanqueada por sitios de reconocimiento para la enzima de restricción de tipo IIs Eam1104I (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). El DNA amplificado se clonó en el vector pCR 2.1 que se sometió a digestión con Eam1104I para aislar la secuencia correspondiente al péptido monómero y someterla a reacción de ligación concatenada. La mezcla de concatémeros se clonó en el plásmido pDrive, seleccionándose los transformantes mediante cribado por PCR utilizando los cebadores T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) y SP6 (ATTTAGGTGACACTATAG). Los fragmentos incluyendo los concatémeros se subclonaron en el vector de expresión pET-25b (+) (Novagen, Madison, WI, EE.UU.). Los plásmidos recombinantes se transformaron en la cepa BLR(DE3) de *Escherichia coli* (Novagen). Con el fin de producir la proteína que codifica el concatémero, los transformantes fueron inoculados en medio Luria Bertani con los antibióticos de selección ampicilina 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y tetraciclina 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (ambos de Roche Diagnostics, Basel, Suiza) y cultivados en un oscilador orbital termostatzado a 37 °C y 250 rpm. Una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,8 cuantificada a 600 nm, se indujo la expresión del ELR adicionando isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido 1 mM (Apollo scientific, Bredbury, Reino Unido) e incubándose el cultivo durante 5 h más. Las células se recogieron mediante centrifugación a 5000 x g durante 10 min a 4 °C y se lavaron utilizando 100 mL de tampón salino TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM pH=8) por cada L de cultivo, centrifugándose a continuación en las mismas condiciones. El sedimento se resuspendió finalmente en TE (Tris-base 20 mM, EDTA 1 mM pH = 8) y se lisó mediante aplicación de ultrasonidos, con un aparato Sonicator 3000 de Misonix (Farmingdale, NY, EE.UU.), realizándose 6 ciclos de 3,5 min con pulsos de 2 segundos cada 5 segundos a unos 100 W de potencia y manteniendo la solución en hielo. A continuación se sometió el lisado a otro ciclo de centrifugación a 15000 x g durante 1 h a 4 °C para eliminar la fracción insoluble. La fracción soluble, que contiene el polímero

recombinante, se acidificó hasta pH = 3,5 y se precipitó para eliminar proteínas y restos bacterianos. Para terminar la purificación del ELR se hizo uso de la propiedad de transición inversa de temperatura de este material, sometiénolo a sucesivos ciclos de precipitación/disolución mediante incubaciones y centrifugaciones a temperatura superior (50 °C) o inferior (4 °C) a su temperatura de transición. El ELR obtenido se dializó con agua Milli-Q a 4 °C y posteriormente se liofilizó.

#### **4.2.2 Modificaciones químicas de los ELR**

Los grupos  $\epsilon$ -amina libres de los residuos de lisina de los ELR se modificaron químicamente para incorporar los grupos reactivos necesarios para catalizar reacciones químicas tipo *click* (Kolb y col., 2001).

#### **4.2.3 Síntesis de ELR con grupos $\epsilon$ -amino sustituidos por azidas**

Se llevó a cabo una reacción de sustitución usando trifluormetanosulfonilazida como agente nucleófilo. Para ello, se preparó una solución siguiendo el protocolo descrito por Lundquist y Pelletier (2001), disolviéndose 5,143 g de azida sódica en 14 mL de agua Milli-Q y añadiéndose 17,5 mL de cloruro de metileno. La mezcla de reacción, se enfrió en un baño de hielo y agua, y se suplementó añadiendo gota a gota una solución de anhídrido tríflico. La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 1 h a 0 °C y a continuación durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se lavó dos veces con agua Milli-Q y con una solución saturada de carbonato de sodio. La solución de azida formada se añadió gota a gota a una solución conteniendo 2 g de ELR, 1,188 moles de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 0,01 Eq de CuSO<sub>4</sub> en 24 mL de agua Milli-Q, manteniéndose la reacción a 0 °C. Posteriormente se adicionaron 4 mL de metanol y se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, el solvente orgánico se eliminó mediante destilación a presión reducida. El recombinámero se purificó mediante diálisis con agua Milli-Q a 4 °C y se liofilizó.

#### **4.2.4 ELR modificados con ciclooctinos**

Se añadieron un número de moles iguales a 0,6 multiplicado por el número de moles de lisina del ELR de una solución de (1R, 8S, 9S)-biciclo [6.1.0] non-4-yn-9-ilmetil succinimidil carbonato 0,12 mM en dimetilformamida (DMF) a una solución conteniendo  $8 \times 10^{-6}$  moles de ELR en 5 mL de DMF, a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 48 h y se añadieron 15 mL de éter etílico, lo que dio lugar a un precipitado blanco. Tras centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el sólido restante se lavó tres veces con acetona. A continuación, éste se secó a presión

reducida y se resuspendió en agua Milli-Q a 4 °C, para después ser dializado con agua Milli-Q y liofilizado, generándose un rendimiento químico del 75 % de ELR con el 60 % de los grupos  $\epsilon$ -amino sustituidos por ciclooctinos.

#### **4.2.5 Conformación de geles de ELR**

Los ELR con grupos  $\epsilon$ -amino sustituidos por azidas y los ELR modificados con ciclooctanos se disolvieron por separado en medio DMEM a una concentración de 100 mg mL<sup>-1</sup> mediante agitación a 4 °C durante 24 h. Se añadió 1 volumen de la solución de cada tipo de ELR en proporción 1:1 a medio DMEM conteniendo HGNP o CuSNP a una concentración de 0,03 o 0,1 mg mL<sup>-1</sup> y en su caso, células C3H/10T1/2-fLuc a concentración de 2,5 X 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>, en un volumen final de 0,25 mL. La mezcla se realizó a 4 °C y se pipeteó en placas de cultivo de 48 pocillos pretratadas con 1 volumen de FBS. La gelificación del material se realizó a temperatura ambiente, incubándose a continuación a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> durante 30 min. Tras la incubación se añadió 1 volumen de DMEM-20 % FBS, se incubó durante 4 h a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> y finalmente, se reemplazó el medio DMEM-20 % FBS con medio DMEM-FBS.

### **4.3 Criogeles**

Los criogeles utilizados en este trabajo han sido generados y caracterizados por el grupo de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Madrid.

#### **4.3.1 Síntesis de criogeles**

Como punto de partida para la síntesis del material se llevó a cabo una purificación de los monómeros HEMA y AA, siguiendo una serie de pasos de extracción y destilación en vacío con objeto de eliminar impurezas. Los monómeros se mezclaron en una proporción HEMA:AA de 10:1 en agua Milli-Q, alcanzándose una concentración de monómeros del 30 %. A la mezcla se añadieron HGNP en un rango de concentraciones entre 0,5 y 2 mg mL<sup>-1</sup>, 1 % de persulfato de sodio (Fluka, Gillingham, Reino Unido) como iniciador redox y 1 % de TEMED (Acros, Thermo Fisher Scientific, Geel, Bélgica) como activador de la reacción. La mezcla se agitó brevemente a temperatura ambiente y se introdujo en un molde cilíndrico de 7 mm de diámetro que se enfrió a -20 °C para proceder a la polimerización en frío del material, seguido de secado en frío. Finalmente, los copolímeros se tallaron en forma de discos de 1,5 mm de grosor y se almacenaron a temperatura ambiente.

### 4.3.2 Esterilización y siembra de criogeles

Para su esterilización los discos de criogeles se esterilizaron mediante irradiación con luz UVA en una campana de flujo laminar, durante 1,5 h por cada una de sus caras. A continuación, se hidrató el material sumergiéndolo en 4 mL de DMEM-FBS y se incubó a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> durante 16 h. El porcentaje de agua captada por los criogeles se calculó como la relación entre el contenido en agua del copolímero hidratado y el peso del copolímero, utilizando la siguiente fórmula; % Hinchamiento =  $Wt-Wd/Wd \times 100$  donde Wt es el peso del criogel hidratado y Wd es el peso del criogel en seco.

Para realizar la siembra celular en la superficie del material, los criogeles hidratados se colocaron en una placa de 48 pocillos, añadiéndose a la superficie del material 100 µL de DMEM-FBS conteniendo  $5 \times 10^6$  células C3H/10T1/2-κLuc mL<sup>-1</sup>. Las células se incubaron a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> durante 1 h y a continuación se añadieron 900 µL de medio DMEM-FBS a cada pocillo, prolongándose la incubación durante 24 h más. Posteriormente, los criogeles se transfirieron a pocillos de placas de 24 pocillos y se incubaron con 2 mL de medio.

## 5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El estudio morfológico de las CuSNP se realizó utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscopy*). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Tecnai T20 (FEI Company, Hillsboro, OR, EE.UU.) en modo de campo claro y operando a 200 keV.

La encapsulación de DOX en los LTSL se corroboró mediante técnicas de imagen utilizando criomicroscopía electrónica (Criotem). Se utilizaron para ellos dos técnicas diferentes. Por un lado se dispuso una fina membrana de muestra en una rejilla de Cu microperforada y se congeló en etano líquido. Con el fin de tomar imágenes, la muestra se dispuso en una cámara previamente enfriada con nitrógeno líquido acoplada a un microscopio Tecnai T12 (FEI Company). Por otro lado los LTSL-DOX se filtraron empleando una membrana de polietilensulfona con diámetro de poro de 0,22 µm. Una fina película de la preparación liposomal se colocó en una rejilla de Cu revestida de carbono con una trama de 400 y se fijó con glutaraldehído al 2,5 %. Se añadió acetato de uranilo al 2 % como agente de contraste y finalmente, la película se embebió en metilcelulosa al 0,13 %. Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico JEM 1010 (JEOL, Peabody, MA, EE.UU.). El mismo equipo de microscopía se utilizó para caracterizar hidrogeles de fibrina y lipogeles conteniendo NIR-NP, que se prepararon como se describe en los apartados 4.1.1 y 4.1.2, respectivamente, diluyéndose 10 veces en PBS. Una gota de esta disolución se dejó polimerizar en la rejilla durante 5 min a 37 °C, tomándose a continuación las imágenes.

La morfología interna de los hidrogeles se observó utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *scanning electron microscopy*) empleando un equipo Inspect F50 (FEI Company). Para ello, los hidrogeles se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS durante 40 min y se cortaron en secciones transversales empleando un bisturí. Las muestras se liofilizaron y recubrieron con platino antes de adquirir la imagen empleando rangos de energía entre 10-15 KeV.

## **6. ESPECTOMETRIA DE EMISIÓN ATÓMICA Y ESPECTOMETRIA DE ABSORCIÓN**

La concentración de Cu iónico en el medio condicionado por hidrogeles que contienen CuSNP se determinó mediante MP-AES, empleando un equipo 4100 MP-AES. El medio condicionado se filtró a través de un filtro de 0,25  $\mu\text{m}$  de poro y se suplementó con 0,1 volúmenes de agua regia. Las determinaciones se realizaron a longitudes de onda de 324, 327 y 510 nm. Se utilizó una posición de visualización de  $0^\circ$  y una presión de nebulización de 240 kPa.

El espectro de absorción en la región del UV-Vis-NIR de los hidrogeles se obtuvo utilizando un espectrofotómetro modelo 8453 de Agilent Technologies Inc.

## **7. REOLOGÍA**

El comportamiento viscoelástico de los hidrogeles se estudió empleando un reómetro de esfuerzo y deformación controlada (TA ARG2, TA Instruments), utilizando una geometría de platos paralelos de 20 mm de diámetro. Se realizaron medidas de cizallamiento oscilatorio determinándose los valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y del módulo de pérdidas ( $G''$ ). La zona de comportamiento viscoelástico lineal se determinó tras realizar un barrido de torsión entre 0,1 y 10  $\mu\text{N m}$  a 37  $^\circ\text{C}$ , con una frecuencia oscilatoria de 1 Hz. Además, se realizó un barrido de temperatura entre 5 y 70  $^\circ\text{C}$ , con una rampa de calentamiento de 5  $^\circ\text{C min}^{-1}$ , una frecuencia oscilatoria de 1 Hz y una tensión oscilatoria del 0,5 %.

## **8. MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO LÁSER**

En virtud de la fluorescencia que emite, la DOX encapsulada en LTSL incluidos en lipogeles basados en fibrina, se identificó, mediante microscopía confocal empleando un equipo Leica TCS-SP5 AOBS (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Los lipogeles se excitaron con un láser de argón a 488 nm y la emisión se recogió entre 490 y 580 nm. Se tomaron imágenes de 3872 x 1456 pixeles correspondientes a áreas



de 11,72 x 4,41 mm cubriendo una profundidad de 500  $\mu\text{m}$  y distribuidas en 10 secciones del eje Z, con un objetivo seco de 10 X y apertura numérica de 0,5.

Para visualizar la distribución de las poblaciones celulares en las matrices poliméricas, los constructos se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4 % en PBS durante 40 min. Posteriormente, se trataron con Tritón X-100 al 0,1 % en PBS durante 15 min con el fin de permeabilizar las membranas celulares. Para visualizar los filamentos de actina, las matrices poliméricas se incubaron con 0,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de faloidina-TRITC (Merck) en PBS durante 40 min. Tras dos lavados con PBS, y con el fin de visualizar el núcleo celular, las muestras se incubaron con 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Hoechst 33342 (Merck) en PBS durante 10 min. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras lavar las matrices con PBS, se tomaron imágenes utilizando un microscopio confocal Leica TCS SPE (Leica Microsystems). Para visualizar los filamentos de actina, las muestras se excitaron con la línea de láser de 532 nm y la señal de fluorescencia se recogió en el rango de 560 a 621 nm. Para observar el núcleo celular la muestra se excitó a 405 nm y se recogió la señal en el rango de 428 a 506 nm. Se adquirieron imágenes de 733,33 x 733,33  $\mu\text{m}$  distribuidas en 10 secciones a lo largo del eje Z, cubriendo una profundidad de 250  $\mu\text{m}$ , con un objetivo seco de 10 X y apertura numérica de 0,3. Para obtener imágenes del interior de las matrices, se realizaron secciones transversales utilizando un bisturí. Las imágenes se analizaron utilizando el programa informático Leica LAS AF (versión 2.6.0 Build 7266).

## **9. VIABILIDAD CELULAR**

La viabilidad de las poblaciones celulares incluidas en matrices poliméricas así como la de las células sembradas en plástico, se determinó utilizando el reactivo comercial alamarBlue (Biosource, Nivelles, Bélgica), que incorpora el indicador de óxido-reducción resazurina que en respuesta a la actividad metabólica celular se reduce al compuesto fluorescente resorufina. Tras lavado con PBS las muestras se incubaron a 37 °C/5 %  $\text{CO}_2$  en su medio de cultivo específico conteniendo 10 % de alamarBlue, durante 3-4 h. Se recolectó el medio de cultivo y tras excitar a 530 nm, se cuantificó la señal de fluorescencia emitida a 590 nm usando un espectrofluorímetro Synergy4.

## **10. ENSAYO DE ACTIVIDAD PLASMINA**

El ensayo de actividad plasmina se basa en la capacidad de esta enzima para catalizar la proteólisis del sustrato sintético dihidrocloruro de D-valil-leucil-lisil 4-nitroanilina (Merck) liberando 4-nitroanilina, compuesto detectable por técnicas de colorimetría. Se diluyeron 10  $\mu\text{L}$  del medio condicionado por hidrogeles que albergan

células C3H/10T1/2 en tampón Tris-HCl 50 mM pH = 7,4 en proporción 1:3,5 incubando a continuación durante 10 min a 37 °C. A continuación, se añadieron 15 µg del sustrato de plasmina diluidos en 30 µL de tampón Tris-HCl 50 mM y se incubó durante 4 h a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético a una concentración final del 5,7 %. La absorbancia a 405 nm de las muestras se determinó en un espectrofluorímetro Synergy4.

## 11. IRRADIACIÓN NIR Y TERMOGRAFÍAS

Las irradiaciones con láser NIR se llevaron a cabo utilizando un sistema compuesto por un diodo láser emitiendo a una longitud de onda de 808 nm, acoplado a una fibra óptica de 400 µm de diámetro Optilas MDL-III-808-2W (New Industries Optoelectronics Technology Co., Ltd., Changchun, China) conectado a un colimador de foco fijo (f 11,07 mm, apertura numérica de 0,26; Thorlabs, Newton, NJ, EE.UU.) y a un sensor fotodiodo de silicio Modelo PD300-3W que se utiliza en combinación con un potenciómetro modelo NOVA II (ambos de Ophir Laser Measurement Group, Logan, UT, EE.UU.) para cuantificar la energía depositada por unidad de superficie desde el colimador. La fibra óptica se encuentra acoplada a un sistema de microposicionamiento que durante los ensayos *in vitro* se coloca en el interior de una cámara termostatazada (Modelo Stuart SI60D, Fisher Scientific Afora, Barcelona, España) con el fin de mantener la temperatura ambiental a 37 °C. Para determinar las dimensiones del punto de irradiación láser a una distancia conocida desde la superficie del colimador se utilizó una tarjeta fotosensible VRC4 (Thorlabs).

Las suspensiones acuosas de HGNP o CuSNP se diluyeron en DMEM-FBS a distintas concentraciones, en un volumen final de 1 mL y se dispusieron para la irradiación en cubetas de polimetilmetacrilato (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). A continuación, se aplicó energía NIR con potencia de 44 mW mm<sup>-2</sup> durante 5 min, registrando la temperatura alcanzada cada 60 s. Los lipogeles con volúmenes de 0,25 o 1 mL se irradiaron sumergidos en 1 volumen de medio de cultivo, en placas de 48 o 12 pocillos, respectivamente, empleando potencias NIR de 33 y 44 mW mm<sup>-2</sup> durante 5 o 10 min. Las matrices poliméricas conteniendo NIR-NP se colocaron en placas de 48 pocillos, sumergidas en 0,5 mL de DMEM-FBS y se irradiaron durante 10 min a 44 mW mm<sup>-2</sup>. En los experimentos de inducción *in vitro* de la expresión transgénica en células C3H/10T1/2-fLuc contenidas en matrices poliméricas, se adicionó al medio de cultivo RM a concentración de 10 nM 75 min antes de la irradiación NIR. La RM se preparó a partir de un stock a 5,47 µM en N,N-dimetilacetamida (DMA) (Merck). La irradiación NIR se realizó empleando una potencia de 44 mW mm<sup>-2</sup> durante 10 min. Para los experimentos de inducción *in vitro* de la expresión transgénica en células

C3H/10T1/2-fLuc sembradas en criogel se utilizaron potencias de irradiación entre 17 y 44 mW mm<sup>-2</sup> en función de la concentración de HGNP presente en el material. Se utilizó una cámara de imagen térmica Testo 872-2i (Instrumentos Testo S.A, Madrid, España) para determinar mediante termografía infrarroja los cambios de temperatura en la superficie de cubetas, lipogel o matrices poliméricas. A partir de las termografías obtenidas, se calculó la temperatura máxima alcanzada en cada región de interés ROIs (del inglés *region of interest*) utilizando el programa informático IRSoft versión 3.1 y se calcularon los incrementos máximos de este parámetro.

## **12. EXPERIMENTOS EN ANIMALES**

Todos los procedimientos realizados con animales han sido aprobados por el Comité de Bienestar Animal del Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPaz) en cumplimiento de la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE para experimentación animal. Como indicadores de bienestar animal se utilizaron parámetros físicos como la presencia de lesiones visibles, parámetros fisiológicos a través de la monitorización de los cambios de peso de los animales durante los experimentos y parámetros comportamentales, con el fin de evaluar la severidad de los procedimientos de experimentación aplicados. Se utilizaron ratones de 4-8 semanas de la cepa C3H/HeN (Janvier-Labs, Le Genest-Saint-Isle, Francia).

En todos los casos, y con el fin de preparar la región de implantación, se eliminó el pelo mediante afeitado con rasuradora mecánica y tratamiento con crema depilatoria. Los animales se anestesiaron con isoflurano (Baxter, Deerfield, IL, EE.UU.) al 5 % y al 2 % para la inducción y el mantenimiento, respectivamente. Para preparar los implantes de fibrina, sus componentes se mezclaron como se describe en el apartado 4.1.1 para obtener un volumen final de 0,5 mL de hidrogel. Para implantes incluyendo células C3H/10T1/2-fLuc, éstas se incorporaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. Las suspensiones de hidrogeles se inyectaron en el espacio subcutáneo de la región dorsal posterior de los animales utilizando una aguja de 23 Gs. Los animales se mantuvieron inmóviles bajo una lámpara incandescente durante 5 min para facilitar la polimerización *in situ* de los hidrogeles, y se colocaron después en una jaula de recuperación. En los experimentos en que se monitorizó el calentamiento de los hidrogeles tras irradiación NIR al cabo de 1, 8 y 29 días post-implantación, los hidrogeles se suplementaron con 0,15 U mL<sup>-1</sup> de aprotinina (Merck) con el objetivo de retrasar la degradación *in vivo* de la fibrina. Los implantes de ELR se generaron en un volumen de 0,5 mL y se inyectaron del mismo modo que los hidrogeles de fibrina. Los criogel hidratados en DMEM-FBS con un diámetro de 0,8 cm se implantaron subcutáneamente en dos localizaciones de la región dorsal posterior de los ratones, a

ambos lados de la línea media tras practicar incisiones de 5-6 mm con bisturí que se suturaron con sutura reabsorbible Vicryl® 6-0 (Ethicon Inc. Somerville, NJ, EE.UU.) tras la introducción del material.

Las irradiaciones NIR se realizaron 24 h después de la implantación. En los ensayos de inducción de la expresión transgénica, 24 h tras la implantación se administró RM a una dosis de 1 mg kg<sup>-1</sup>. El inyectable se preparó disolviendo la RM en DMA a 5 mg mL<sup>-1</sup> y posteriormente diluyéndola en una mezcla compuesta por DMA al 50 %, polioxietilenglicol (400 Da) al 45 % y monooleato de polioxietilensorbitano al 5 % (todos de Merck). La RM se administró a los animales mediante inyección intraperitoneal en un volumen de 100 µL. Al cabo de 90 min, la zona implantada se irradió con láser NIR utilizando una potencia de 17 mW mm<sup>-2</sup>. Los cambios de temperatura de la superficie implantada se monitorizaron mediante termografía tal y como se describió en el apartado 11.

### 13. HISTOLOGÍA

Tras ser ensayadas *in vitro*, las muestras basadas en hidrogeles de fibrina se fijaron en formalina durante 24 h para posteriormente ser deshidratadas en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100 %), tratadas con xileno y finalmente embebidas en bloques de parafina. Dichos bloques se cortaron en secciones de 5 µm con micrótopo rotatorio (Leica RM2255, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania). Por último, se eliminó la parafina de las muestras con xileno, se rehidrataron en soluciones de concentración decreciente de etanol y se tiñeron con tricrómico de Masson (Merck). Las imágenes de las secciones se obtuvieron empleando un microscopio óptico (Olympus BX41, Olympus Corporation, Tokio, Japón).

En cuanto al procesamiento de muestras procedentes de experimentos de implantación, los animales se sacrificaron y se extrajeron quirúrgicamente los implantes junto con los tejidos circundantes. Además se extrajeron hígado, riñón, corazón y bazo. Las muestras se trataron como se ha indicado para obtener bloques de parafina. En este caso, las muestras provenientes de órganos internos se tiñeron utilizando hematoxilina y eosina mientras que se utilizó la tinción de tricrómico de Masson para las muestras obtenidas de la región de implantación.

La vascularización relativa se calculó como el área de tejido ocupado por vasos sanguíneos en la región de implantación del hidrogel, utilizándose 6 secciones histológicas procedentes de regiones independientes de la región de implantación

#### **14. CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD DEL GEN TESTIGO**

Para los ensayos de bioluminiscencia *in vitro*, se añadió D-luciferina (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España) al medio de cultivo de los constructos celulares a concentración final de 80 µg mL<sup>-1</sup>, incubando a continuación a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> durante 15 min. Los ensayos de bioluminiscencia *in vivo* se realizaron anestesiando a los animales como se ha indicado en el apartado 12. A continuación, en la proximidad de la región de implantación se inyectaron 50 µL de una solución de D-luciferina diluida a 40 mg mL<sup>-1</sup> en PBS. La señal de luminiscencia se adquirió con un equipo de imagen óptica IVIS-Lumina II (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.). Los datos se analizaron utilizando el programa Living Image 4.0 (PerkinElmer). La cuantificación de la fluorescencia se realizó acotando los constructos o las zonas de implantación mediante ROIs.

#### **15. CITOMETRÍA DE FLUJO**

Las células C3H/10T1/2 incluidas en hidrogeles de fibrina se recolectaron mediante tratamiento con una solución de tripsina-EDTA (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) durante 1 h a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> y posterior centrifugación a 3000 g durante 5 min. Las células recolectadas se incubaron con Anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC) y 7-aminoactinomicina D (7-AAD), siguiendo las instrucciones del fabricante (Immunostep, Salamanca, España). El análisis de las muestras se realizó mediante citometría de flujo utilizando un equipo FACSCalibur y los datos se procesaron con el programa CellQuestPro (ambos de BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.).

#### **16. ESTUDIO DE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA**

Las células C3H/10T1/2 atrapadas en hidrogeles de fibrina se recolectaron tal como se describe en el apartado 15. El RNA total se purificó utilizando el kit RNeasy<sup>®</sup> Mini (Quiagen, Hilden, Alemania) y se procesó utilizando el kit GeneChip<sup>®</sup> WT PLUS Reagent, con el fin de generar dianas de DNA amplificadas y biotiniladas que se hibridaron con la matriz GeneChip<sup>®</sup> Mouse Gene 2.0 ST. Para escanear la matriz se utilizó un escáner GeneChip 3000 7G (ambos productos de Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.) Los datos se normalizaron y los niveles de genes se analizaron utilizando el algoritmo *Robust Multi-array Average* (Affymetrix Expression Console Software). Los cambios en la expresión génica entre condiciones experimentales se calcularon como la razón de las medias de las señales de expresión obtenidas para cada gen. Los genes con incrementos de expresión mayor o igual a 1,5 veces en hidrogeles conteniendo CuSNP se consideraron para los análisis posteriores. Los análisis

funcionales se realizaron usando la base de datos DAVID, (del inglés *database for annotation, visualization and integrated discovery*; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (Huang da y col., 2009).

Las conclusiones que se obtuvieron a partir de los experimentos con *microarrays* se corroboraron realizando ensayos de retrotranscripción acoplada a PCR cuantitativa (qPCR) de un número representativo de genes. Para ello, a partir del RNA total se generó DNA codificante utilizando el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis y cebadores oligo-dT* (Roche applied Science, Basilea, Suiza). Se llevaron a cabo qPCRs utilizando el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I y el termociclador LightCycler 2.0 (ambos de Roche Applied Science). Para ello se diseñaron los cebadores específicos indicados en la Tabla 1.

Símbolo del gen	Sentido (5´-3´)	Antisentido (5´-3´)
<i>Ccl5</i>	TGCTGCTTTGCCTACCTCTC	TCTTCTCTGGGTTGGCACAC
<i>Mmp3</i>	TGCTGGTATGGAGCTTCTGC	CTGTCATCTCCAACCCGAGG
<i>Mmp13</i>	TGACTATGCGTGGCTGGAAC	CAGATGGACCCCATGTTTGC
<i>Adam8</i>	AACAAGCAGCGTCTACGAGC	CCTCCTCTGGATTTGTCTCGG
<i>Xdh</i>	TATCTACAAGCACCTCGCAGC	GAAGTGTTGTTTCAGGGTCTGC
<i>Thbs2</i>	TGTGGACATTGACGGAGACG	TGGGTTGTGCATCAGAGGAC
<i>Gapdh</i>	CGTGCCGCCTGGAGAAACC	TGGAAGAGTGGGAGTTGCT

Tabla 1. Secuencias de los cebadores específicos utilizados para los ensayos de qPCR.

El ciclo umbral (CT, del inglés *cycle threshold*) se determinó utilizando el programa LightCycler 4.05 (Roche Life Science). Los cambios relativos en la expresión de genes se determinaron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Como normalizador se utilizó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*Gapdh*).

## 17. ZIMOGRAFÍAS

Para la realización de las zimografías, se copolimerizaron geles de SDS-poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories Inc.Hercules, CA, EE.UU.) al 7,5 % con 1 mg mL<sup>-1</sup> de gelatina de piel bovina (Sigma-Aldrich). Se ensayaron medios condicionados de constructos celulares. Las muestras se sometieron a electroforesis en condiciones no reductoras durante 2,5 h a 120 V en frío. A continuación se realizaron cuatro lavados de los geles a 4 °C en agitación; dos de 20 min con tampón Tris-HCl 50 mM pH = 7,4 conteniendo Tritón X-100 al 2,5 % y otros dos de 10 min con tampón Tris-HCl 50 mM pH = 7,4. A

continuación, los geles se incubaron en una estufa a 37 °C durante 40 h con tampón Tris-HCl 50 mM pH = 7,4 conteniendo cloruro cálcico 10 mM, cloruro sódico 100 mM, Tritón X-100 al 0,1 % y azida sódica al 0,02 %. Tras la incubación, los geles se tiñeron durante 1 h con azul Coomassie G-250 (Merck) al 0,1 % en una solución compuesta por metanol al 45 % y ácido acético al 10 %. Los geles se destiñeron con metanol al 20 % y ácido acético al 7,5 % para finalmente ser visualizados utilizando un escáner UVITEC Alliance 9.7 (Cleaver Scientific, Warwickshire, Reino Unido). La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó utilizando el programa de imagen Fiji (Schindelin y col., 2012).

## **18. ESTADÍSTICA**

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00 (La Jolla, CA, EE.UU.). Las diferencias entre grupos se estudiaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de comparación múltiple de Dunnett. Los análisis estadísticos de las diferencias en expresión génica detectada mediante estudios con *microarrays* se realizaron utilizando el programa limma (Ritchie y col., 2015). Valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

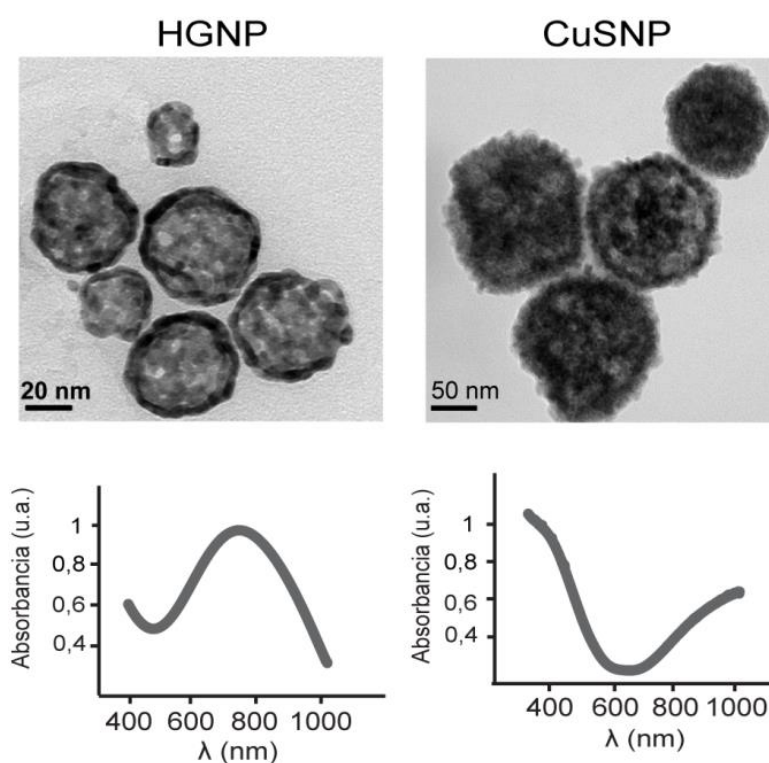
## **RESULTADOS**

---



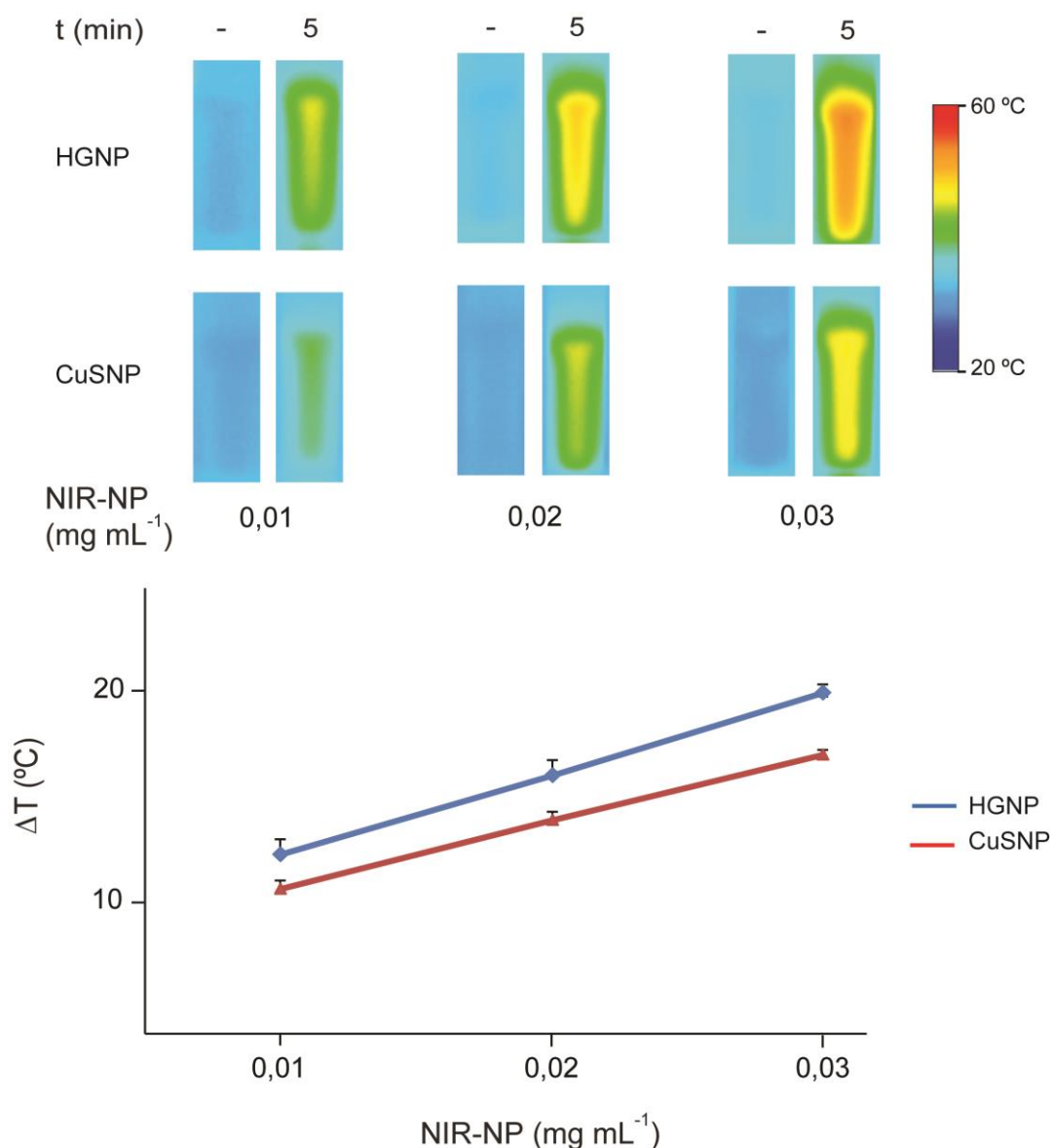
## 1. CARACTERIZACIÓN DE NIR-NP

Las imágenes tomadas mediante TEM indican que las HGNP presentan un diámetro promedio de  $44 \pm 9$  nm, con una cubierta de oro de unos 8 nm e interior hueco mientras que las CuSNP son partículas macizas con geometría esférica y un diámetro promedio de  $193 \pm 24$  nm (Fig. 2). Los espectros de absorción UV-Vis-NIR de suspensiones de HGNP en agua desionizada mostraron un pico centrado aproximadamente a 810 nm mientras que las suspensiones de CuSNP presentaron un mínimo en el espectro visible a 600 nm, incrementando progresivamente a lo largo de la región NIR (Fig. 2).



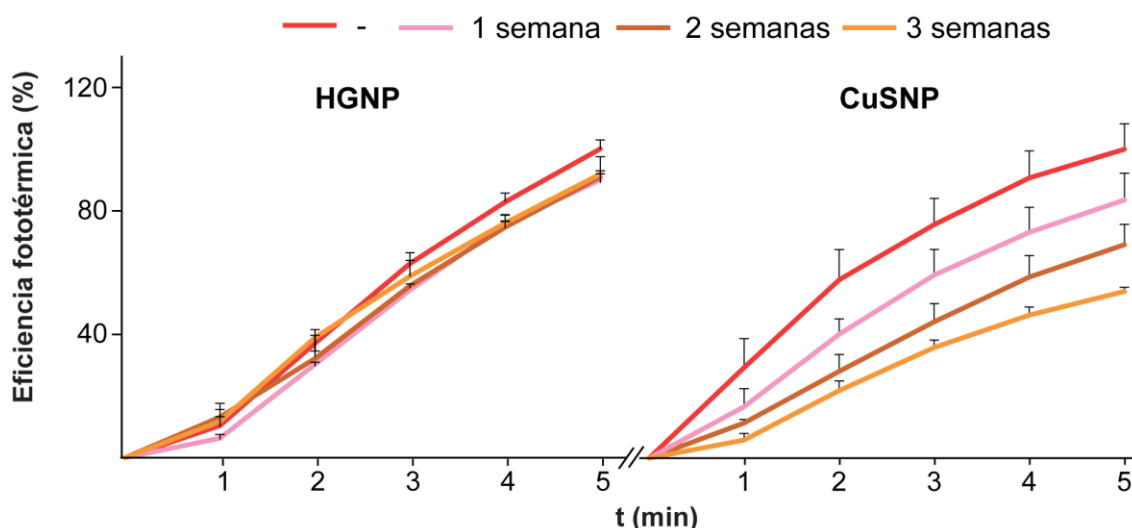
**Figura 2. Caracterización de NIR-NP.** Panel superior: morfología de las HGNP y las CuSNP determinada mediante TEM. Panel inferior: espectro de absorción UV-Vis-NIR de las NIR-NP.

Las HGNP presentan un contenido en oro del  $59,02 \pm 0,43$  %, mientras que el contenido metálico de las CuSNP es del  $83,80 \pm 1,14$  %. Se llevó a cabo un estudio comparativo de las eficiencias fototérmicas de suspensiones acuosas de los dos tipos de NIR-NP observándose que la eficiencia de las HGNP como nanotransductores de energía NIR es, en promedio, un 14 % más elevada que la de las CuSNP (Fig. 3).



**Figura 3. Eficiencia fototérmica de las NIR-NP.** Las suspensiones acuosas conteniendo las concentraciones indicadas de HGNP o CuSNP se irradiaron con láser NIR empleando una densidad de potencia de  $44 \text{ mW mm}^{-2}$ . Termografías tomadas inmediatamente antes de la irradiación (-) o tras 5 min. La gráfica muestra los valores promedio + DE de los incrementos de la temperatura máxima tras 5 min de irradiación.

A continuación se evaluó la estabilidad de la actividad fototérmica de suspensiones acuosas de los dos tipos de NIR-NP, que se irradiaron con láser NIR de forma inmediata a su preparación o tras ser almacenadas a  $4 \text{ °C}$  durante 1, 2 y 3 semanas (Fig. 4). Las termografías tomadas durante la irradiación indicaron que la capacidad fototérmica de las suspensiones de HGNP no sufre cambios significativos durante el periodo de almacenamiento explorado, mientras que la de las CuSNP disminuye progresivamente hasta reducirse al 50 % transcurridas 3 semanas.



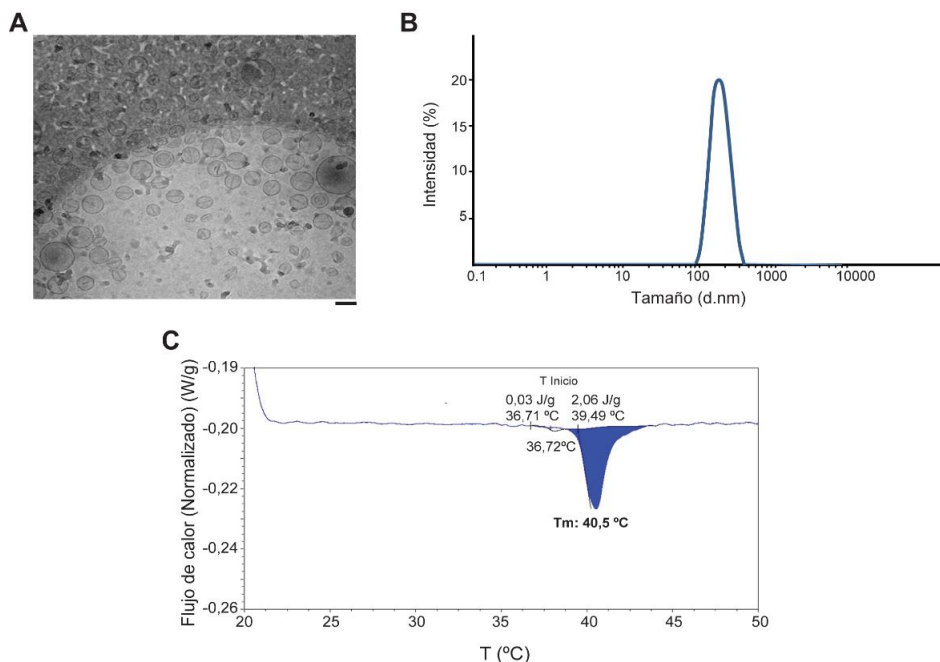
**Figura 4. Estabilidad de la eficiencia fototérmica de suspensiones acuosas de NIR-NP almacenadas a 4 °C.** Suspensiones acuosas de HGNP a 0,03 mg mL<sup>-1</sup> o de CuSNP a 0,1 mg mL<sup>-1</sup> recién preparadas (-) o almacenadas a 4 °C durante 1-3 semanas se irradiaron con láser NIR durante el tiempo indicado, empleando una densidad de potencia de 44 mW mm<sup>-2</sup>. Se muestran los valores promedio + DE relativos al incremento de la temperatura máxima en muestras (-) irradiadas durante 5 min, a los que se asignó un valor arbitrario de 100.

## 2. LIPOGELES

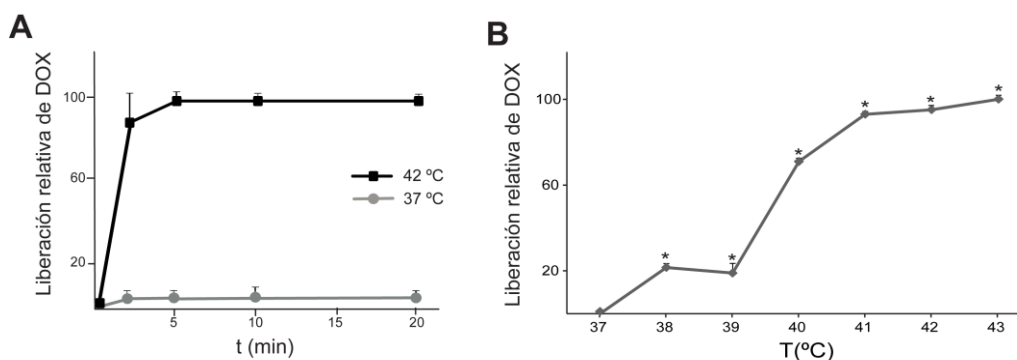
### 2.1 Caracterización de LTSL-DOX

Los LTSL-DOX se observaron mediante CRIOTEM (Fig. 5A). La DOX internalizada se organizó como un conjunto de fibras lineales, circulares y curvas dando lugar a un cambio de forma del liposoma cargado con la droga que recuerda a la de un grano de café, mientras que las membranas lipídicas no se ven significativamente alteradas. El análisis por dispersión dinámica de luz de las muestras de LTSL-DOX determinó un tamaño medio de liposoma de 159 nm y un índice de polidispersión de 0,073 (Fig. 5B). Por otra parte, el análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) evidenció dos transiciones de fase, una a 36,7 °C y otra a 40,5 °C que corresponde a una transición de fase endotérmica (Fig. 5C).

A continuación se estudió el efecto de la temperatura sobre la liberación de DOX liposomal. Tras incubar las suspensiones de LTSL-DOX durante 20 min a 37 °C se detectó una pérdida exigua del contenido liposomal de DOX, mientras que la incubación a 42 °C resultó en una liberación del 90 % del fármaco durante los 5 primeros min (Fig. 6A). Con el fin de determinar a qué temperatura se inicia la liberación masiva de DOX, las muestras se incubaron durante 5 min a temperaturas que oscilaron entre 37 y 43 °C. Se observó una modesta liberación de DOX entre 38 y 39 °C, incrementando notablemente a 40 °C y alcanzando un máximo a 43 °C (Fig. 6B).



**Figura 5. Caracterización de los LTSL-DOX.** (A) Morfología de los LTSL-DOX determinada mediante CRIOTEM (B) Distribución del tamaño de partícula de la muestra. (C) Termograma de DSC. Barra de escala: 100 nm.



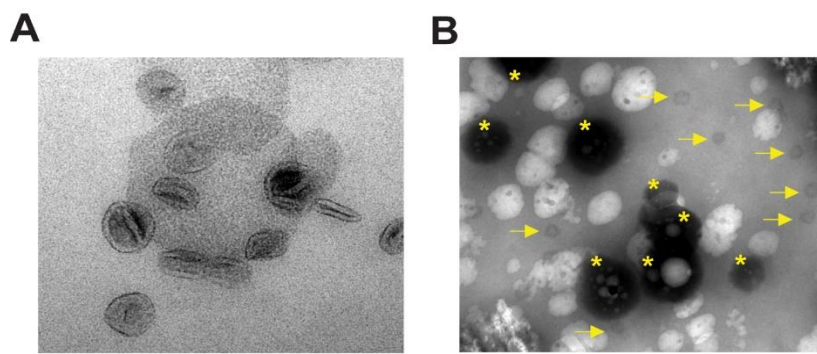
**Figura 6. Efecto de la temperatura en la liberación de DOX a partir de LTSL-DOX.** (A) Liberación de DOX en suspensiones de LTSL-DOX incubadas a 37 o 42 °C durante 20 min. La gráfica muestra los valores promedio + DE relativos a los datos obtenidos en muestras incubadas a 42 °C durante 20 min, a los que se asignó un valor arbitrario de 100. (B) Liberación de DOX en suspensiones de LTSL-DOX incubadas a las temperaturas indicadas durante 5 min. La gráfica muestra los valores promedio + DE relativos a los datos obtenidos en muestras incubadas a 43 °C, a los que se asignó un valor arbitrario de 100. \*p < 0,05 respecto a la muestra incubada a 37 °C.

## 2.2 Lipogeles que contienen HGNP

### 2.2.1 Caracterización de lipogeles que contienen HGNP

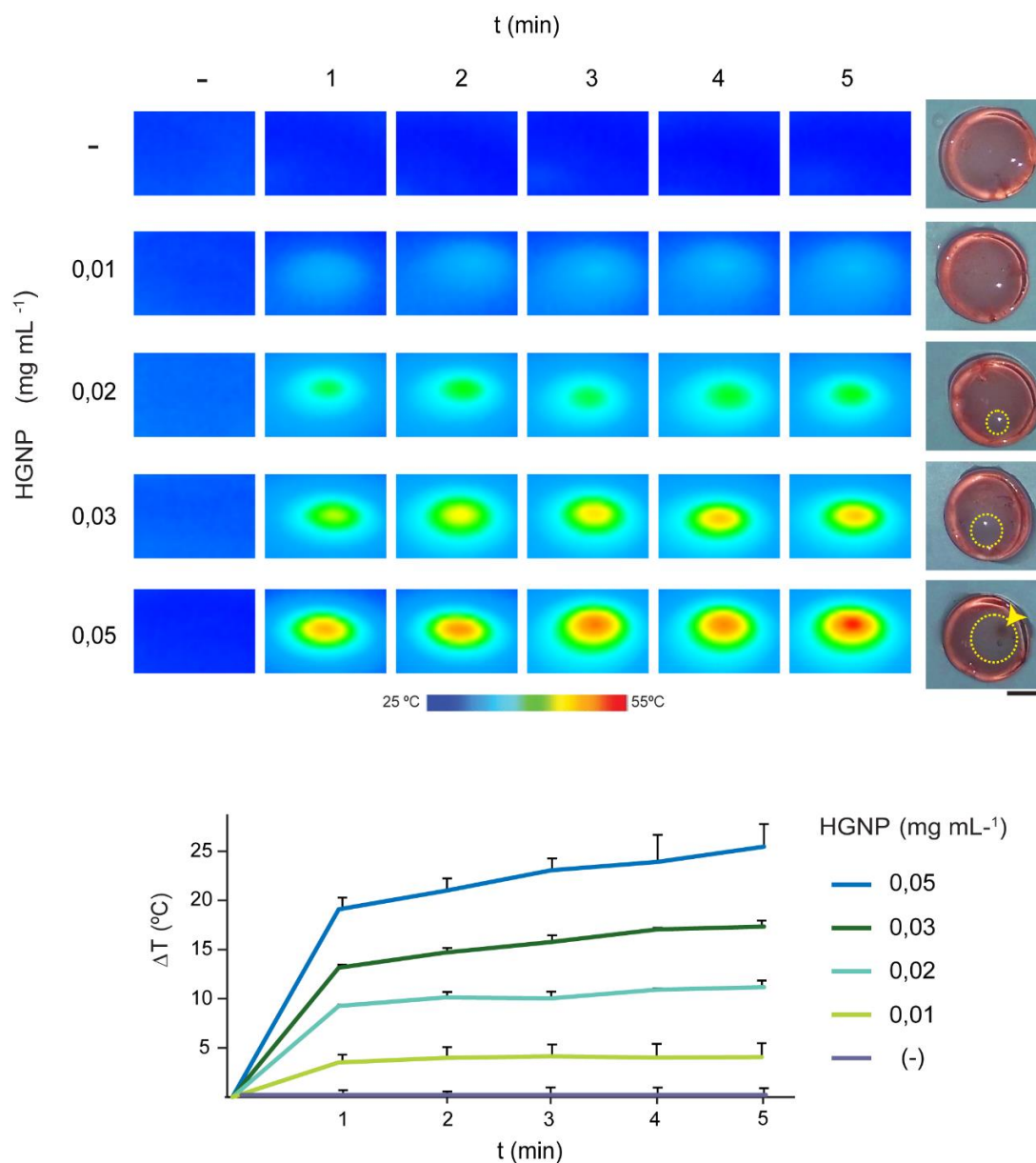
Previamente a la preparación de los lipogeles y con el fin de aumentar la uniformidad del tamaño de los liposomas en la muestra eliminando agregados, los LTSL-DOX se diluyeron en medio DMEM y se filtraron a través de una membrana de polietilensulfona

(Fig. 7A). Para conformar los lipogeles, los LTSL-DOX se añadieron junto con las HGNP a una suspensión de FBG que, en presencia del  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en el medio DMEM a la concentración de 1 mM, polimerizó tras la adición de trombina. Tanto los LTSL-DOX como las HGNP pudieron ser identificados en los lipogeles mediante TEM (Fig. 7B).



**Figura 7. Inclusión de LTSL-DOX en matrices de fibrina que contienen HGNP.** (A) Morfología de los LTSL-DOX determinada mediante TEM. (B) LTSL-DOX incluidos en matrices de fibrina conformadas con  $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP. Los liposomas están marcados con asteriscos y las flechas señalan las HGNP. Barras de escala: 100 nm.

La capacidad fototérmica de lipogeles conteniendo diferentes concentraciones de HGNP se determinó mediante irradiación con láser NIR durante 5 min, realizándose termografías cada 60 s. Como control, se emplearon lipogeles en los que no se incorporaron HGNP. Los lipogeles que contenían HGNP experimentaron un rápido aumento de temperatura (Fig. 8), proporcional a la concentración de HGNP en el lipogel. Al cabo de 5 min de irradiación, la temperatura superficial en el punto de incidencia del láser aumentó  $4,2 \pm 0,9 \text{ }^\circ\text{C}$  en los lipogeles conformados con  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP, mientras que el aumento fue de  $25,4 \pm 2,3 \text{ }^\circ\text{C}$  en los se conformaron con  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ . En los lipogeles que conformados con concentraciones de HGNP entre  $0,02$  y  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  se observó que la región concéntrica a la zona donde se focalizó el láser experimentaba una pérdida del color rojo característico de la DOX. Este efecto indica una disminución de la concentración del fármaco en dicha zona, del lipogel como consecuencia de su liberación desde los liposomas expuestos al incremento de temperatura. El tamaño de esta región decolorada aumentó con la concentración de HGNP en los lipogeles (Tabla 2). Además, en los lipogeles conformados con  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP se observó una zona interna de color oscuro dentro de la región decolorada, probablemente originada por un cambio en la conformación de la matriz de fibrina debido a un calentamiento excesivo.

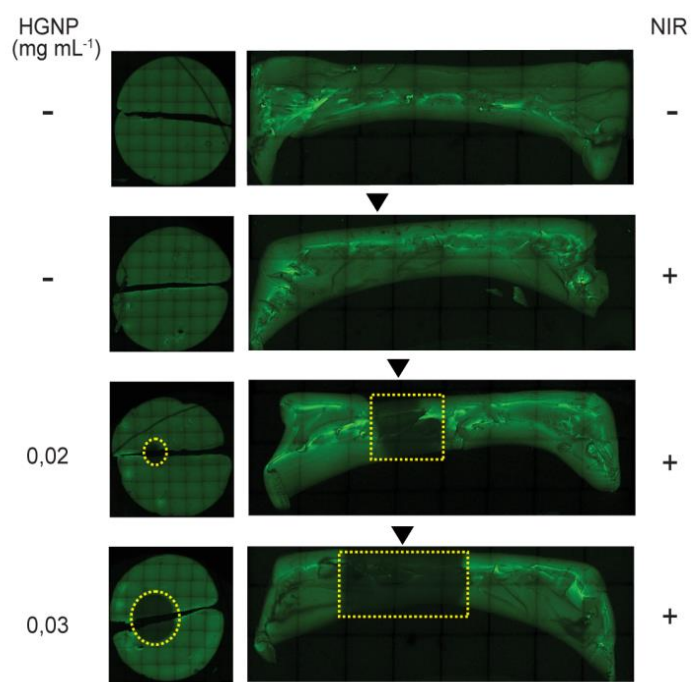


**Figura 8. Capacidad fototérmica de lipogeles que contienen HGNP.** Termografías de lipogeles conformados con las concentraciones indicadas de HGNP, o desprovistos de HGNP (-), durante su irradiación con láser NIR empleando una densidad de potencia de 44 mW mm<sup>-2</sup> a los tiempos indicados. Las fotografías muestran la superficie de los lipogeles tras 5 min de irradiación. Los círculos amarillos delimitan la región decolorada, la flecha señala la zona en que se ha producido el cambio de conformación de la matriz de fibrina. La gráfica muestra los valores promedio + DE de los incrementos de la temperatura máxima durante la irradiación con láser NIR. Barra de escala: 5 mm.

HGNP (mg mL <sup>-1</sup> )	Área (mm <sup>2</sup> )
0,05	37,83 ± 0,44
0,03	19,67 ± 0,75
0,02	11,93 ± 0,61
0,01	N.D.
-	N.D.

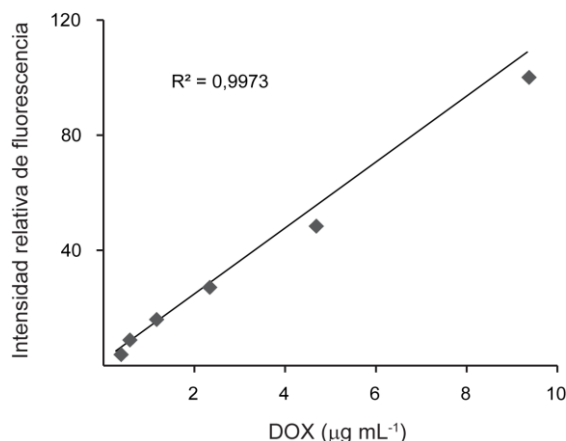
**Tabla 2.** Cuantificación del área decolorada en la superficie de irradiación de lipogeles. El área de la superficie del lipogel donde incide el láser es de 70 mm<sup>2</sup>. Los datos se presentan como los valores promedio ± DE. N.D.: No detectado.

Las imágenes de los lipogel obtenidas mediante microscopía confocal muestran una acusada disminución en la intensidad de fluorescencia en la región concéntrica a la zona donde se focaliza el láser NIR. Este fenómeno indica la disminución de la concentración de DOX como consecuencia de su liberación desde los liposomas expuestos al incremento local de temperatura, que se extiende por toda la profundidad del eje Z del lipogel (Fig. 9). El volumen del hidrogel decolorado incrementa con la concentración de HGNP.



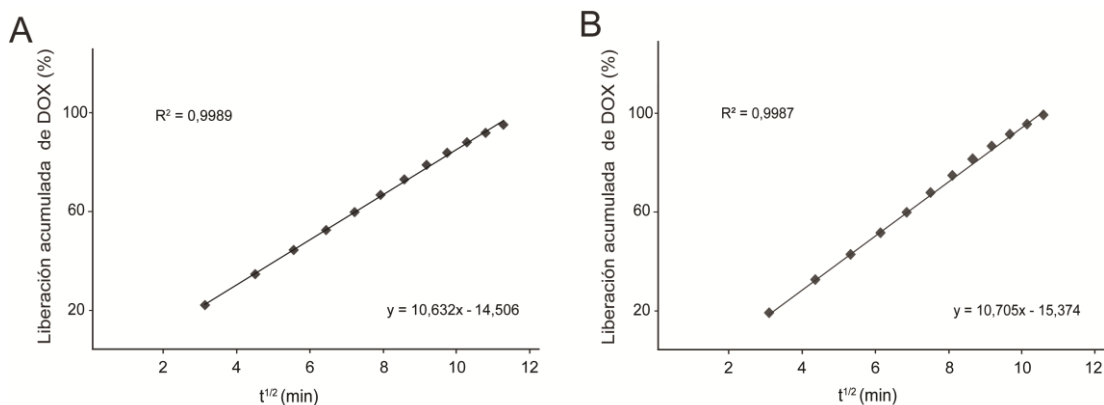
**Figura 9. Imágenes de fluorescencia de lipogel irradiados con láser NIR.** Vista cenital (izquierda) y de la sección transversal (derecha) de lipogel conformados con las concentraciones indicadas de HGNP o desprovistos de HGNP (-) y que se irradiaron (+) o no (-) durante 10 min con láser NIR empleando una densidad de potencia de  $44 \text{ mW mm}^{-2}$ . Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal de barrido láser inmediatamente después de la irradiación. Las flechas negras indican el punto de incidencia del láser en el lipogel, las áreas delimitadas por líneas amarillas señalan la región de los lipogel donde disminuye la fluorescencia. Barras de escala: 2 mm en imágenes cenitales y 1 mm en imágenes de sección transversal.

Dado que DOX es una molécula fluorescente, se investigó si existe correlación entre la fluorescencia emitida por el fármaco diluido en el medio de cultivo empleado en este trabajo y su concentración absoluta. Los resultados indicaron una buena correlación entre los valores de fluorescencia y la concentración de DOX (Fig. 10).



**Figura 10. Titulación fluorimétrica de DOX.** Fluorescencia de disoluciones de DOX en DMEM-FBS. Se muestran los valores promedio de fluorescencia, relativizados a los de la muestra correspondiente a  $9,375 \mu\text{g mL}^{-1}$  de DOX a la que se asignó un valor arbitrario de 100. Se muestra el coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

Asimismo se determinó la tasa de liberación pasiva de DOX contenida en una matriz de fibrina en función del tiempo. Para ello, se cuantificó la fluorescencia en PBS o en medio DMEM-FBS que habían sido condicionados por hidrogeles de fibrina en los que se incorporó DOX durante el proceso de polimerización. Los resultados indican que la cinética de liberación de DOX se adapta al modelo propuesto por Higuchi (1963) para liberación de fármacos a partir de matrices y no se ve afectada por los componentes del medio de cultivo (Fig. 11).

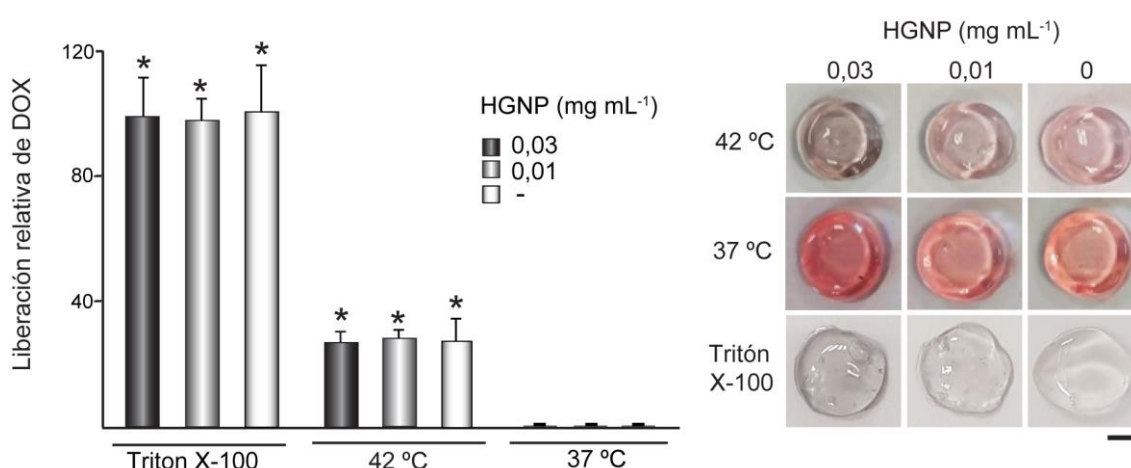


**Figura 11. Cinética de liberación de DOX a partir de hidrogeles de fibrina.** Se determinó la liberación de DOX mediante la cuantificación de la fluorescencia en PBS (A) o en medio DMEM-FBS (B) condicionados por hidrogeles de fibrina donde se incorporó DOX. Se muestran los valores promedio relativos a los de la muestra correspondiente a 110 min a los que se asignó un valor arbitrario de 100. Se muestran el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la ecuación de la recta.

Con el fin de cuantificar el contenido total de DOX en los lipogeles ensayados, éstos se trataron con 10 % de Tritón X-100 en PBS durante 24 h lo que conduce a la liberación completa del fármaco encapsulado. Para explorar el efecto de una elevación



moderada de la temperatura sobre la liberación del fármaco a partir de los LTSL-DOX embebidos en matrices de fibrina, los lipogeles se sumergieron durante 1 h en un baño de agua termostatzado a 42 °C, cuantificándose a continuación la DOX liberada al medio de cultivo mediante fluorimetría. Como control, se analizó la liberación de DOX a partir de lipogeles incubados a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Mientras que el tratamiento térmico a 42 °C liberó aproximadamente un 30 % del contenido total de DOX, la cantidad de la droga liberada desde los lipogeles incubados a 37 °C fue mínima. La inclusión de HGNP en el lipogel no afectó a la liberación de DOX inducida por el tratamiento térmico. De forma similar a lo observado en lipogeles que contienen HGNP y en los que la temperatura aumentó significativamente a consecuencia de la irradiación NIR, los lipogeles sometidos a tratamiento térmico mediante inmersión en baño experimentaron una decoloración, si bien ésta afectó de forma generalizada a toda su estructura (Fig. 12).

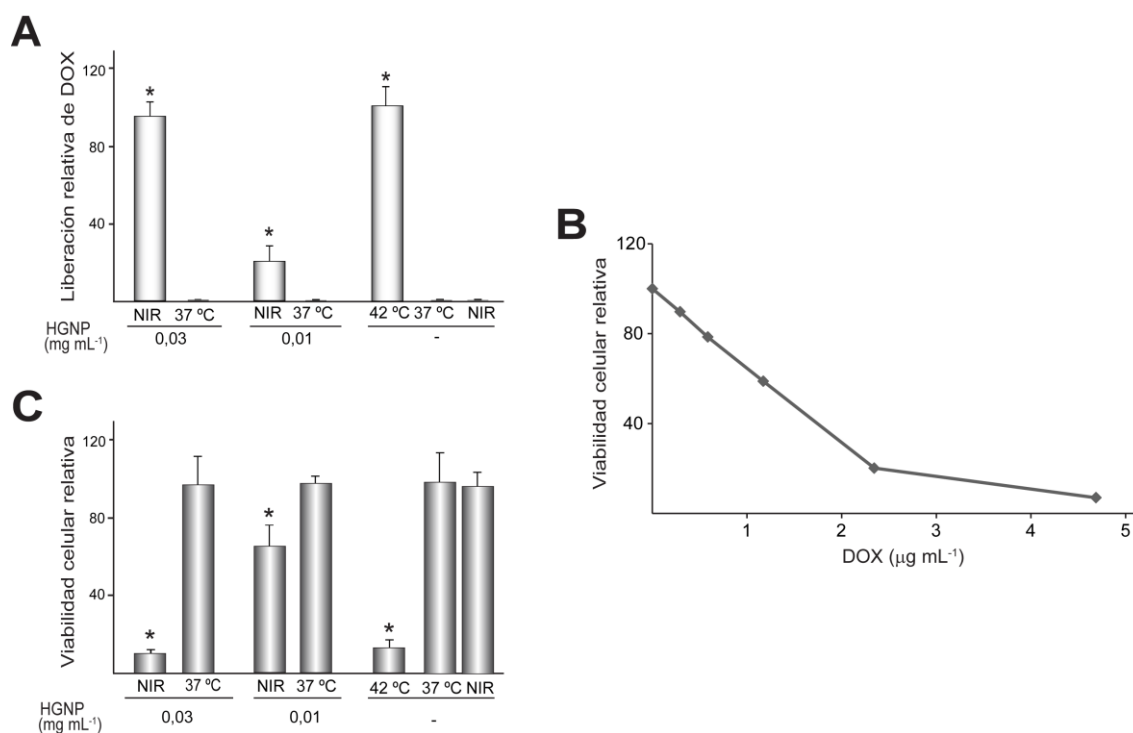


**Figura 12. Liberación de DOX a partir de lipogeles sometidos a diferentes tratamientos.** Liberación de DOX al medio de cultivo condicionado por lipogeles conformados con HGNP a las concentraciones indicadas, o desprovistos de HGNP (-), tras tratamiento con Tritón X-100 al 10 % en PBS durante 24 h (Tritón X-100), incubación en baño de agua termostatzado durante 1 h a 42 °C (42 °C) o incubación a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> durante 1 h (37 °C). La gráfica muestra los valores promedio + DE relativos a los datos obtenidos en muestras tratadas con Tritón X-100, a los que se asignó un valor arbitrario de 100. \*p < 0,05 respecto a las muestras tratadas a 37 °C. Las fotografías muestran el aspecto de los lipogeles inmediatamente después de los tratamientos. Barra de escala: 5 mm.

### 2.2.2 Liberación de DOX mediante irradiación NIR

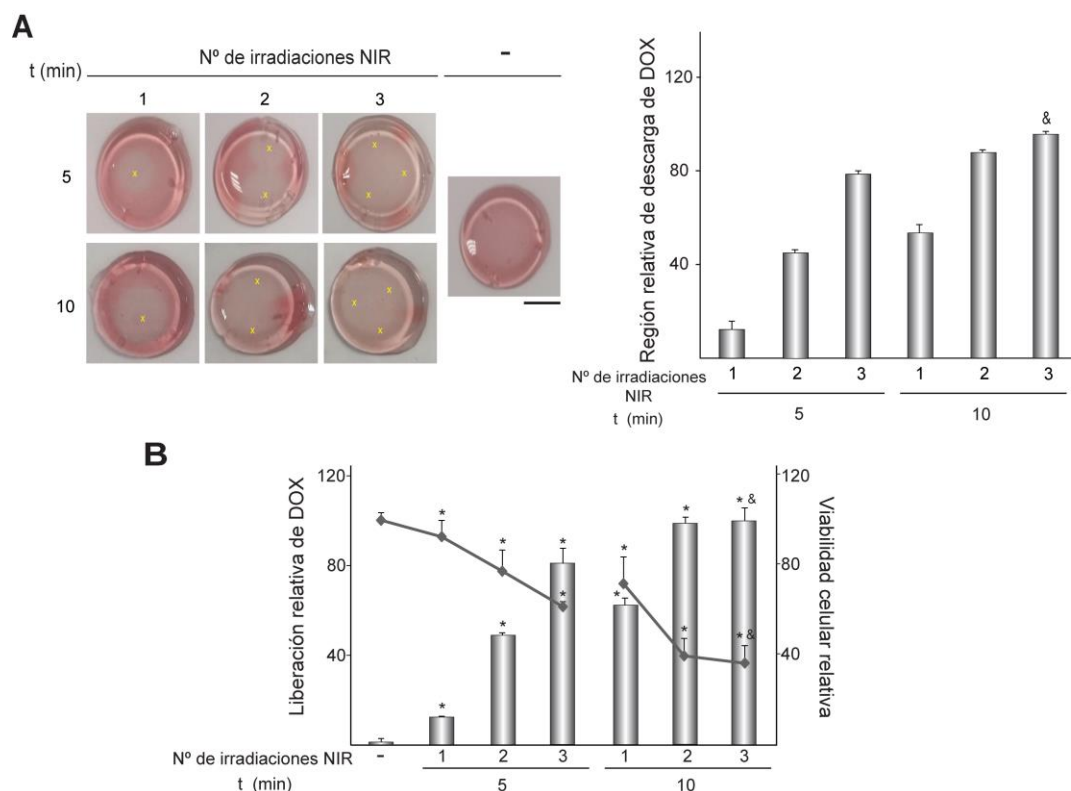
Con el fin de evaluar comparativamente la liberación de DOX tras diferentes tipos de tratamientos térmicos, se irradiaron lipogeles que albergan HGNP con láser NIR empleando una densidad de potencia de 44 mW mm<sup>-2</sup> durante 10 min y se incubaron posteriormente a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> durante 50 min. Como control, se emplearon lipogeles idénticos que se incubaron a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> durante 1 h, así como lipogeles que no contenían HGNP y que se sometieron al mismo régimen de irradiación NIR y

posterior incubación a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> o bien se incubaron durante 1 h en baño de agua termostático a 42 °C. Una vez finalizados los tratamientos, se cuantificó mediante fluorimetría el fármaco liberado al medio de cultivo en el que se encontraban sumergidas las matrices, utilizando como referencia cantidades conocidas de DOX libre disueltas en DMEM-FBS tal y como se muestra en la figura 10. La irradiación NIR de lipogeles conformados con 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de HGNP liberó cantidades de DOX similares a las de lipogeles que no contenían HGNP y que se incubaron durante 1 h a 42 °C. Así, la concentración estimada de DOX libre en estos medios condicionados fue 3,27 ± 0,29 y 3,48 ± 0,37 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Se observó que la cantidad de DOX liberada tras la irradiación NIR depende de la concentración de HGNP utilizada para conformar los lipogeles, ya que la concentración de DOX en medios condicionados por lipogeles conformados con 0,01 mg mL<sup>-1</sup> de HGNP fue de 0,68 ± 0,31 µg mL<sup>-1</sup>, unas 5 veces menor que la de lipogeles conformados con 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de HGNP. La liberación de DOX de lipogeles que albergaban HGNP y que se incubaron a 37°C/5 % CO<sub>2</sub> fue indetectable, como lo fue la de lipogeles que no contenían HGNP y que se sometieron al mismo ciclo de irradiación NIR o bien se incubaron a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> (Fig. 13A). Se comprobó el efecto citotóxico de DOX libre en cultivos de células HeLa, observándose que tratamientos durante 24 h con concentraciones superiores a 1,5 µg mL<sup>-1</sup> provocan un descenso superior al 60 % de la viabilidad del cultivo celular (Fig. 13B). Para evaluar si la DOX liberada por los lipogeles irradiados mantenía la actividad citotóxica, las células HeLa se incubaron durante 24 h con los medios condicionados por estos lipogeles (Fig. 13C). Los resultados mostraron que el medio condicionado por lipogeles conformados con 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de HGNP y que se irradiaron con láser NIR redujo la viabilidad del cultivo aproximadamente en un 90 %, de forma similar a lo observado tras el tratamiento con el medio condicionado por lipogeles que no contenían HGNP y que se incubaron a 42 °C en baño durante 1 h. La citotoxicidad de medios condicionados por lipogeles irradiados fue dependiente de la concentración de HGNP, siendo menor la correspondiente a lipogeles conformados con 0,01 mg mL<sup>-1</sup> de HGNP que la de lipogeles conformados con 0,03 mg mL<sup>-1</sup>. Finalmente, observamos que la viabilidad de las células incubadas con medios condicionados por lipogeles que contenían HGNP y que habían sido incubados a 37°C/5 % CO<sub>2</sub> fue similar a la de células incubadas con medio procedentes de lipogeles que no contenían HGNP y que se irradiaron o bien se incubaron a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>.



**Figura 13. Citotoxicidad de DOX liberada por lipogeles irradiados con energía NIR.** (A) Liberación de DOX al medio de cultivo condicionado por lipogeles conformados con las concentraciones indicadas de HGNP o desprovistos de HGNP (-). Los lipogeles se irradiaron con láser NIR durante 10 min empleando una densidad de potencia de 44 mW mm<sup>-2</sup> y posteriormente se incubaron durante 50 min a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> (NIR), o se incubaron durante 1 h a 42 °C en baño de agua termostatzado (42 °C) o a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> (37 °C). (B) Viabilidad de células HeLa tratadas con DOX. Las células se sembraron a una densidad de 5 x 10<sup>4</sup> células cm<sup>-2</sup> y se incubaron durante 24 h en DMEM-FBS, tratándose a continuación durante 24 h con concentraciones de DOX entre 0,292 y 4,687 μg mL<sup>-1</sup>. Los valores promedio son relativos a los datos obtenidos con células incubadas en ausencia de DOX a los que se asignó un valor arbitrario de 100. (C) Viabilidad de células HeLa sembradas como en “B”, cultivadas durante 24 h y a continuación incubadas durante otras 24 h con medios condicionados por lipogeles tratados como en “A”. Los resultados se expresan como valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos en la condición 42 °C/- en “A” y a la condición 37 °C/- en “B”, a los que se asignó un valor arbitrario de 100. \*p < 0,05 comparado con las muestras incubadas a 37 °C.

Una vez que se hubo comprobado la posibilidad de liberación controlada de DOX mediante la irradiación NIR de lipogeles, se exploró la posibilidad de controlar tanto la localización espacial en la que se produce la descarga de la molécula encapsulada como los niveles de liberación alcanzados. Para ello, un mismo lipogel se irradió en 1, 2 o 3 localizaciones diferentes durante 5 o 10 min por localización. Se determinó el tamaño del área decolorada, que corresponde a la zona de liberación de DOX, observándose que ésta aumentaba con el tiempo de irradiación NIR, así como con el número de irradiaciones realizadas (Fig. 14A).



**Figura 14. Control de la liberación de DOX mediante irradiación NIR de lipogeles que contienen HGNP.** Lipogeles conformados con  $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP se irradiaron con láser NIR 1, 2 o 3 veces en diferentes localizaciones durante 5 o 10 min y se incubaron posteriormente a  $37 \text{ }^\circ\text{C}/5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$  hasta completar en todos los casos un periodo de incubación de 1 h. Las muestras no irradiadas se mantuvieron durante 1 h a  $37 \text{ }^\circ\text{C}/5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$  (-). (A) Las fotografías muestran una imagen representativa de los lipogeles inmediatamente después de los tratamientos. Las cruces señalan el punto de incidencia del láser en la superficie del lipogel. La gráfica muestra el tamaño relativo de las áreas decoloradas por la liberación de DOX (B) El histograma muestra la liberación de DOX al medio de cultivo condicionado por los lipogeles. La gráfica muestra la viabilidad de células HeLa sembradas como se especifica en la figura 13B y que se trataron durante 24 h con medios de cultivo que contenían un 10 % del medio condicionado por los lipogeles. Los resultados se expresan como valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos tras irradiar en 3 puntos independientes durante 10 min (histogramas en “A” y “B”); y a los de células incubadas con medios condicionados procedentes de lipogeles no irradiados (gráfica en “B”), a los que se asignó un valor arbitrario de 100. \* $p < 0,05$  comparado con muestras no irradiadas, & $p < 0,05$  comparado con lipogeles irradiados en 2 puntos independientes durante 10 min. Barra de escala: 1 cm.

La figura 14B muestra que la liberación máxima de fármaco se obtuvo tras someter al lipogel a tres irradiaciones seriadas de 10 min cada una. Un número menor irradiaciones o una menor duración de las mismas resultaron en una menor descarga de fármaco al medio de cultivo. Por último, se observó cómo la disminución de la viabilidad de células HeLa incubadas con medios condicionados por lipogeles irradiados era proporcional al incremento en la liberación de DOX al medio de cultivo.

En conjunto, los datos mostrados indican que modulando la concentración de HGNP, el número de irradiaciones y el tiempo de irradiación es posible ajustar la cantidad de DOX liberada por los lipogeles. Asimismo indican que mediante esta metodología es posible regular de forma precisa la localización del lipogel en la que se produce la liberación de fármaco.

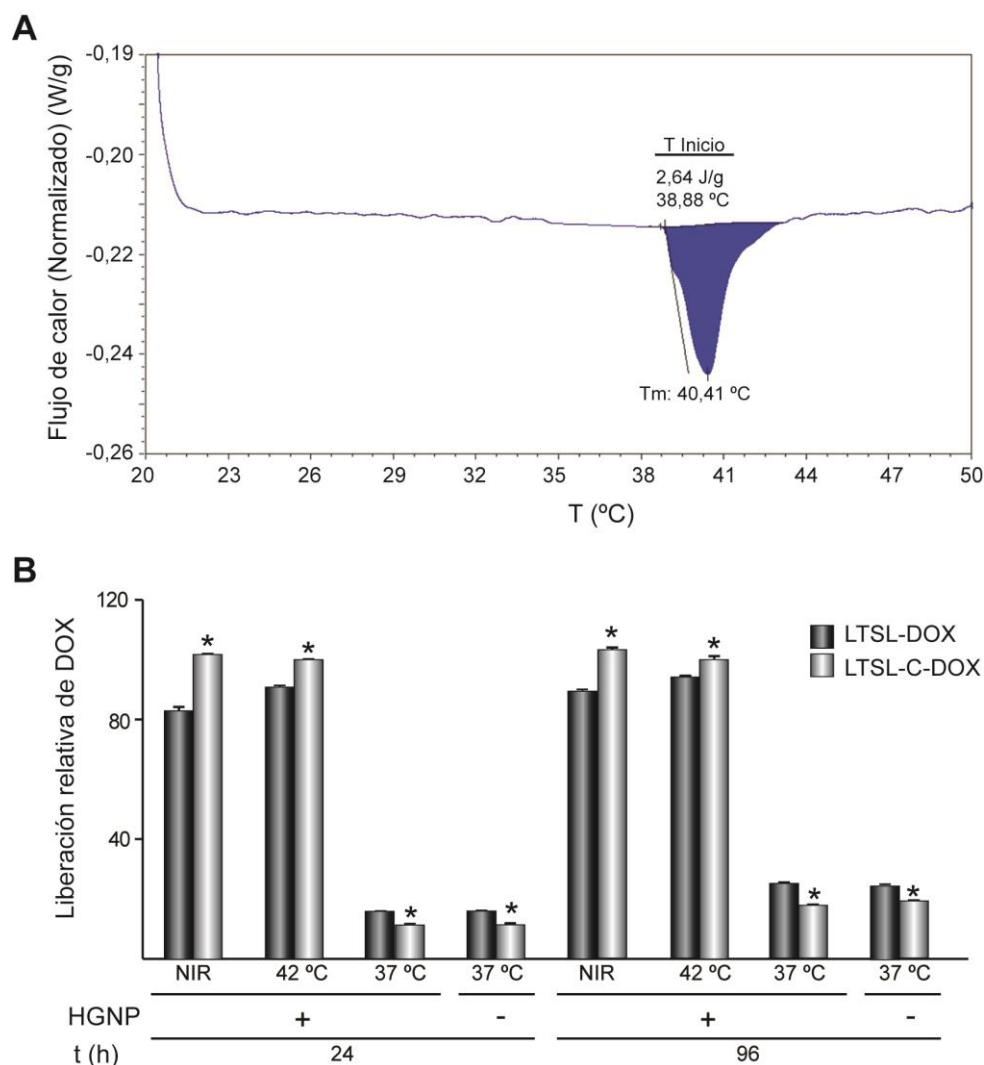
### **2.2.3 Optimización de la liberación de DOX mediante irradiación NIR de lipogeles fototérmicos**

Los resultados anteriores presentan a los lipogeles fototérmicos como sistemas eficientes para la liberación controlada de DOX mediante irradiación con láser NIR, si bien es necesario considerar algunos aspectos. En primer lugar, la mínima liberación del fármaco a 37 °C podría dar lugar a problemas de toxicidad tras la implantación de estos materiales. Por otro lado, la naturaleza inerte de las HGNP imposibilita la completa degradación del lipogel implantado. Por ello, nos planteamos introducir dos modificaciones en el sistema de liberación que mejoren su potencial traslación a un escenario clínico. La primera trata de minimizar la liberación de DOX a 37 °C mediante el empleo de liposomas que incorporan colesterol en sus membranas. La segunda modificación persigue generar sistemas completamente degradables mediante el empleo de CuSNP como elementos nanotransductores.

#### **2.2.3.1 Incorporación de colesterol a LTSL-DOX**

Con el fin de aumentar la estabilidad de las membranas de los liposomas, se incorporó un 5 % de colesterol durante la síntesis de los mismos. Los liposomas resultantes, denominados LTSL-C, se cargaron con DOX utilizando la misma razón fármaco:lípidos que en el caso de los LTSL-DOX. El análisis DSC de la nueva formulación LTSL-C-DOX reveló una transición principal de tipo endotérmico que sucede a los 40,4 °C (Fig. 15A), no apreciándose transición de fase alguna a 37 °C.

A continuación se prepararon lipogeles en los que se incluyeron LTSL-C-DOX. La comparación entre los niveles de DOX liberada por estos lipogeles o por los que contienen LTSL-DOX tras incubación a 37 °C durante 24 y 96 h indicó que la descarga es significativamente menor en los lipogeles preparados con LTSL-C-DOX, incluyan o no HGNP (Fig. 15B). Tras el tratamiento térmico de los lipogeles, bien mediante irradiación NIR o mediante inmersión en baño de agua termostatzado, las muestras que contenían LTSL-C-DOX liberaron cantidades superiores de fármaco que las que contenían LTSL-DOX (Fig. 15B). Estos resultados indican que la incorporación en lipogeles de LTSL-C constituye una estrategia efectiva para disminuir la liberación de DOX a 37 °C y potenciar su liberación inducida mediante irradiación NIR.

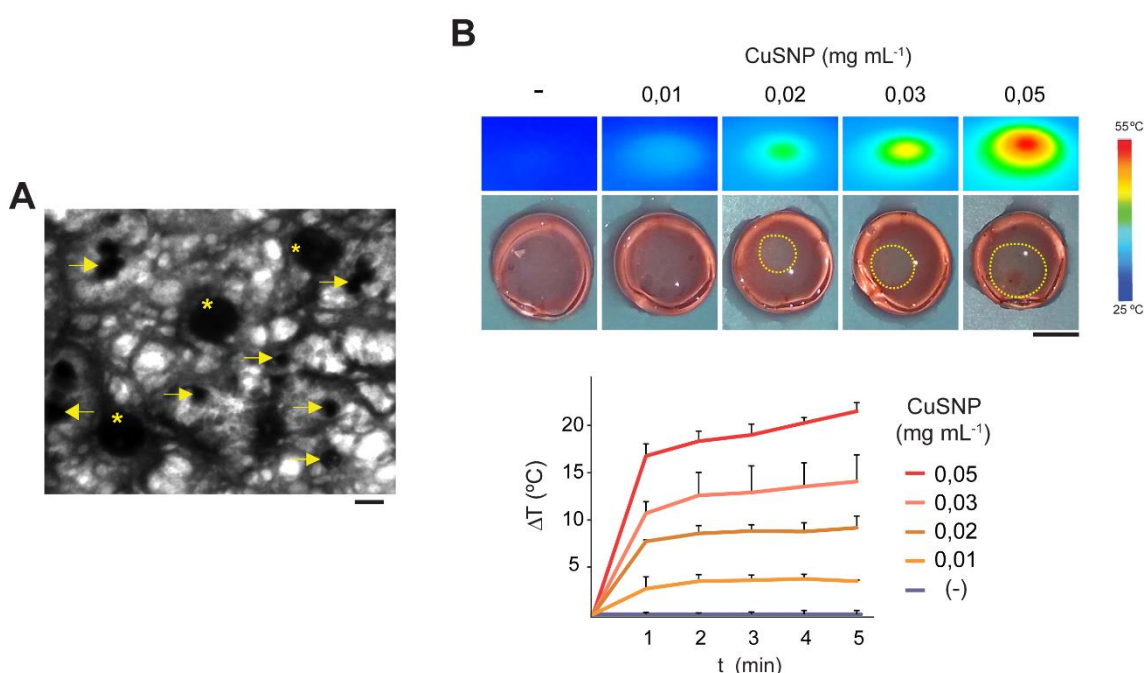


**Figura 15. Caracterización de lipogeles que contienen LTSL-C-DOX.** (A) Termograma de DSC de LTSL-C-DOX. (B) Liberación de DOX al medio de cultivo condicionado por lipogeles preparados con LTSL-C-DOX o LTSL-DOX, y  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP o desprovistos de HGNP (-). Los lipogeles se irradiaron con láser NIR durante 10 min empleando una densidad de potencia de  $44 \text{ mW mm}^{-2}$  (NIR) o se incubaron a  $42 \text{ °C}$  durante 1 h en baño termostatzado ( $42 \text{ °C}$ ), siendo posteriormente mantenidos a  $37 \text{ °C}/5 \text{ \% CO}_2$  durante 24 o 96 h. El resto de lipogeles se incubaron durante 24 o 96 h a  $37 \text{ °C}/5 \text{ \% CO}_2$  ( $37 \text{ °C}$ ). Los resultados se expresan como valores promedio + DE y son relativos a los datos correspondientes a LTSL-C-DOX ( $42 \text{ °C}$ ) a cada tiempo de incubación, a los que se asignó un valor arbitrario de 100. \* $p < 0,05$  comparado con lipogeles preparados con LTSL-DOX.

### 2.2.3.2 Lipogeles que contienen CuSNP

Dado que las CuSNP son capaces de transducir eficientemente energía NIR en calor y también degradarse en medio acuoso (Guo y col., 2011), se utilizó este nanomaterial para obtener lipogeles fototérmicos. Tanto los LTSL-DOX como las CuSNP pudieron ser identificadas en los lipogeles mediante análisis TEM (Fig. 16A). El estudio de la capacidad fototérmica de los lipogeles conformados con  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP y que se irradiaron con láser NIR empleando una densidad de potencia de  $44 \text{ mW mm}^{-2}$  durante 5 min mostró un aumento de temperatura en la superficie de los lipogeles de  $3,5 \pm 0,4 \text{ °C}$ . Dicho aumento fue muy superior, de  $21,5 \pm 0,9 \text{ °C}$ , en lipogeles

conformados con  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP (Fig. 16B). Así, la capacidad de los lipogeles para transducir energía NIR en calor depende de la concentración de CuSNP, tal y como se había observado en lipogeles preparados con HGNP. Los lipogeles irradiados que se conformaron con CuSNP a concentraciones de  $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$  o superior mostraron una región desprovista de la coloración que aportan los LTSL-DOX, que es coincidente con la zona de incidencia del láser y cuyo tamaño aumenta con la concentración de CuSNP (Tabla 3). El área decolorada de lipogeles conformados con  $0,03$  o  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP fue menor que la de lipogeles conformados con concentraciones equivalentes de HGNP (Tabla 2).

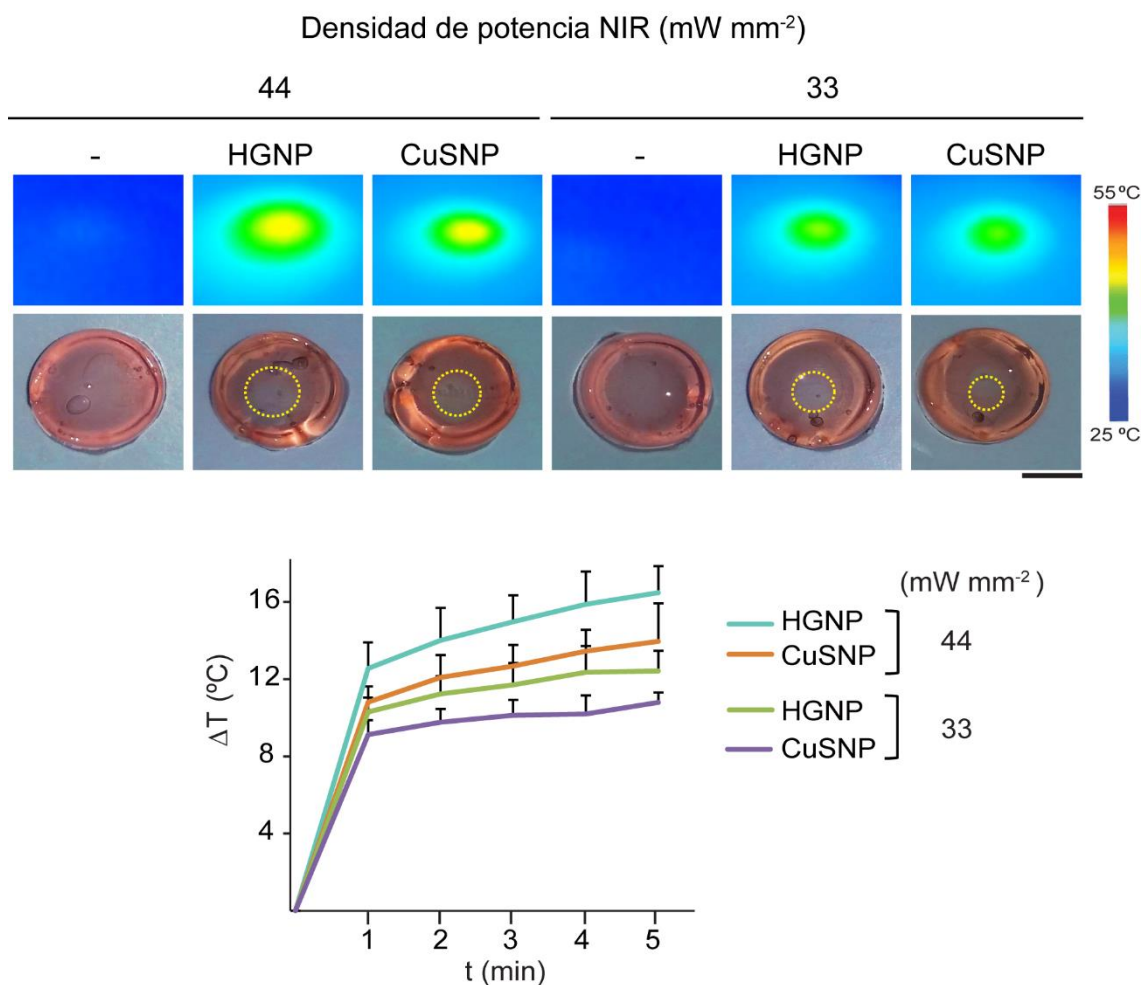


**Figura 16 Caracterización de lipogeles basados en LTSL-DOX que contienen CuSNP.** (A) Imagen obtenida mediante TEM de una matriz de fibrina conformada con  $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP y LTSL-DOX. Los LTSL-DOX están marcados con asteriscos y las flechas señalan las CuSNP. (B) Termografías y fotografías de lipogeles preparados con LTSL-DOX conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o no desprovistos de CuSNP (-), y que se irradiaron con láser NIR empleando una densidad de potencia de  $44 \text{ mW mm}^{-2}$  durante 5 min. Las termografías corresponden al minuto 5 de irradiación y las fotografías de los lipogeles se tomaron al finalizar las irradiaciones. Los círculos amarillos delimitan la región decolorada de los lipogeles tras la irradiación NIR. La gráfica muestra los valores promedio + DE de los incrementos de la temperatura máxima durante la irradiación con láser NIR. Barra de escala: 100 nm en imágenes de TEM y 5 mm en fotografías.

CuSNP ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Área ( $\text{mm}^2$ )
0,05	$35,22 \pm 0,56$
0,03	$17,59 \pm 0,63$
0,02	$10,75 \pm 0,73$
0,01	N.D.
-	N.D.

**Tabla 3.** Cuantificación del área decolorada en lipogeles. El área de la superficie del lipogel donde incide el láser es de  $70 \text{ mm}^2$ . Los datos se presentan como los valores promedio  $\pm$  DE. N.D.: No detectado.

Asimismo se comparó el comportamiento fototérmico de lipogeleles que incluían 0,02 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP o de HGNP tras irradiación con láser NIR empleando densidades de potencia de 33 o 44 mW mm<sup>-2</sup> (Fig. 17). A ambas densidades, los lipogeleles preparados con CuSNP mostraron menor capacidad de transducción de energía NIR en calor.

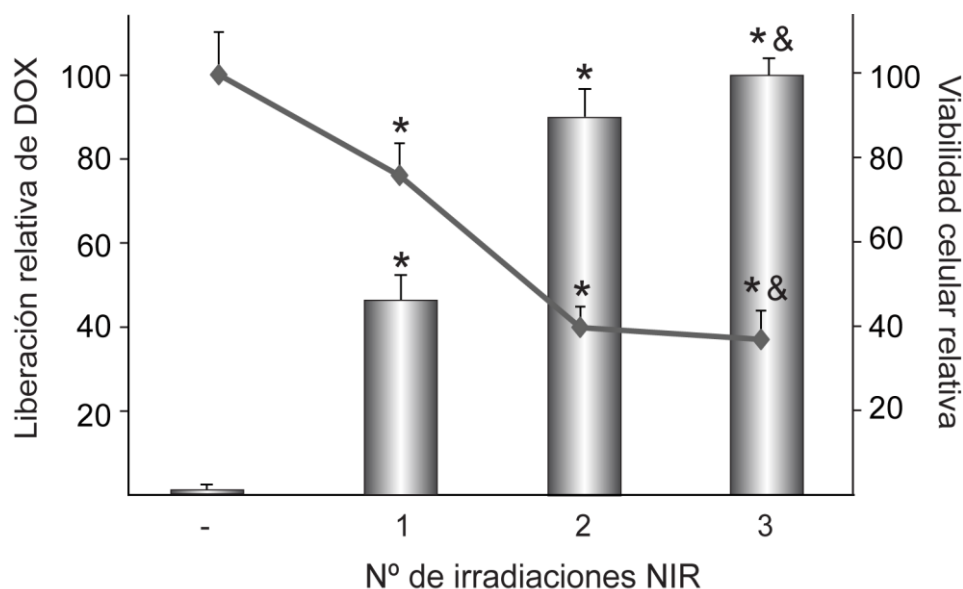


**Figura 17. Eficiencia fototérmica de lipogeleles preparados con LTSL-DOX que contienen NIR-NP.** Termografías y fotografías de lipogeleles conformados con 0,02 mg mL<sup>-1</sup> de HGNP o CuSNP o que no contenían NIR-NP (-) y que se irradiaron durante 5 min con un láser NIR a las densidades de potencia indicadas. Las termografías corresponden al minuto 5 de irradiación NIR, mientras que las fotografías de los lipogeleles se tomaron al finalizar las irradiaciones. La gráfica muestra los valores promedio + DE de los incrementos de la temperatura máxima durante la irradiación con láser NIR. Los círculos amarillos delimitan la región decolorada de los lipogeleles. Barra de escala: 5 mm.

Finalmente, con el fin de explorar si es posible controlar la cantidad de fármaco liberado en función del número de irradiaciones ejercidas sobre un mismo lipogel, se realizaron irradiaciones NIR en distintas localizaciones de lipogeleles basados en LTSL-DOX conformados con 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP (Fig. 18). Los resultados fueron similares a los obtenidos en los ensayos en que se emplearon HGNP, indicando que la



liberación de DOX incrementa con el número de irradiaciones. Asimismo, la viabilidad de células HeLa cultivadas con el medio condicionado por los lipogeles irradiados disminuyó de forma proporcional a la concentración de DOX presente en dichos medios demostrando que la DOX liberada tras irradiar lipogeles que contienen CuSNP mantiene su actividad citotóxica.



**Figura 18. Control de la liberación de fármaco a partir de lipogeles basados en LTSL-DOX que contienen CuSNP.** Los lipogeles conformados con  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP se irradiaron con láser NIR 1, 2 o 3 veces en diferentes puntos durante 10 min, incubándose posteriormente a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}/5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$  hasta completar en todos los casos un periodo de 1 h. Las muestras no irradiadas se mantuvieron durante 1 h a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}/5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$ . El histograma muestra la liberación de DOX en los medios condicionado por lipogeles. El gráfico muestra la viabilidad de células HeLa sembradas como se especifica en la figura 13B y tratadas durante 24 h con medios de cultivo que contenían un 10 % del medio condicionado por los lipogeles. Los resultados se expresan como valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos tras irradiar en 3 puntos independientes (histograma) o a los de células incubadas con medios condicionados procedentes de lipogeles no irradiados (gráfica), a los que se asignó el valor arbitrario de 100. \* $p < 0,05$  comparado con muestras no irradiadas. & $p < 0,05$  comparado con lipogeles irradiados en 2 localizaciones.

### 3. ESTUDIO DE INTERMEDIARIOS TISULARES BASADOS EN MATRICES POLIMÉRICAS FOTOTÉRMICAS

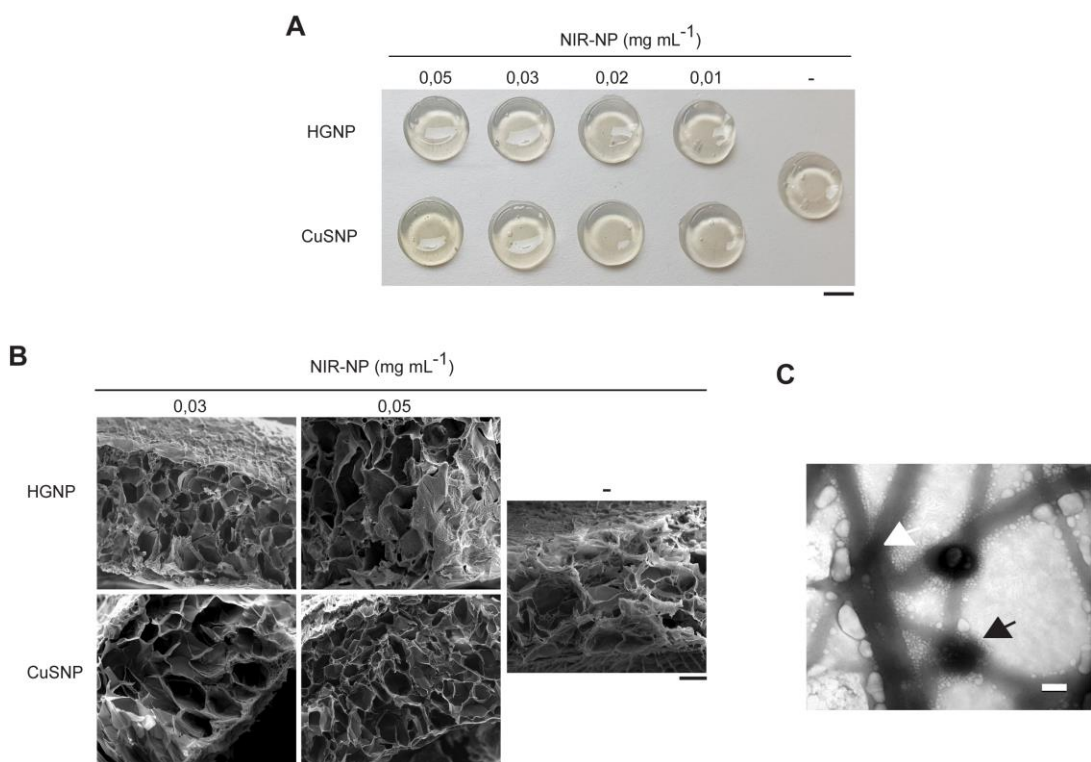
En este apartado se describe la generación y caracterización de matrices poliméricas que albergan NIR-NP, así como su utilización en la preparación de intermediarios tisulares que permiten controlar la expresión transgénica inducida por irradiación con láser NIR. En concreto, se han estudiado matrices de fibrina, ELR, y criogeles de HEMA:AA para generar intermediarios tisulares. En este trabajo se ha realizado un estudio exhaustivo del potencial como intermediarios tisulares de matrices de fibrina conteniendo CuSNP. En el caso de hidrogeles de ELR y criogeles de HEMA:AA, cuya capacidad para generar matrices fototérmicas no ha sido explorada anteriormente, se

han preparado y caracterizado intermediarios tisulares fototérmicos para estudiar su capacidad de controlar la expresión transgénica inducida por irradiación con láser NIR.

### 3.1 Hidrogeles basados en fibrina y NIR-NP

#### 3.1.1 Caracterización de hidrogeles basados en fibrina y NIR-NP

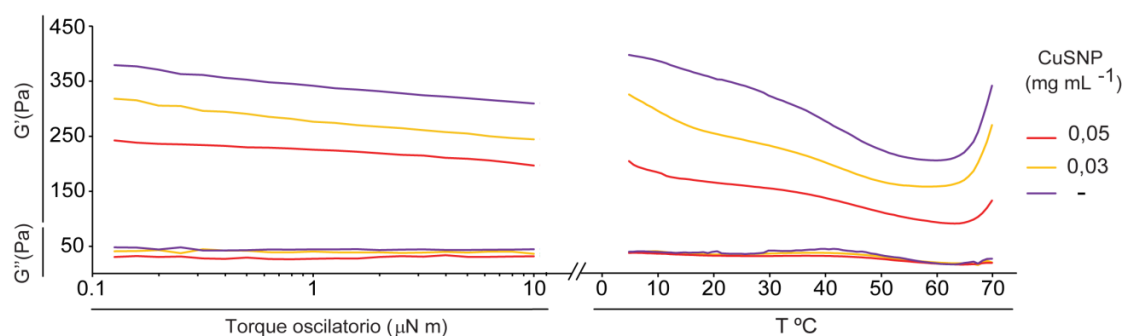
La incorporación de CuSNP a la solución de fibrinógeno y trombina no afecta a la conformación de los hidrogeles resultantes, que macroscópicamente son indistinguibles de los que contienen HGNP o no contienen NIR-NP (Fig. 19A). Asimismo la microestructura aparente de hidrogeles que contienen dosis equivalentes de HGNP o CuSNP es asimismo similar según muestran los resultados obtenidos por SEM (Fig. 19B). Mediante TEM se pudieron detectar CuSNP asociadas a las fibras de fibrina que conforman el hidrogel (Fig.19C).



**Figura 19. Caracterización estructural de hidrogeles de fibrina y NIR-NP.** (A) Fotografía de hidrogeles de fibrina conformados con las concentraciones indicadas de HGNP o CuSNP o desprovistos de NIR-NP. (B) Imágenes de las matrices de fibrina obtenidas mediante SEM. (C) Imagen obtenidas mediante TEM de un hidrogel de fibrina conformado con 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP. La flecha negra señala una CuSNP y la blanca una fibra de fibrina. Barras de escala: (A) 5 mm, (B) 200  $\mu$ m, (C) 100 nm.

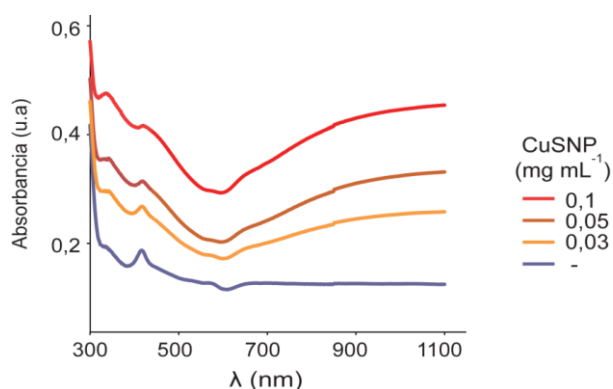
A continuación se realizó el estudio del comportamiento reológico de matrices que incluyen CuSNP. Los resultados muestran que la inclusión de CuSNP durante la polimerización de los hidrogeles provoca un cambio en sus propiedades viscoelásticas

debido a una reducción significativa del valor de  $G'$ , generándose hidrogeles con menor resistencia. La inclusión de CuSNP en hidrogeles no provoca cambios en la evolución que experimenta  $G'$  con el aumento de temperatura entre los 4 y 70 °C. Cabe destacar la aparición de dos zonas de transición en los rangos de 10-20 °C y 40-50 °C probablemente debidas a la ruptura de enlaces débiles de la matriz de fibrina (Fig. 20).



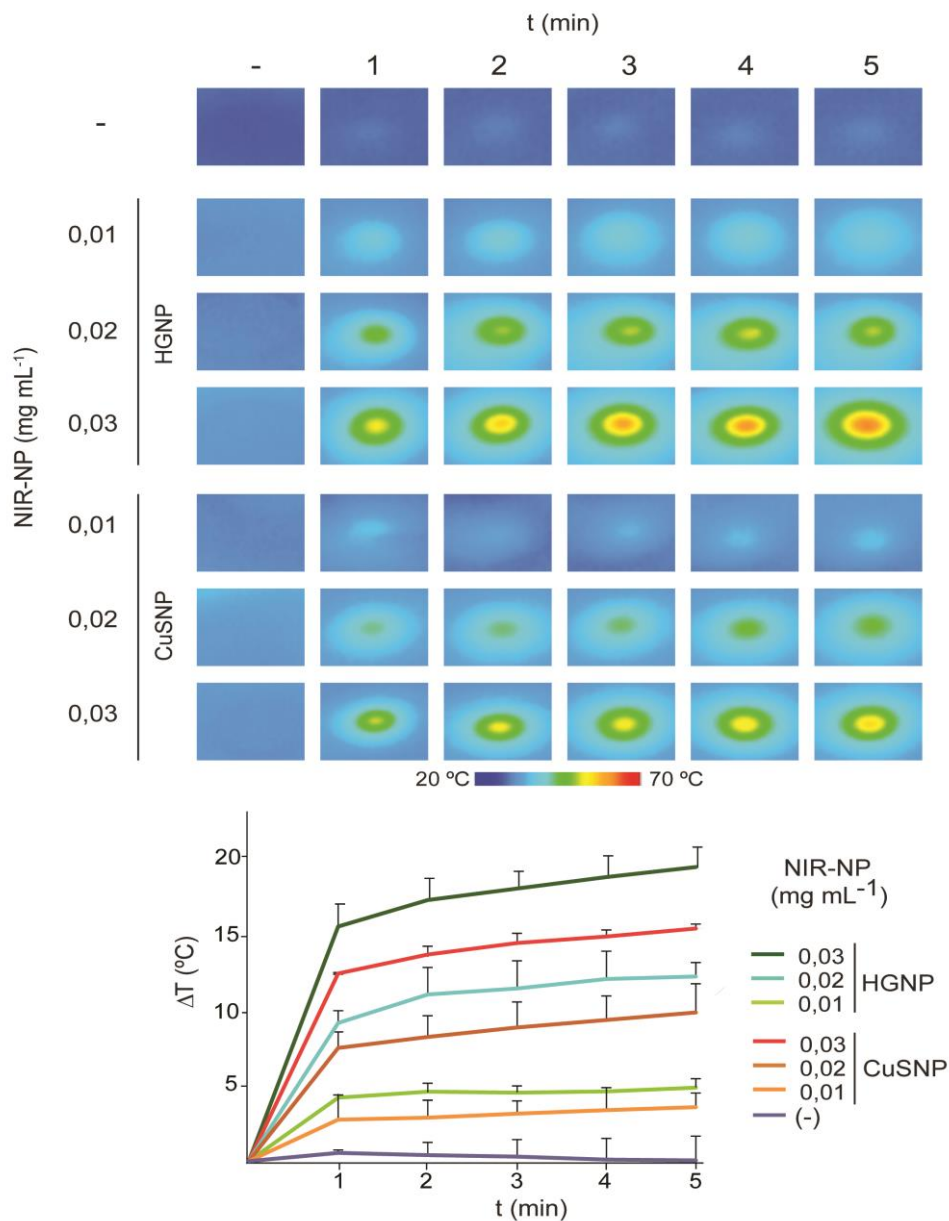
**Figura 20. Estudio reológico de hidrogeles de fibrina y CuSNP.** Se conformaron hidrogeles conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-). Análisis mecánico dinámico de hidrogeles en función de la fuerza de torsión mecánica (izquierda) y temperatura (derecha).

La incorporación de CuSNP a las matrices de fibrina provoca un cambio drástico en su espectro de absorción UV-Vis-NIR (Fig. 21). Los hidrogeles que contienen CuSNP muestran un mínimo a 600 nm, incrementando su absorción a lo largo de la región NIR. Esta banda de absorción característica no se observó en hidrogeles que no contenían CuSNP.



**Figura 21. Espectro de absorción de hidrogeles de fibrina y CuSNP.** Se polymerizaron hidrogeles de fibrina conformados con las concentraciones de CuSNP indicadas o desprovistos de CuSNP (-) y se determinó su absorbancia a las longitudes de onda ( $\lambda$ ) indicadas.

A continuación se comparó la capacidad fototérmica de hidrogeles que contenían CuSNP con la de hidrogeles que contenían HGNP (Fig. 22). Estos últimos mostraron una mayor eficiencia transduciendo energía NIR en calor que las matrices que contenían CuSNP. A medida que la concentración de NIR-NP aumenta en el hidrogel, aumenta la diferencia del comportamiento fototérmico entre ambos materiales.

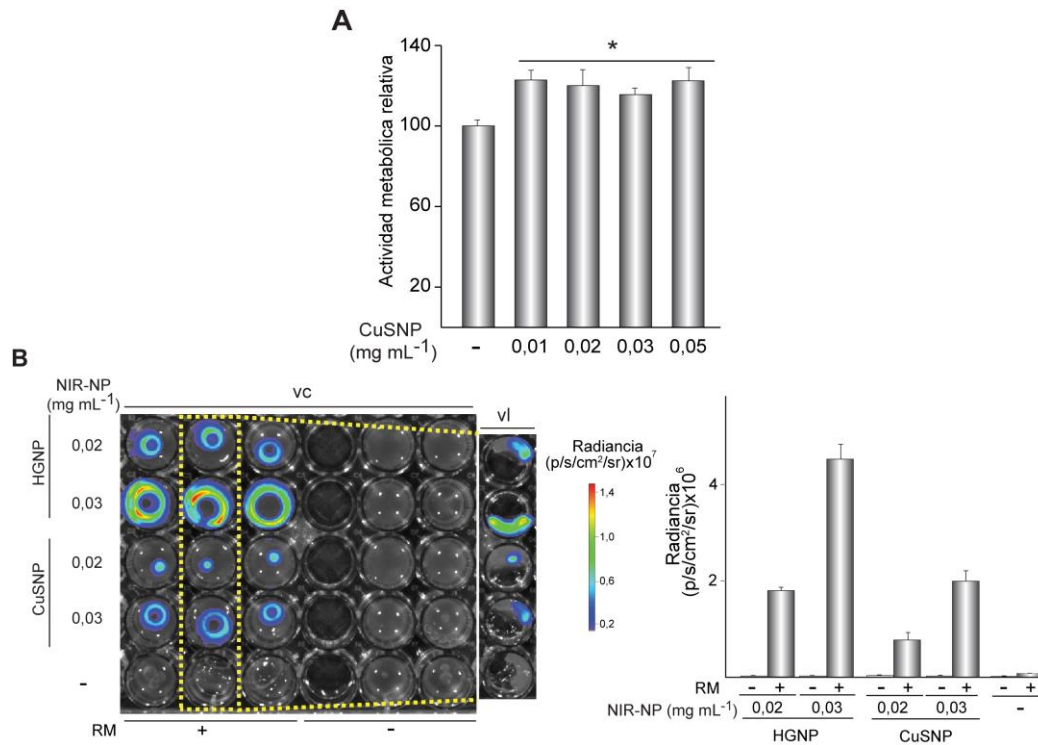


**Figura 22. Actividad fototérmica de hidrogeles basados en fibrina y NIR-NP.** Los hidrogeles de fibrina conformados con las concentraciones indicadas de HGNP o CuSNP o desprovistos de NIR-NP (-) se irradiaron con láser NIR empleando una densidad de potencia de 44 mW mm<sup>-2</sup>. El calentamiento se monitorizó mediante termografía a los tiempos indicados de irradiación. La gráfica muestra los valores promedio + DE de los incrementos de la temperatura máxima durante la irradiación con láser NIR.

### 3.1.2 Intermediarios tisulares basados en matrices fototérmicas basadas en fibrina para el control de la expresión transgénica

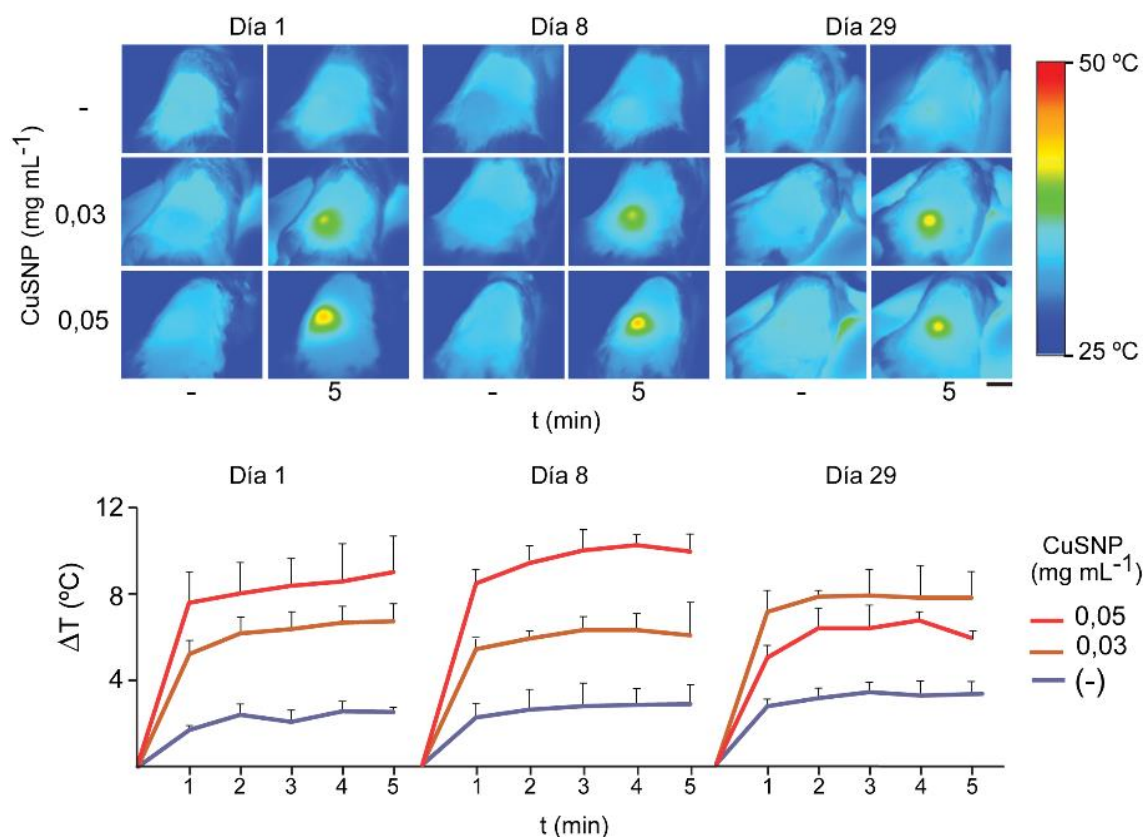
Una vez observado que es posible incrementar la temperatura de las matrices de fibrina que contienen CuSNP tras su irradiación con láser NIR, se determinó si dicho incremento podría ser utilizado para activar la expresión transgénica en células C3H/10T1/2-fLuc incluidas en dichos materiales. En primer lugar se evaluó, como prueba de viabilidad, la actividad metabólica de células C3H/10T1/2-fLuc incluidas en hidrogeles conformados con CuSNP en un rango de concentraciones entre 0,01 y 0,05 mg mL<sup>-1</sup> (Fig. 23A). Los resultados indicaron que las células cultivadas durante 7 días en hidrogeles que contienen CuSNP presentan una mayor actividad metabólica que las cultivadas en hidrogeles que no las contienen. La irradiación con láser NIR, en presencia de RM, de hidrogeles conformados con 0,02 o 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP indujo la expresión de fLuc en células C3H/10T1/2-fLuc. Los ensayos de bioluminiscencia indicaron que la actividad del gen testigo se expande radialmente a partir del punto de incidencia del láser, propagándose a lo largo del eje Z del constructo (Fig. 23B). Asimismo se observó que la actividad fLuc en hidrogeles que contienen CuSNP es menor que en las matrices que se emplearon como control y que se conformaron con concentraciones similares de HGNP. Cabe destacar que tanto en hidrogeles conformados con las dos concentraciones ensayadas de HGNP como en hidrogeles conformados con la concentración mayor de CuSNP aparece una región donde no se evidencia actividad transgénica coincidente con el punto donde se focaliza el láser. Esta ausencia de actividad se atribuye al aumento excesivo de temperatura local en esa región del hidrogel, que provoca la interrupción de las funciones biológicas de las células incluidas en la zona.

A la vista de los resultados obtenidos *in vitro* se evaluó la tecnología desarrollada en un modelo de implantación subcutánea *in vivo*. En primer lugar se determinó si los hidrogeles que contenían CuSNP podían ser utilizados para generar hipertermia óptica localizada mediante irradiación con láser NIR en animales de experimentación. Para ello se inyectaron hidrogeles que contenían 0,15 U mL<sup>-1</sup> de aprotinina y se conformaron con concentraciones de CuSNP de 0,03 y 0,05 mg mL<sup>-1</sup> en el espacio subcutáneo de la región dorsal posterior de ratones adultos C3H/HeN, utilizando como control hidrogeles que no contenían CuSNP. 24 h después, la zona de implantación fue irradiada con un láser NIR durante 5 min. Este procedimiento se repitió transcurridos 8 y 29 días desde la implantación, monitorizándose las irradiaciones mediante termografía.



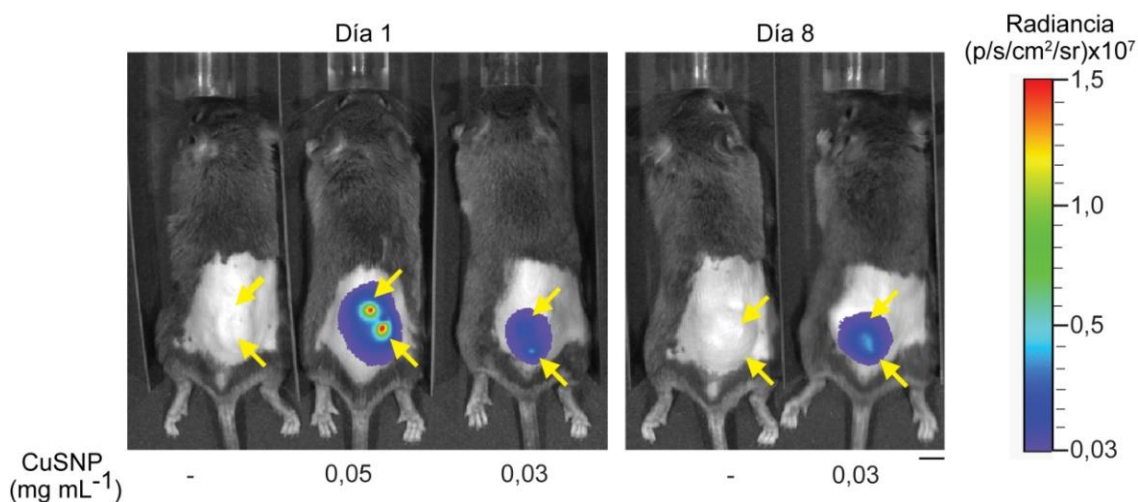
**Figura 23. Expresión transgénica inducida *in vitro* por la actividad fototérmica de hidrogeles de basados en fibrina y NIR-NP.** Las células C3H/10T1/2-fLuc se incluyeron en hidrogeles de fibrina conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o HGNP o desprovistos de NIR-NP (-). (A) Actividad metabólica de células cultivadas durante 7 días en los hidrogeles. La gráfica muestra los valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos en la condición (-), a los que se asignó un valor arbitrario de 100. \*p < 0,05 respecto a la condición (-). (B) Los constructos se cultivaron durante 24 h, se trataron (+) o no (-) con RM y se irradiaron con láser NIR empleando una densidad de potencia de 44 mW mm<sup>-2</sup> durante 10 min. Tras 24 h se tomaron imágenes de bioluminiscencia de la superficie irradiada del hidrogel (vc; vista cenital) y de un lateral (vl; vista lateral). La gráfica muestra los valores promedio + DE de los niveles de radiancia de la luminiscencia inducida en las superficies irradiadas de los hidrogeles.

El análisis de los resultados indicó que la actividad fototérmica de los hidrogeles implantados durante 24 h incrementa en función de la dosis de CuSNP incluida en la matriz. El incremento de temperatura de los hidrogeles conformados con 0,03 mg mL<sup>-1</sup> se mantuvo estable 8 días tras la implantación. Sin embargo, en las zonas implantadas con hidrogeles conformados con 0,05 mg mL<sup>-1</sup> se registró un ligero aumento de la temperatura alcanzada respecto a la que se obtuvo en la primera irradiación NIR. 29 días tras la implantación, el aumento de temperatura generada por irradiación NIR en la superficie de los animales implantados con hidrogeles conformados con 0,05 mg mL<sup>-1</sup> fue un 40 % menor que el observado 8 días tras la implantación. En los animales implantados con hidrogeles conformados con 0,03 mg mL<sup>-1</sup> la temperatura fue aproximadamente un 25 % más alta. En ningún caso se observaron daños en la piel de los animales (Fig. 24).



**Figura 24. Actividad fototérmica de hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** Termografías de animales implantados con hidrogeles conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-), que se irradiaron empleando una densidad de potencia de  $17 \text{ mW mm}^{-2}$  durante los tiempos indicados. La gráfica muestra los valores promedio + DE de los incrementos de la temperatura máxima en la zona irradiada con láser NIR 1, 8 y 29 días tras la implantación. Barra de escala: 1 cm.

A continuación, siguiendo el modelo de implantación descrito arriba, se evaluó la expresión transgénica inducida por láser NIR de células C3H/10T1/2-fLuc incluidas en hidrogeles que contenían CuSNP. 24 h tras la implantación se administró RM a los animales y se irradiaron con láser NIR dos localizaciones independientes de la zona de implantación. Cada localización fue irradiada durante 10 min. Las imágenes de bioluminiscencia tomadas un día después mostraron inducción de la actividad fLuc en las zonas de implantación que habían sido irradiadas con láser NIR. La expresión transgénica aumentó con la concentración de CuSNP presente en los hidrogeles. No se detectó actividad fLuc significativa en los animales que se emplearon como control, cuyos implantes no contenían CuSNP y fueron sometidos al mismo tipo de tratamiento NIR tras administración de RM. El circuito génico pudo ser reinducido una semana después de la primera irradiación, como se observó en animales que albergan implantes conformados con  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP (Fig. 25). En conjunto, estos resultados demuestran que es factible controlar *in vivo* la expresión transgénica inducible por calor y dependiente de RM mediante la irradiación con láser NIR de intermediarios tisulares basados en matrices de fibrina que contienen CuSNP.

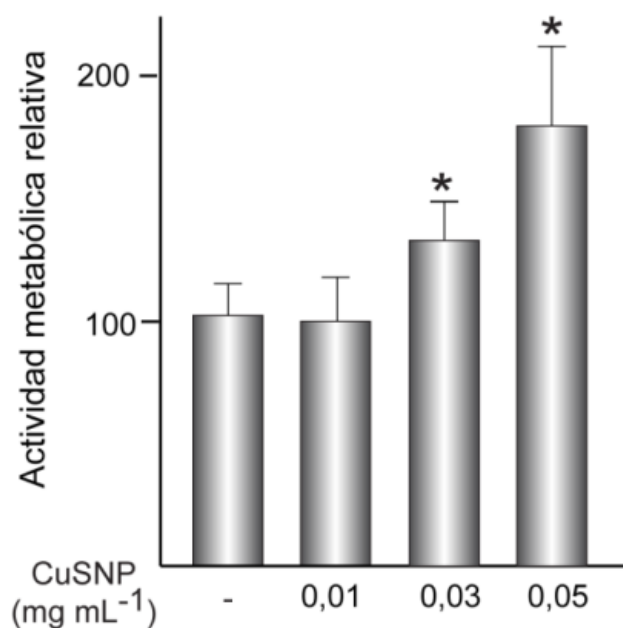


**Figura 25. Expresión transgénica inducida *in vivo* por la actividad fototérmica de hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** Hidrogeles conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-), en los que se incluyeron células C3H/10T1/2-fLuc, se inyectaron en la región dorsal posterior de ratones C3H/HeN. 24 h después de la implantación se administró RM y se llevaron a cabo dos irradiaciones con láser NIR utilizando una densidad de potencia de  $17 \text{ mW mm}^{-2}$ , cada una de 10 min de duración, en localizaciones contiguas de la zona de implantación (panel izquierdo). 7 días después se volvió a administrar RM y se repitió la irradiación en las mismas condiciones (panel derecho). Las flechas señalan las áreas de incidencia del láser NIR. Barra de escala: 1 cm.

### 3.1.3 Bioactividad de matrices fototérmicas basados en fibrina y CuSNP

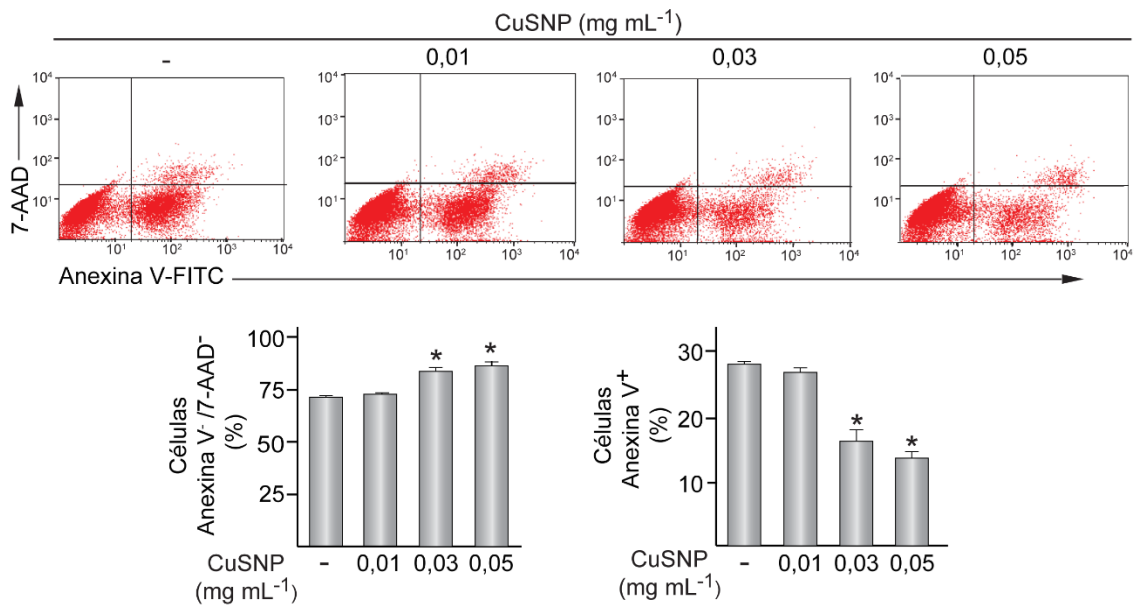
Una vez caracterizada la capacidad de las matrices de fibrina que contienen CuSNP para generar gradientes fototérmicos capaces de inducir la expresión transgénica, exploramos la respuesta biológica a este tipo de matrices. Como se observó en la figura 23 la actividad metabólica de células C3H/10T1/2-fLuc incluidas en hidrogeles que contenían CuSNP incrementó significativamente respecto a la de células incluidas en hidrogeles desprovistos de NIR-NP. Con el objetivo de investigar si este efecto es una particularidad de la línea C3H/10T1/2-fLuc, se conformaron hidrogeles con concentraciones de CuSNP entre  $0,01$  y  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  en los que se incorporaron células troncales multipotentes de origen embrionario C3H/10T1/2 de las cuales deriva el clon C3H/10T1/2-fLuc. Tras 7 días en cultivo, la actividad metabólica de las células incluidas en hidrogeles que conformados con  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  CuSNP fue significativamente mayor que la de células incluidas en hidrogeles carentes de nanotransductor. Este efecto se vio incrementado en hidrogeles conformados con  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP (Fig. 26).





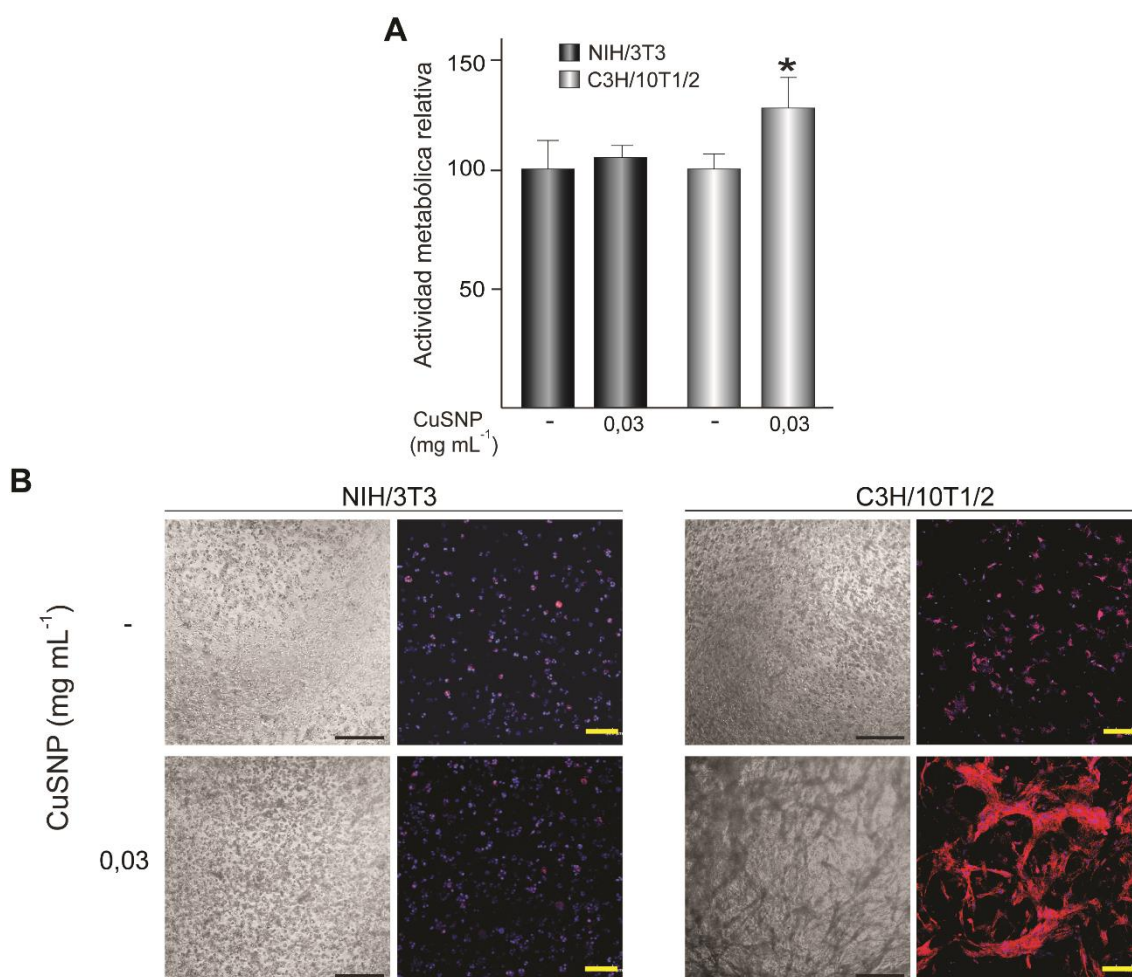
**Figura 26. Actividad metabólica de células C3H/10T1/2 incluidas en hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** Se prepararon hidrogeles de fibrina conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-), que incorporaron células C3H/10T1/2. Se muestra la actividad metabólica tras 7 días en cultivo. Los resultados se expresan como los valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos en la condición (-) a los que se asignó un valor arbitrario de 100. \* $p < 0,05$  comparado con la condición (-).

A continuación se investigó si el incremento en la actividad metabólica de la población celular incluida en los hidrogeles que contenían CuSNP se relacionaba con un aumento neto del número de células viables. Para ello se prepararon hidrogeles conteniendo células C3H/10T1/2 y se cultivaron durante 3 días. Transcurrido este periodo, los constructos se trataron con tripsina con el objetivo de recuperar las células y proceder a su tinción con Anexina V-FITC y 7-AAD. El análisis realizado mediante citometría de flujo indicó que el porcentaje de células viables, negativas simultáneamente para las dos tinciones, aumentaba al incrementar la concentración de CuSNP en el hidrogel (Fig. 27). Por otra parte, se observó que el porcentaje de células positivas para la tinción de Anexina V-FITC, que determina células apoptóticas, fue un 50 % menor en hidrogeles conformados con 0,05 mg mL<sup>-1</sup> CuSNP que en hidrogeles desprovistos de NIR-NP.



**Figura 27. Cuantificación de células apoptóticas incluidas en hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** Las células C3H/10T1/2 cultivadas en hidrogeles de fibrina conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-) se tiñeron con Anexina-V-FITC y 7-AAD. Las gráficas muestran el porcentaje de células viables (Anexina V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup>) (izquierda) y de células apoptóticas (Anexina V<sup>+</sup>) (derecha). Los resultados se expresan como los valores promedio + DE. \*p < 0,05 comparado con la condición (-).

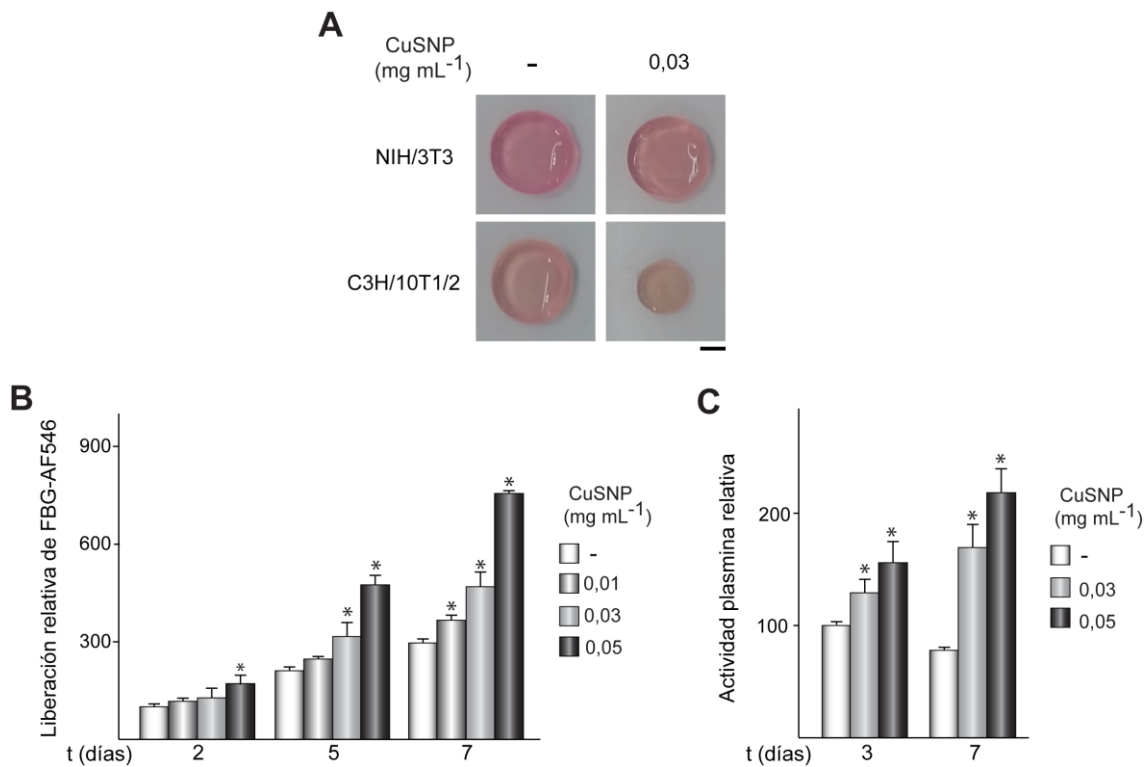
A continuación, se investigó si la actividad metabólica de células diferenciadas a término de origen embrionario, como es el caso de fibroblastos NIH/3T3, experimenta cambios similares a los detectados en células C3H/10T1/2 cuando se incorporan en hidrogeles de fibrina que contienen CuSNP. Tras 7 días en cultivo se observó que los andamios de fibrina cargados con CuSNP no variaban significativamente la actividad metabólica de células NIH/3T3 mientras que se corroboraba que este sustrato promovía el aumento de viabilidad de las células C3H/10T1/2 que se utilizaron como control (Fig. 28A). La visualización de los constructos mediante microscopía óptica mostró que las células C3H/10T1/2 incluidas en hidrogeles que contenían CuSNP adquieren una morfología alargada, efecto que no se observó en células NIH/3T3. Utilizando microscopía confocal se observó que las células C3H/10T1/2 presentan una notable elongación de su citoesqueleto de actina cuando se confinan en matrices de fibrina que contienen CuSNP, efecto que tampoco fue observado en células NIH/3T3 (Fig. 28B).



**Figura 28. Actividad metabólica y morfología de células NIH/3T3 y C3H/10T1/2 incluidas en hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** Las células se cultivaron en hidrogeles de fibrina conformados con 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-). (A) Los resultados se expresan como los valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos en la condición (-) a los que se asignó un valor arbitrario de 100. \* $p < 0,05$  comparado con la condición (-). (B) Imágenes obtenidas por microscopía óptica (columna izquierda) y microscopía confocal (columna derecha) en las que se observan los núcleos celulares en azul y el citoesqueleto de actina en rojo. Barras de escala: 500  $\mu\text{m}$  (microscopía óptica), 100  $\mu\text{m}$  (microscopía confocal).

Se observó que los hidrogeles que contenían CuSNP e incluían células C3H/10T1/2 sufrían una importante reducción de tamaño tras 7 días en cultivo (Fig. 29A), efecto que no se observó en hidrogeles que incorporaban células NIH/3T3. Con el fin de investigar la degradación inducida por las células C3H/10T1/2, se prepararon hidrogeles conformados con CuSNP entre 0,01 y 0,05 mg mL<sup>-1</sup> o que no contenían CuSNP, incluyéndose FBG-AF546 durante la polimerización de los constructos. Se recolectaron alícuotas de los medios de cultivo condicionados por los hidrogeles al cabo de 2, 5 y 7 días en cultivo y se cuantificó su fluorescencia. Tras 2 días, las matrices conformadas con 0,05 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP liberaron una cantidad significativamente mayor de FBG-AF546 que los hidrogeles desprovistos de CuSNP. Se observó que la liberación de FBG-AF546 incrementaba con el tiempo en cultivo y la

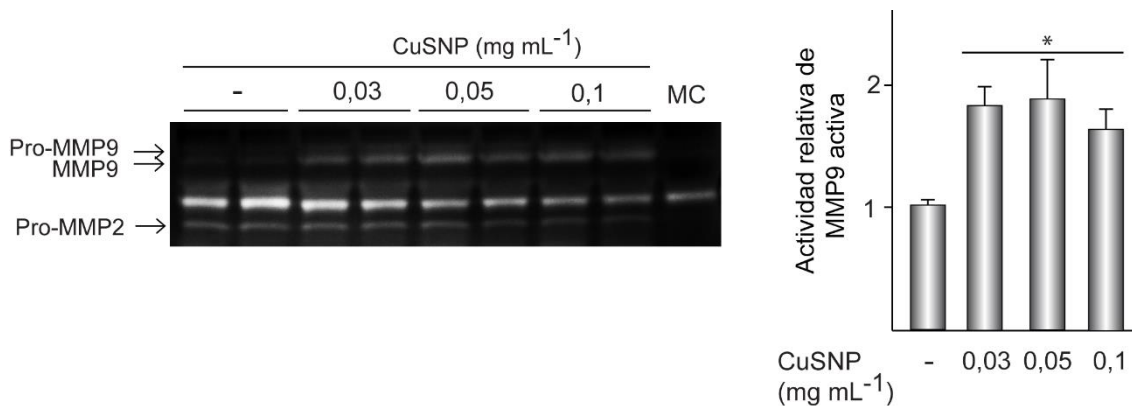
concentración de CuSNP en el hidrogel. (Fig. 29B). A continuación, se cuantificó la actividad plasmina de medios condicionados durante 3 o 7 días por hidrogeles conformados con concentraciones de 0,03 o 0,05 mg/ml de CuSNP junto a células C3H/10T1/2. Los resultados mostraron que los medios condicionados por hidrogeles conteniendo CuSNP presentaban mayor actividad plasmina que aquellos provenientes de hidrogeles que no contenían CuSNP (Fig. 29C). Se observó que la actividad plasmina en los medios condicionados aumentaba con la concentración de CuSNP incluida en el hidrogel.



**Figura 29. Actividad fibrinolítica inducida por hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** (A) Fotografías tras 7 días en cultivo de matrices conformadas con 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP o desprovistas del nanotransductor (-), y que incluyen los tipos celulares indicados. (B) Liberación acumulada de FBG-AF546 a partir de hidrogeles conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-), y que albergaban células C3H/10T1/2 durante los tiempos indicados de cultivo. (C) Hidrólisis de un sustrato sintético de plasmina por medios condicionados durante 3 o 7 días por hidrogeles que contenían CuSNP a las concentraciones indicadas o que no contenían CuSNP (-), y que albergaban células C3H/10T1/2. Los resultados se expresan como valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos en la condición (-) tras 2 días (B) o 3 días (C) de cultivo a los que se asignó un valor arbitrario de 100. \*p < 0,05 comparado la condición (-). Barra de escala: 1 cm.

Se investigó asimismo la actividad de metaloproteasas de matriz (MMP) en los medios condicionados durante 3 días por hidrogeles que contenían CuSNP y que incorporaban células C3H/10T1/2. Los ensayos de zimografía revelaron un aumento de la forma activa de la MMP9 en medios condicionados por hidrogeles que contenían CuSNP en comparación con medios condicionados por hidrogeles que no incluían

CuSNP (Fig. 30). No se observaron diferencias significativas entre los medios procedentes de constructos celulares conformados con concentraciones de CuSNP entre 0,03 y 0,1 mg mL<sup>-1</sup>.



**Figura 30. Caracterización de la actividad proteolítica de hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** Izquierda: zimografía de medios de cultivo condicionados durante 3 días por hidrogeles conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-) y que albergaban células C3H/10T1/2. Como control de la zimografía se empleó medio EMEM-FBS (MC). Derecha: análisis densitométrico de la banda con actividad gelatinolítica correspondiente a la forma activa de MMP9. Los resultados se expresan como los valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos en la condición (-), a los que se asignó un valor arbitrario de 1. \* $p < 0,05$  comparando con la condición (-).

A continuación realizamos un estudio del transcriptoma de células C3H/10T1/2 incluidas en hidrogeles que contenían CuSNP. Mediante tecnología de *microarrays*, se llevó a cabo un análisis comparativo de la expresión génica de células C3H/10T1/2 incluidas durante 3 días en hidrogeles de fibrina conformados en presencia o ausencia de 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP. Detectamos 78 genes codificantes de proteínas cuya expresión aumentaba al menos 1,5 veces en células incorporadas en hidrogeles que contenían CuSNP (Tabla 4).

Nº de identificación de Affymetrix	Niveles relativos de mRNA	Valor p	Nº Acceso a GeneBank	Símbolo del gen	Descripción del gen
17219139	2,551	0	NM_009063	<i>Rgs5</i>	Regulador de la señalización de la proteína G 5
17487211	2,404	0,00003	NM_008036	<i>Fosb</i>	Oncogén B del osteosarcoma FBJ
17266946	2,309	0	NM_013653	<i>Ccl5</i>	Quimiocina (motivo CC) ligando 5
17514515	2,208	0,00001	NM_010809	<i>Mmp3</i>	Metalopeptidasa de matriz 3
17347163	2,179	0	NM_011723	<i>Xdh</i>	Xantina deshidrogenasa Metalopeptidasa de matriz 3
17514482	1,908	0,00009	NM_008607	<i>Mmp13</i>	Inhibidor de peptidasa tipo serina o cisteína, clado A, miembro 3N
17278328	1,867	0,00003	NM_009252	<i>Serpina3n</i>	Desintegrina y metalopeptidasa de dominio 8
17497525	1,862	0,00008	NM_001291066	<i>Adam8</i>	Antígeno 1 ligado a Fos
17356427	1,859	0,00016	NM_010235	<i>Fosl1</i>	cDNA gen RIKEN 2610528A11
17305163	1,838	0,00043	NM_001206684	<i>2610528A11R ik</i>	
17534051	1,829	0	NM_133990	<i>Il13ra1</i>	Receptor de interleucina 13 subunidad alfa 1
17447081	1,828	0,00011	NM_133903	<i>Spon2</i>	Espondina 2, proteína de matriz extracelular
17224180	1,817	0,00001	NM_010518	<i>Igfbp5</i>	Proteína de unión a FC insulínico 5
17363470	1,805	0,00004	NM_010266	<i>Gda</i>	Guanina desaminasa

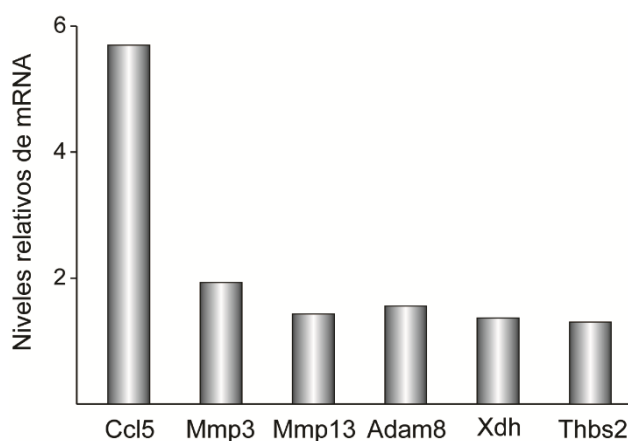
## Resultados

Nº de identificación de Affymetrix	Niveles relativos de mRNA	Valor p	Nº Acceso a GeneBank	Símbolo del gen	Descripción del gen
17260474	1,801	0,00006	NM_008343	<i>Igfbp3</i>	Proteína de unión a FC insulínico 3
17306098	1,784	0,00002	NM_011271	<i>Rnase1</i>	Ribonucleasa de la familia A de RNasa, 1 (pancreática)
17440728	1,782	0,00205	NM_001012726	<i>Aym1</i>	Activador de promotores meióticos de levadura 1
17281084	1,774	0,00025	NM_028133	<i>Egln3</i>	cible por hipoxia 3 de la familia egl-9
17326567	1,77	0,0001	NM_028803	<i>Gbe1</i>	Enzima ramificante de glucógeno
17427970	1,745	0,0001	NM_001285956	<i>Podn</i>	Podocan
17242785	1,744	0,0002	NM_183426	<i>Sbno2</i>	Homólogo 2 de notch strawberry ( <i>Drosophila</i> )
17242232	1,743	0,0002	NM_001109991	<i>Col18a1</i>	Colágeno, tipo XVIII, alfa 1
17305636	1,73	0,00002	NM_015774	<i>Ero1l</i>	Oxidoreductina endoplasmica 1 ( <i>S.cerevisiae</i> )
17439021	1,729	0,00194	NM_007950	<i>Ereg</i>	Epiregulina
17491193	1,718	0,00099	NM_011315	<i>Saa3</i>	Proteína amiloidea sérica 3
17296115	1,71	0,01138	NM_023852	<i>Rab3c</i>	Miembro de la familia del oncogén RAS
17514687	1,682	0,02927	NR_028271	<i>Phxr4</i>	RNA largo no codificante
17458813	1,681	0,00023	NM_007472	<i>Aqp1</i>	Acuaporina 1
17213021	1,675	0,00198	NM_023617	<i>Aox3</i>	Aldehído oxidasa 3
17547719	1,674	0,0004	XM_006516459 ENSMUST0000015 9644	<i>Ahnak2</i>	Nucleoproteína AHNAK 2
17231229	1,673	0,00006		<i>Hsd11b1</i>	11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
17413866	1,667	0,00007	NM_009928	<i>Col15a1</i>	Colágeno, tipo XV, alfa 1
17373530	1,665	0,00007	NM_030725	<i>Syt13</i>	Sinaptotagmina XVIII
17254166	1,657	0,00071	NM_011408 ENSMUST0000010 3376	<i>Sifn2</i>	Schaflien 2
17467513	1,655	0,01893		<i>Igkv7-33</i>	Cadena variable de la inmunoglobulina kappa 7-33
17330135	1,655	0,00017	NM_027342	<i>Fam162a</i>	Miembro A de la familia con semejanza a la secuencia 162
17511731	1,639	0,0001	NM_144930	<i>Ces1f</i>	Carboxilesterasa 1F
17218845	1,639	0,00003	NM_011347	<i>Selp</i>	Selectina de plaquetas
17474785	1,638	0,01168	NM_030736	<i>Vmn1r148</i>	Receptor vomeronasal 1 148
17253707	1,635	0,00089	NM_010927	<i>Nos2</i>	Óxido nítrico sintasa inducible
17236816	1,629	0,00308	NM_008438	<i>Kera</i>	Keratocan
17279277	1,624	0,00035	NM_001081169	<i>Aspg</i>	Homólogo de aspariginasa ( <i>S. cerevisiae</i> )
17502001	1,615	0,00026	NM_020581	<i>Angptl4</i>	Proteína 4 del tipo angiopoyetina
17245923	1,604	0,00057	NM_001286944	<i>Jund</i>	Protooncogén junD
17245923	1,598	0,00029	NM_008512	<i>Lrp1</i>	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 1
17532257	1,591	0,00807	NM_153287	<i>Csrp1</i>	Proteína nuclear 1 rica en cisteína y serina
17414434	1,587	0,00029	NM_011673	<i>Ugcg</i>	UDP-Glucosa glucosilceramida transferasa
17337197	1,585	0,00063	NM_001008424	<i>Cdsn</i>	Corneodesmosina
17241308	1,583	0,00002	NM_197996	<i>Tspan15</i>	Tetraspanina 15
17341080	1,577	0,00012	NM_011581	<i>Thbs2</i>	Tromboespondina 2
17466599	1,575	0,00047	NM_027852	<i>Rarres2</i>	Elementos de respuesta de ácido retinoico (inducible por tazaroteno) 2
17315007	1,575	0,00685	NM_001081471	<i>Mettl7a3</i>	Enzima tipo metiltransferasa 7A3
17373550	1,574	0,00293	NM_001025246	<i>Trp53i11</i>	Proteína inducible 11 relacionada con la transformación de p53
17238762	1,572	0,00018	NM_001079686	<i>Syne1</i>	Envoltura nuclear 1 con repeticiones de espectrina
17271307	1,572	0,00049	NM_013851	<i>Abca8b</i>	Miembro 8B de la subfamilia A (ABC1) de unión a ATP
17225413	1,569	0,00031	NM_001243008	<i>Col6a3</i>	Colágeno, tipo VI, alfa 3
17514495	1,567	0,00023	NM_008605	<i>Mmp12</i>	Metalopeptidasa de matriz 12
17373283	1,564	0,00005	NM_172668	<i>Lrp4</i>	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 4
17431761	1,561	0,00026	NM_028176	<i>Cda</i>	Citidina desaminasa
17548057	1,541	0,01905	AK153754	AA667203	Secuencia expresada AA667203
17368685	1,534	0,00008	NM_001145834	<i>Ralgds</i>	Estimulador de la disociación de nucleótidos de guanina en las proteínas ral
17473423	1,533	0,00004	NM_173008	<i>Ssc5d</i>	Receptor de la proteína scavenger con dominios ricos en cisteína (5 dominios)
17330218	1,529	0,00008	NM_001145899	<i>Slc15a2</i>	Miembro 2 de la familia de transportadores de soluto 15 (H <sup>+</sup> /transportador de péptidos)
17337622	1,528	0,03169	NM_146487	<i>Olf130</i>	Receptor olfativo130

Nº de identificación de Affymetrix	Niveles relativos de mRNA	Valor p	Nº Acceso a GeneBank	Símbolo del gen	Descripción del gen
17478961	1,525	0,00057	NM_001291184	<i>Pcsk6</i>	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 6
17491701	1,525	0,00609	NR_015533	<i>A230057D06</i> <i>Rik</i>	cDNA gen RIKEN A230057D06
17442149	1,525	0,00006	NM_011026	<i>P2rx4</i>	Receptor purinérgico P2X, receptor inotrópico 4
17230045	1,523	0,00046	NM_008329	<i>Ifi204</i>	Gen activado por interferón 204
17356477	1,517	0,00269	NM_001033448	<i>Ap5b1</i>	Subunidad beta 1 relacionado con el adaptador de la proteína compleja 5
17358103	1,517	0,03144	NM_013467	<i>Aldh1a1</i>	Aldehído deshidrogenasa familia 1, subfamilia A1
17520254	1,514	0,00196	NM_001003911	<i>Adams7</i>	Desintegrina y metaloproteasa (tipo repolisina) con motivos de trombospondina tipo 1
17447595	1,511	0,00455	NM_022416	<i>Stk32b</i>	Serina/treonina quinasa 32B
17394694	1,511	0,00006	NM_019835	<i>B4galt5</i>	Polipéptido 5 UDP-Gal: Beta 1-4 galactosiltransferasa
17450142	1,51	0,00004	NM_152803	<i>Hpse</i>	Heparanasa
17291694	1,506	0,00031	NM_025429	<i>Serp1b1a</i>	Inhibidor de peptidasa tipo serina o cisteína, clado
17238558	1,505	0,00008	NM_001164197	<i>Mmp19</i>	Metalopeptidasa de matriz 19
17472443	1,502	0,00012	NM_130861	<i>Slco1a5</i>	Miembro 1a5 de la familia de transportadores de soluto y anión orgánico
17431861	1,5	0,00015	NM_008675	<i>Nbl1</i>	Supresor tumoral de neuroblastoma 1

**Tabla 4.** Genes cuyos niveles de mRNA aumentaron al menos 1,5 veces en células cultivadas durante 3 días en hidrogeles conformados con  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP con respecto a células cultivadas en hidrogeles que no contenían CuSNP.

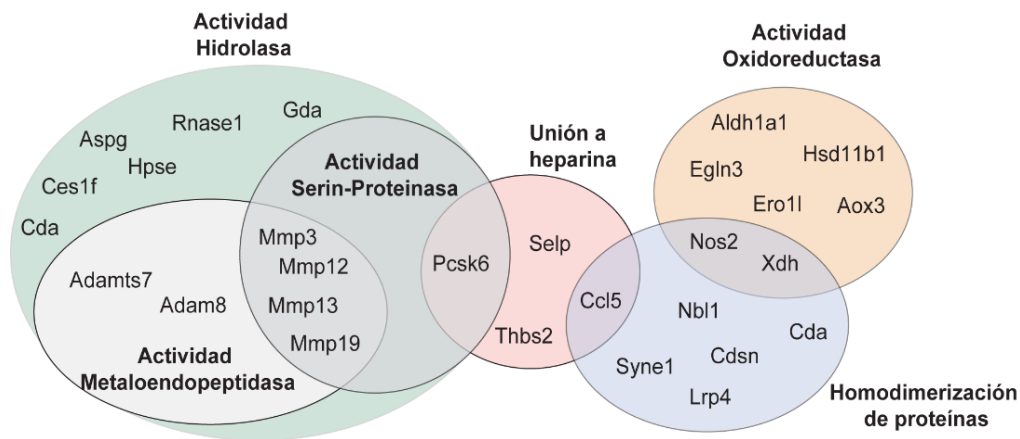
Se llevó a cabo el análisis mediante RTqPCR de cambios en la expresión de 6 genes seleccionados, corroborándose los resultados obtenidos en los experimentos con *microarrays* (Fig. 31).



**Figura 31.** Análisis mediante RTqPCR de cambios de expresión inducida en hidrogeles basados en fibrina y CuSNP. Expresión de los genes *Ccl5*, *Mmp3*, *Mmp13*, *Adam8*, *Xdh*, *Thbs2* en células cultivadas durante 3 días en hidrogeles conformados con  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP con respecto a células cultivadas en hidrogeles que no contenían CuSNP. Los datos son relativos al nivel de cada mRNA en células cultivadas en hidrogeles que no contenían CuSNP a los que se asignó un valor arbitrario de 1.

Los resultados obtenidos del análisis ontológico se sintetizaron en un diagrama de Venn (Fig. 32). La incorporación de CuSNP en las matrices de fibrina incrementa la expresión de genes que codifican para enzimas oxidativas relacionadas con procesos de detoxificación como la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1A1), la aldehído oxidasa 3 (AOX3) y la xantina deshidrogenasa/oxidasa (XDH). Asimismo aumenta la expresión

de genes codificantes para enzimas relacionadas con homeostasis vascular y angiogénesis como la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (NOS2) (Chin y col., 2011). La expresión de *Selp* y *Thbs2* que codifican para las proteínas de unión a heparina P-selectina y tromboespondina 2, respectivamente, está también incrementada, así como la del gen *Ccl5*, que codifica una quimiocina que pertenece al grupo funcional de unión a heparina. El análisis ontológico reveló la inducción de la expresión de genes de MMP como la estromelisina-1 (MMP3), la metaloproteasa de matriz 19 (MMP19), la metaloelastasa de macrófagos (MMP12), la colagenasa 3 (MMP13) y la desintegrina 8 (ADAM8).



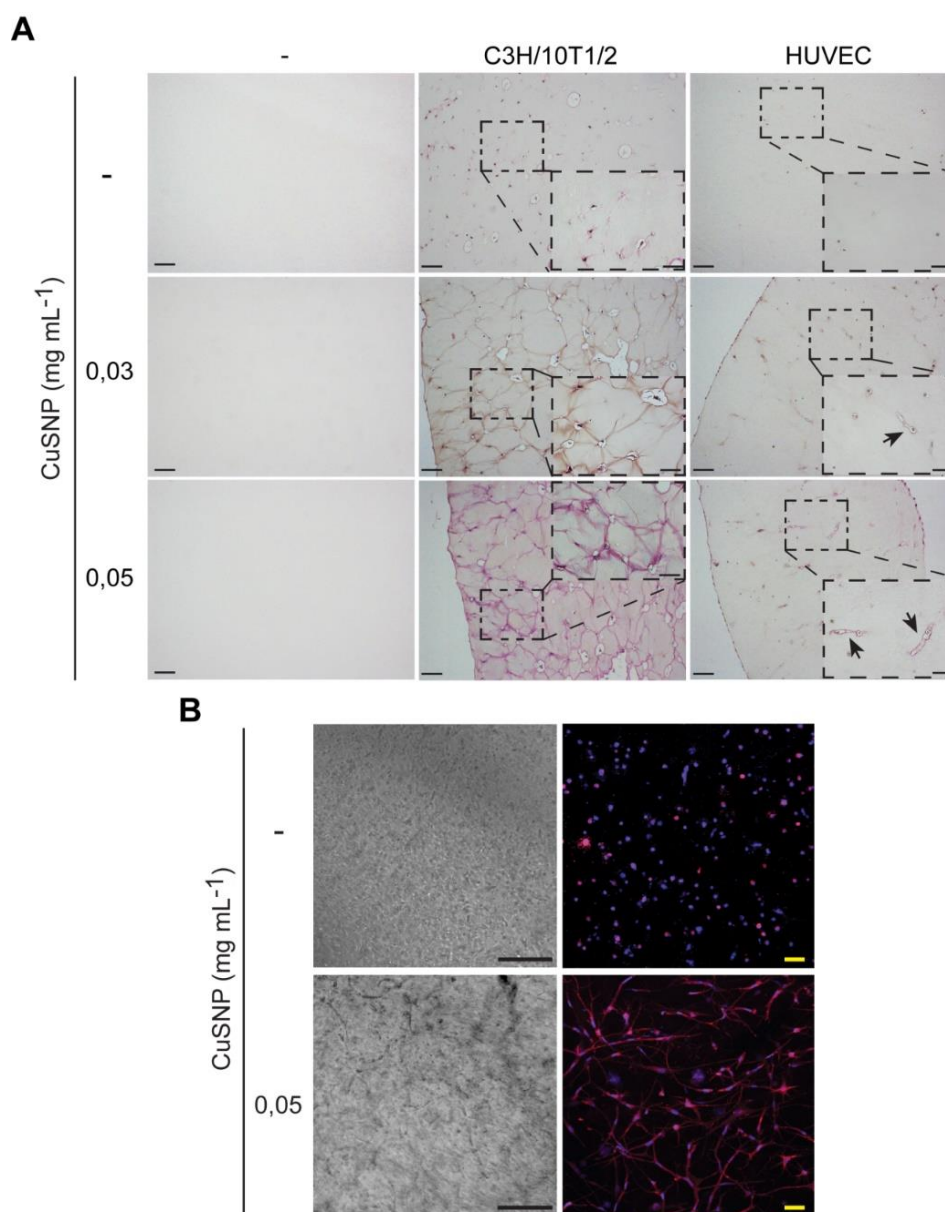
**Figura 32 Análisis ontológico de genes sobreexpresados en células C3H/10T1/2 incluidas en hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** Diagrama de Venn que muestra la clasificación funcional de genes cuyos niveles de mRNA incrementaron en células cultivadas durante 3 días en hidrogeles conformados con  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP con respecto a células cultivadas en hidrogeles que no contenían CuSNP.

### 3.1.4 Actividad angiogénica de matrices fototérmicas basados en fibrina y CuSNP

Como se observa en la figura 28, las células C3H/10T1/2 incluidas en hidrogeles que contenían CuSNP sufren importantes cambios morfológicos. Con el fin de profundizar en el estudio de este efecto, se realizó un análisis histológico de hidrogeles conteniendo o no CuSNP y que incorporaban células C3H/10T1/2. Los datos indicaron que tras 7 días de cultivo en hidrogeles conformados  $0,03$  o  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuSNP, las células experimentaban un elongamiento del soma celular que facilita el establecimiento de conexiones entre las membranas plasmáticas de células próximas (Fig. 33A). Estas estructuras recuerdan a las redes de pseudocapilares que forman las células endoteliales cuando son cultivadas en el interior de matrices de fibrina que favorecen la vasculogénesis (Rao y col., 2012). Por ello, se incluyeron células HUVEC en hidrogeles que contenían o no CuSNP. Las imágenes histológicas (Fig. 33A), así

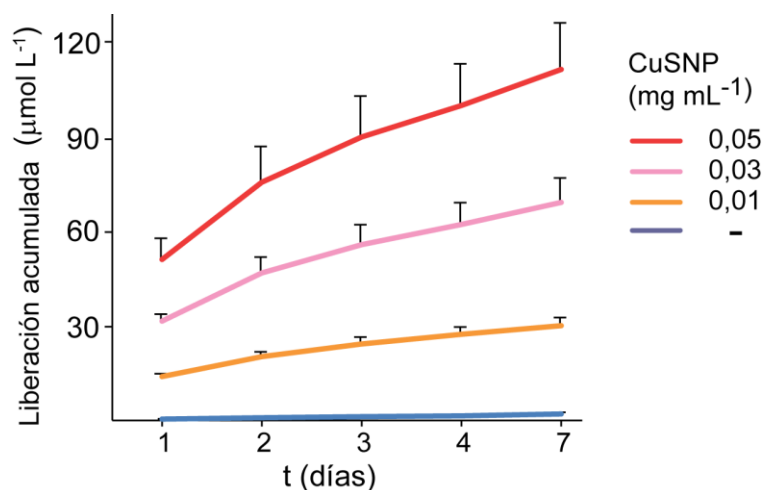


como las obtenidas mediante microscopía confocal (Fig. 33B), mostraron una importante elongación del soma de células endoteliales cuando se incluyeron en hidrogeles de fibrina que incorporan CuSNP. Cabe destacar que la red de estructuras tubulares formada provocó la degradación parcial de la matriz de fibrina que la contiene (Fig. 33A). Estos resultados sugieren que la incorporación de CuSNP en hidrogeles de fibrina disminuye su resistencia a la invasión de células endoteliales.



**Figura 33. Estudio de la morfología de células incluidas en hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** (A) Cortes histológicos de hidrogeles conformados con CuSNP a las concentraciones indicadas o desprovistos de CuSNP (-), y que incluyen células C3H/10T1/2 o HUVEC, tras 7 días en cultivo. Las muestras se sometieron a una tinción con tricrómico de Masson. Las flechas señalan las zonas donde se produce degradación de la matriz mediada por células. (B) Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica (izquierda) y microscopía confocal (derecha) de células HUVEC cultivadas durante 7 días en hidrogeles de fibrina conformados con 0,05 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-). El citoesqueleto de actina se observa en rojo y el núcleo celular en azul. Barras de escala: 50 μm (muestras de microscopía óptica y confocal), 12,5 μm (ampliación de las secciones histológicas).

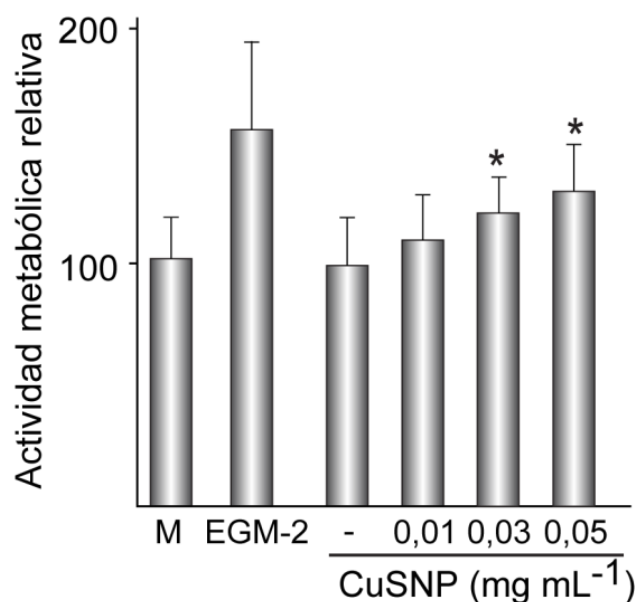
Los resultados anteriores indican que la inclusión de CuSNP en hidrogeles de fibrina estimula la actividad de fenotipos endoteliales. Dado que el papel del Cu como promotor de angiogénesis es conocido desde hace décadas, se consideró la posibilidad de que hidrogeles que contenían CuSNP se comportaran como reservorios desde los cuales se libera Cu iónico. El análisis de medios condicionados por hidrogeles conformados con concentraciones entre 0,01 y 0,05 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP indicó que éstos liberaban Cu iónico de manera continua durante un periodo de observación comprendido entre 1 y 7 días (Fig. 34). Los niveles de dicha liberación fueron proporcionales a las concentraciones iniciales de CuSNP incluidas en las matrices de fibrina.



**Figura 34. Liberación de Cu iónico desde hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** Se determinó la concentración de Cu iónico en medios condicionados por hidrogeles de fibrina conformados en presencia de CuSNP a las concentraciones indicadas o desprovistos de CuSNP (-). La gráfica muestra los valores promedio + DE de los niveles acumulados de Cu iónico a los tiempos indicados de incubación a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>.

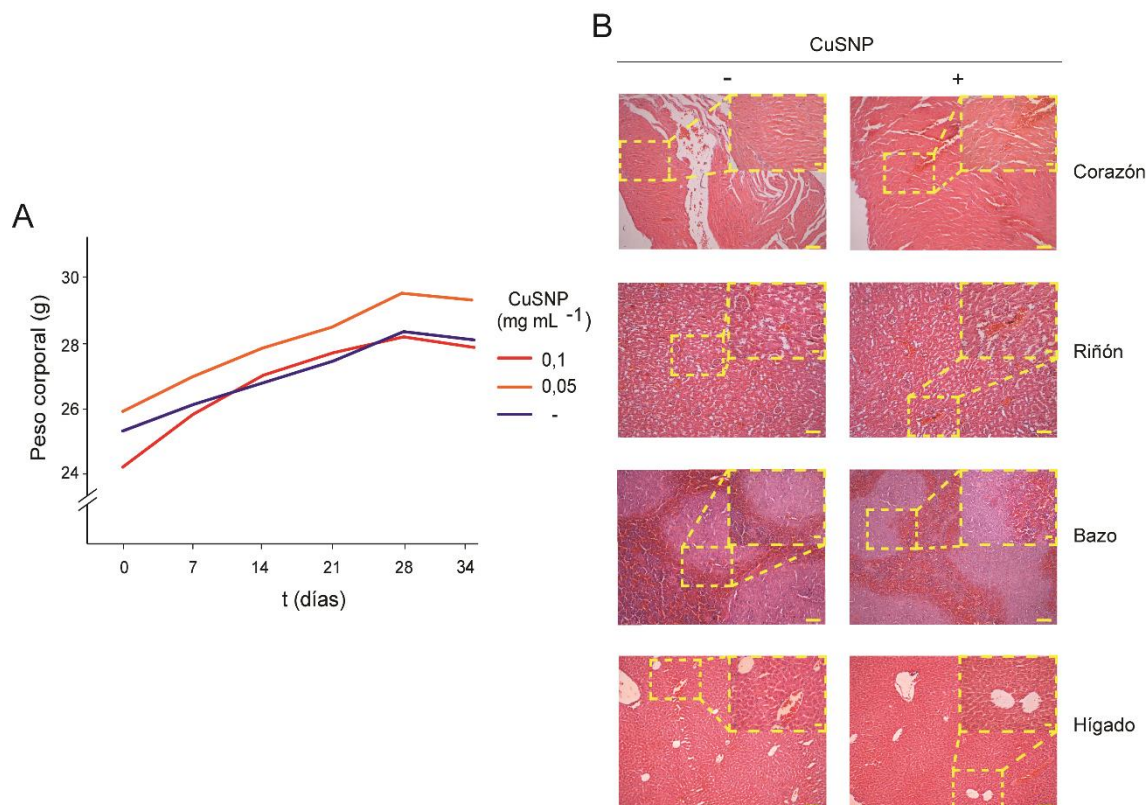
La figura 35 muestra que, la actividad metabólica de células HUVEC sembradas en plástico de cultivo se potenció de forma dependiente de la dosis tras su incubación con medios condicionados provenientes de hidrogeles que contenían CuSNP.

Este fenómeno no se observó cuando las células se trataron con medios condicionados por hidrogeles desprovistos de NIR-NP. Estos resultados sugieren que el Cu iónico liberado a partir de hidrogeles que incluyen CuSNP estimula la viabilidad de células endoteliales.



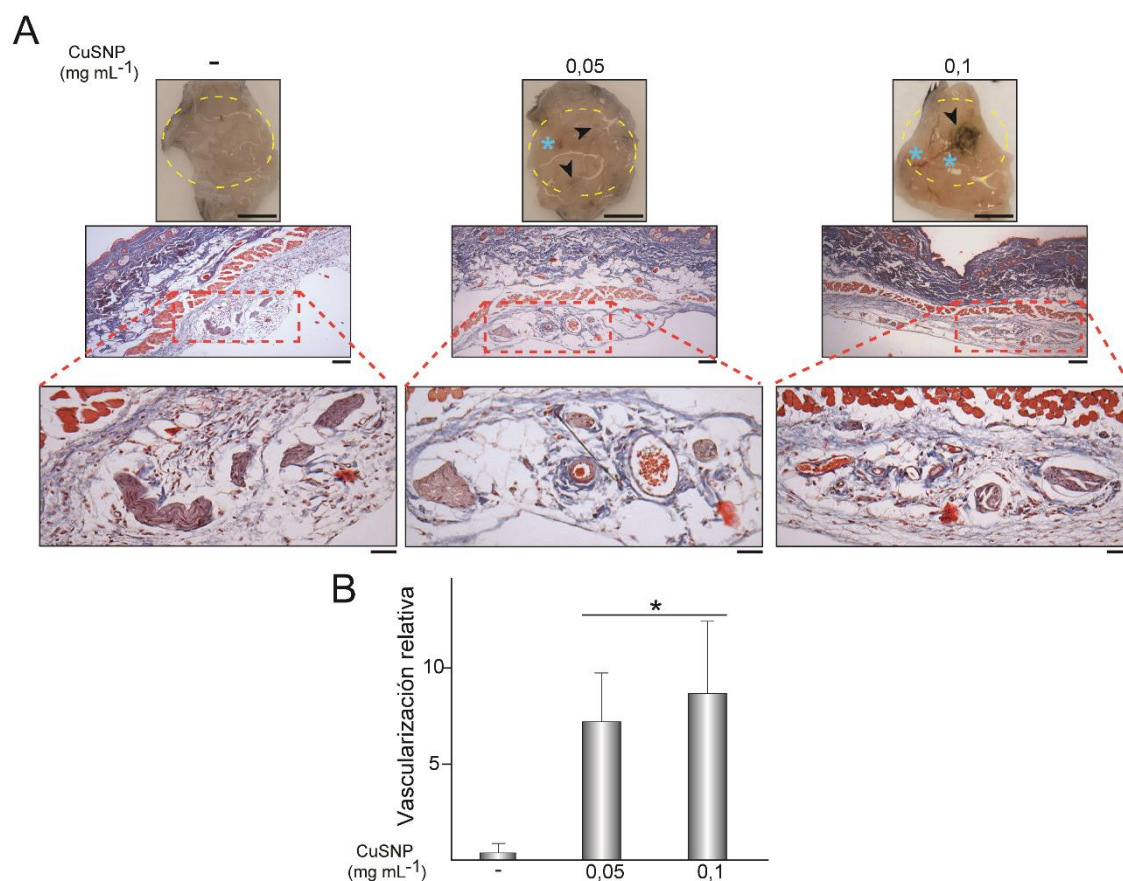
**Figura 35. Efecto del Cu iónico en la viabilidad de células HUVEC.** Las células HUVEC se sembraron a densidad de  $3,2 \times 10^4$  células  $\text{cm}^{-2}$ . Tras 24 h de incubación en medio EGM-2 las células se incubaron durante 24 h con EMEM (M), con medio EGM-2 o con medio EMEM condicionado durante 7 días por hidrogeles de fibrina conformados con CuSNP a las concentraciones indicadas o desprovistos de CuSNP (-). Los resultados se expresan como los valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos en la condición (M) a los que se asignó un valor arbitrario de 100. \* $p < 0,05$  comparado con la condición (-).

Finalmente se investigaron los efectos de la implantación de hidrogeles de fibrina que contienen CuSNP, empleando como control hidrogeles que no incluyen CuSNP. Se inyectaron hidrogeles conformados con concentraciones entre 0,05 y 0,1  $\text{mg mL}^{-1}$  de CuSNP en el espacio subcutáneo de la región dorsal posterior de ratones adultos. Durante el periodo de implantación se monitorizaron posibles efectos adversos sobre la salud de los animales, incluyendo la pérdida de peso. No se observaron diferencias significativas en los valores promedio del peso de los animales entre los grupos en los que se implantaron hidrogeles conteniendo o no CuSNP (Fig. 36A). Al cabo de 34 días, los animales implantados se sacrificaron, recuperándose los implantes y zonas circundantes, así como diferentes órganos vitales. En ningún caso se observaron signos de patología en las muestras de los órganos estudiados (Fig. 36B).



**Figura 36. Evolución del peso corporal y análisis histológico de órganos de ratones implantados con hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** (A) Valores promedio del peso corporal de ratones implantados durante 34 días con hidrogeles conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-). (B) Secciones histológicas de órganos recuperados 34 días tras la implantación de hidrogeles conformados con 0,1 mg mL<sup>-1</sup> de CuSNP (+) o desprovistos de CuSNP (-). Barras de escala: 50  $\mu$ m y 12,5  $\mu$ m (imágenes ampliadas).

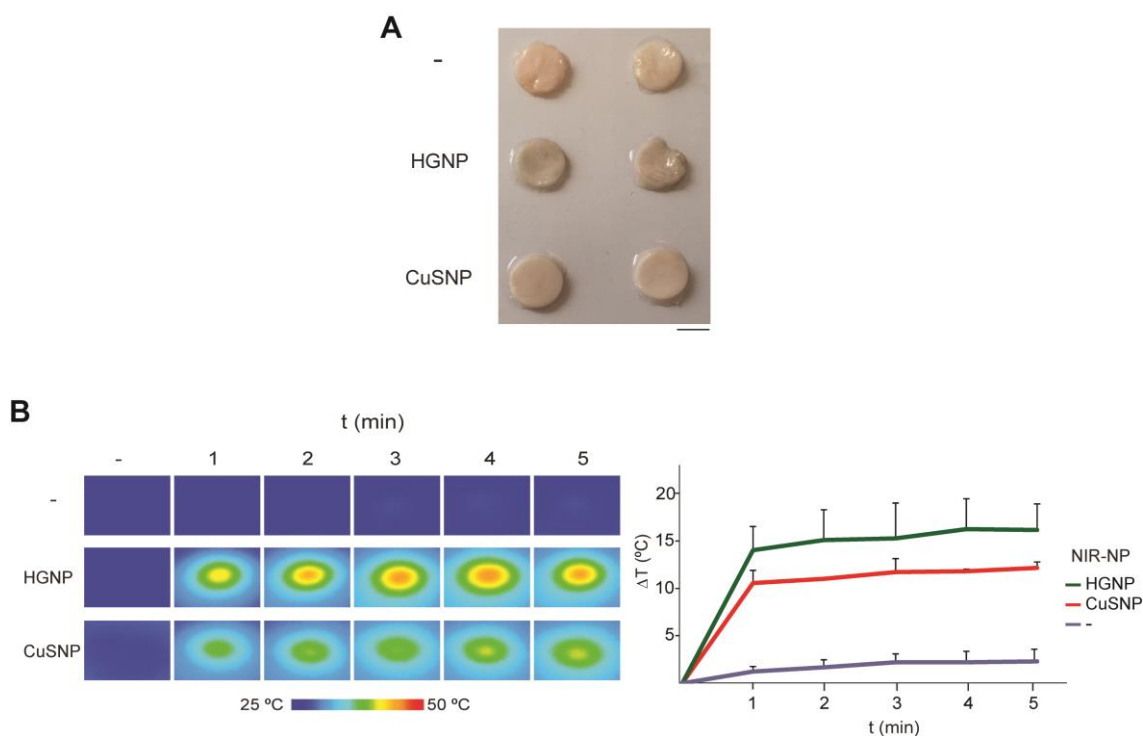
La implantación de hidrogeles conteniendo CuSNP no generó alteraciones visibles en la piel de los animales. La figura 37A muestra la cara interna de la piel bajo la cual se inyectaron los implantes. A pesar de que no se pudieron detectar vestigios de los hidrogeles inyectados, se aprecian diferencias macroscópicas entre las muestras procedentes de animales implantados con hidrogeles que incluyen o no CuSNP. En los primeros, se observaron depósitos residuales de CuSNP en el tejido subcutáneo que había contactado con el hidrogel. Dichas regiones de implantación presentan una red de capilares aumentada, formada en su mayor parte por vasos sanguíneos inmaduros que presentan cierto grado de desorganización estructural. El análisis histológico de la piel confirmó el aumento en la densidad de capilares en la región de implantación en contacto con hidrogeles que contenían CuSNP. Notablemente, en estas muestras se observó un aumento significativo del pániculo adiposo que no pudo ser detectado en los parches cutáneos que proceden de animales implantados con hidrogeles de fibrina que no contenían CuSNP (Fig. 37B).



**Figura 37. Respuesta *in vivo* a la implantación de hidrogeles basados en fibrina y CuSNP.** (A) Panel superior: Fotografías de la cara interna de la piel que cubre la zona de implantación de hidrogeles conformados con las concentraciones indicadas de CuSNP o desprovistos de CuSNP (-), tras 34 días de implantación. Los círculos amarillos muestran la zona de implantación, las puntas de flecha señalan los restos de depósitos de CuSNP y los asteriscos los vasos sanguíneos inmaduros. Panel inferior: Tinción con tricrómico de Masson de cortes histológicos de la piel. (B) El histograma muestra la cuantificación de la vascularización relativa de los cortes histológicos. Barras de escala: 5 mm (fotografías), 50  $\mu$ m (cortes histológicos), 25  $\mu$ m (ampliaciones de los cortes histológicos).

### 3.2 Hidrogeles basados en ELR y NIR-NP

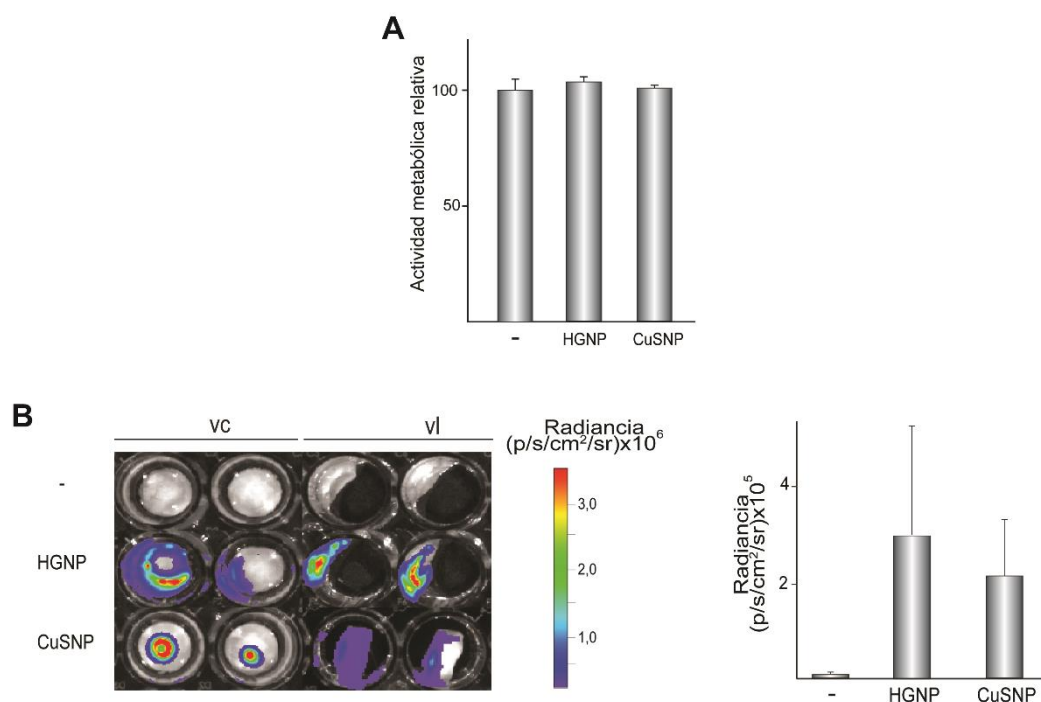
La conformación de los hidrogeles de ELR no se vio afectada por la incorporación de NIR-NP en su composición. Los ELR conteniendo NIR-NP presentaron una morfología similar a la de ELR conformados en su ausencia (Fig. 38A). Tras la irradiación con láser NIR, los ELR que contenían NIR-NP experimentaron un rápido aumento en su temperatura superficial. La temperatura en el punto de incidencia del láser aumentó  $16 \pm 2,7$  °C en ELR conformados con  $0,03$  mg mL<sup>-1</sup> de HGNP y  $12,1 \pm 0,5$  °C en ELR conformados con la misma concentración de CuSNP (Fig. 38B).



**Figura 38. Caracterización de hidrogeles basados en ELR y NIR-NP.** (A) Fotografía de hidrogeles conformados con  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP o de 0 CuSNP o desprovistos de NIR-NP (-). (B) Hidrogeles preparados como en "A" se irradiaron con láser NIR empleando una densidad de potencia de  $44 \text{ mW mm}^{-2}$ . El calentamiento se monitorizó mediante termografía a los tiempos indicados. La gráfica muestra los valores promedio + DE de los incrementos de la temperatura máxima durante la irradiación con láser NIR. Barra de escala: 0,5 cm.

### 3.2.1 Intermediarios tisulares basados en matrices fototérmicas de ELR para el control de la expresión transgénica

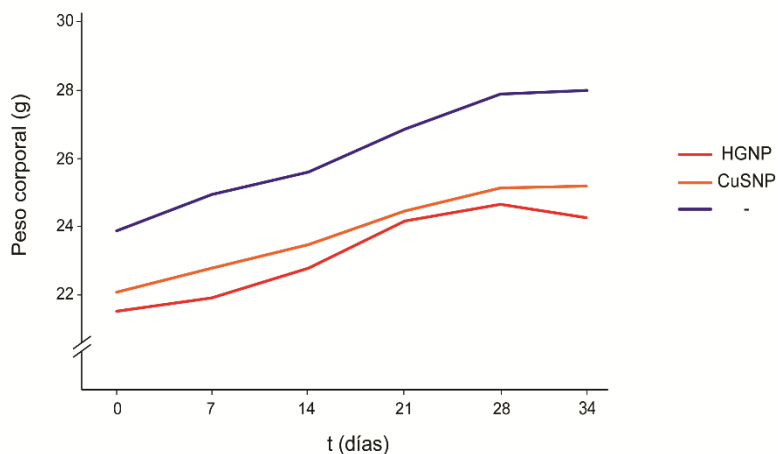
Una vez observado que tras su irradiación con láser NIR es posible incrementar la temperatura de hidrogeles basados en ELR que contienen HGNP o CuSNP, se determinó si dicho incremento podría activar la expresión transgénica de células C3H/10T1/2-fLuc cultivadas en estos materiales. En primer lugar se evaluó la actividad metabólica de dichas células tras ser cultivadas durante 7 días en hidrogeles conformados con  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP o CuSNP, utilizando como control hidrogeles que no incluían NIR-NP (Fig. 39A). Los resultados indicaron que la incorporación de NIR-NP no afecta significativamente a la viabilidad celular. La irradiación con láser NIR en presencia de RM de los hidrogeles que conformados con  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP o CuSNP indujo la expresión robusta del gen testigo fLuc, como indicaron los ensayos de bioluminiscencia (Fig. 39B). La actividad fLuc se expande a partir del punto de incidencia del láser, propagándose a lo largo del eje Z del constructo (Fig. 39B). No se detectó actividad fLuc en ELR desprovistos de NIR-NP irradiados en presencia de RM.



**Figura 39. Expresión transgénica inducida *in vitro* por la actividad fototérmica de matrices basadas en ELR que contienen NIR-NP.** Las células C3H/10T1/2-*fluc* se incluyeron en hidrogeles conformados en ausencia (-) o presencia de 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de HGNP o CuSNP (A) Actividad metabólica tras 7 días en cultivo. Los resultados se expresan como los valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos en la condición (-) a los que se asignó un valor arbitrario de 100. (B) Los constructos se cultivaron durante 24 h, se trataron con RM y se irradiaron con láser NIR empleando una densidad de potencia de 44 mW mm<sup>-2</sup> durante 10 min. Tras 24 h se tomaron imágenes de bioluminiscencia de la superficie irradiada del hidrogel (vc; vista cenital) y de un lateral (vl; vista lateral). La gráfica muestra los valores promedio + DE de los niveles de radjanca de la luminiscencia inducida en las superficies irradiadas de los hidrogeles.

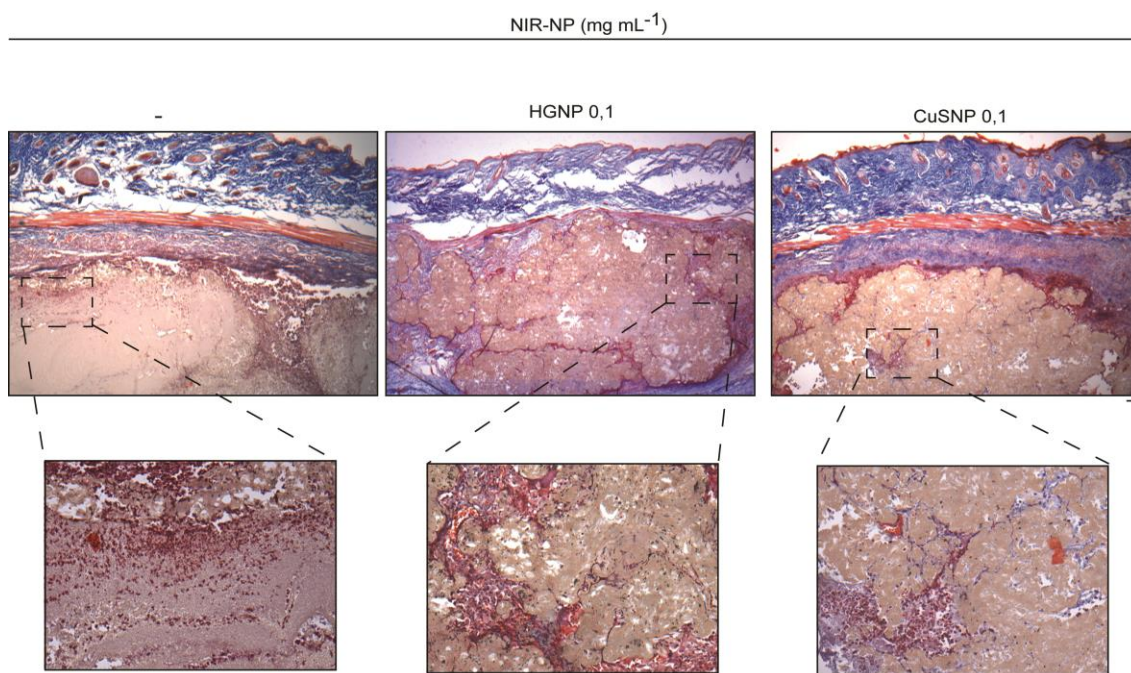
### 3.2.2 Implantación de matrices fototérmicas basadas en ELR y NIR-NP

Con el fin de evaluar los efectos biológicos de la implantación de hidrogeles basados en ELR que contienen NIR-NP, éstos se inyectaron en el espacio subcutáneo de la región dorsal posterior de ratones C3H/HeN, para proceder a su polimerización *in situ*. Tras 34 días se recuperaron los implantes, así como los tejidos circundantes y se realizó el análisis histológico de las muestras. Se observó que la implantación de los hidrogeles no genera alteraciones visibles en la piel de los animales, independientemente de la presencia de NIR-NP en la matriz polimérica. Durante este periodo no se observó pérdida de peso en los animales implantados (Fig. 40).



**Figura 40. Evolución del peso corporal de los ratones implantados con matrices basadas en ELR y NIR-NP.** Valores promedio del peso corporal de los ratones implantados durante 34 días con hidrogeles conformados con  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP o CuSNP o que no incluían NIR-NP (-).

El análisis histológico mostró la formación de una cápsula de tejido conjuntivo alrededor de los hidrogeles implantados con una importante infiltración de células mononucleares y presencia de capilares sanguíneos en el interior del implante (Fig. 41) Lo que demuestra cierta degradación del material.

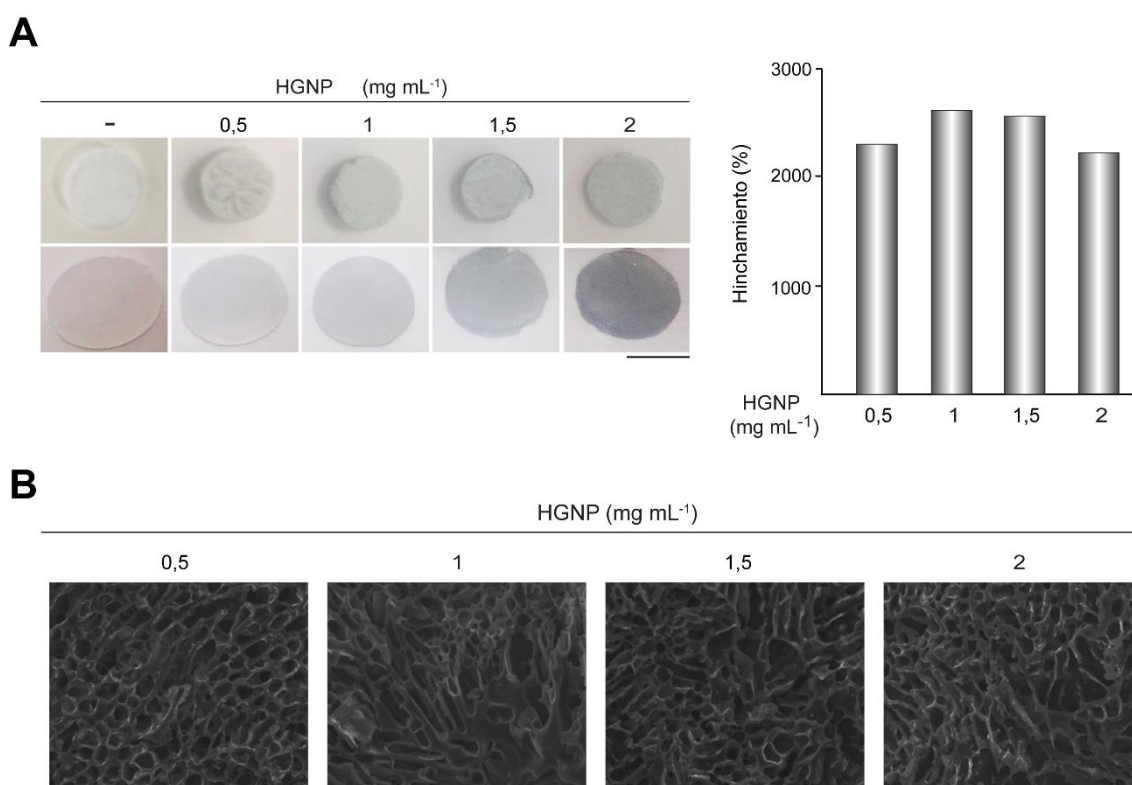


**Figura 41. Respuesta *in vivo* a implantación de matrices basadas en ELR y NIR-NP.** Tinción con tricrómico de Masson de cortes histológicos de la zona de implantación de hidrogeles conformados con  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP o de CuSNP o desprovistos de NIR-NP (-). Barras de escala:  $50 \mu\text{m}$ ,  $12,5 \mu\text{m}$  (ampliaciones).



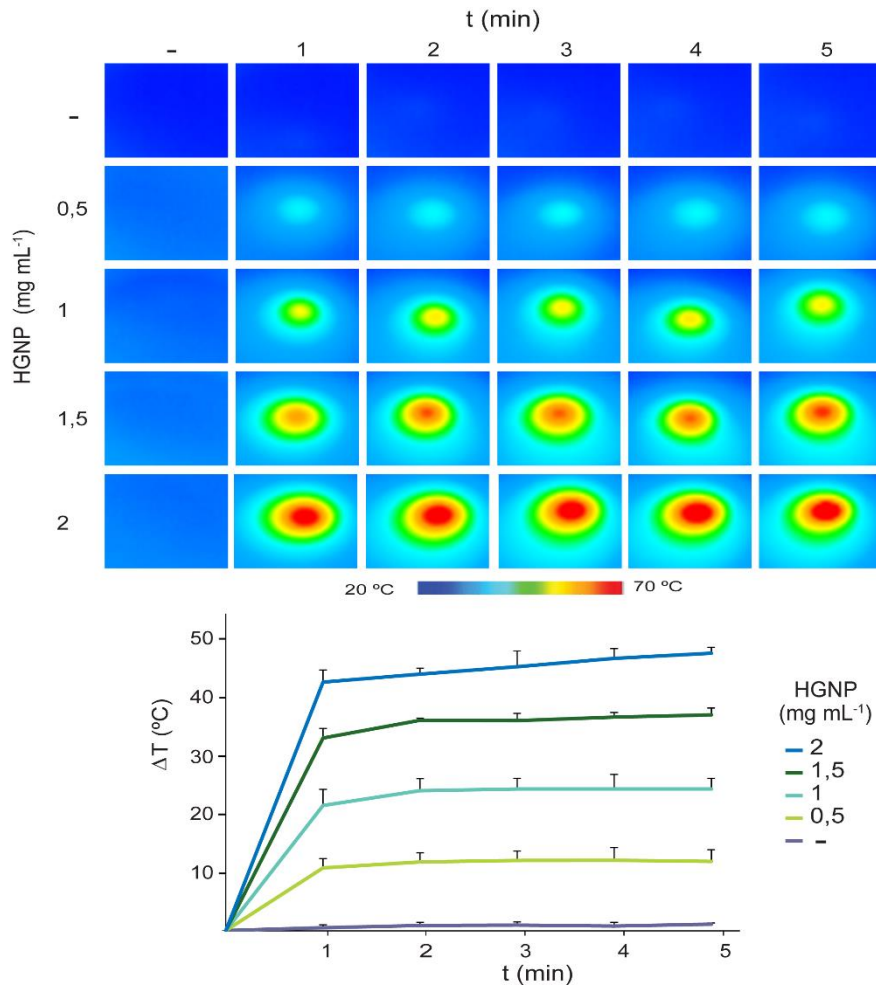
### 3.3 Criogeles basados en HEMA:AA y HGNP

Previamente a su utilización, el material copolimerizado se sometió a hidratación con DMEM-FBS, lo que provocó un aumento significativo del tamaño de las matrices. Dicho aumento no se vio afectado por la inclusión de HGNP en el material (Fig. 42A). La microarquitectura de las matrices, determinada mediante SEM, se caracteriza por presentar una alta densidad de poros (Fig. 42B).



**Figura 42. Caracterización de criogeles basados en HEMA:AA y HGNP.** (A) Fotografías de los criogeles conformados con las concentraciones indicadas de HGNP o desprovistos de HGNP (-) antes (arriba) y después (abajo) de ser hidratados con DMEM-FBS. La gráfica muestra el porcentaje de hinchamiento de los criogeles tras la hidratación. (B) Imágenes obtenidas mediante SEM de los criogeles. Barras de escala: (A): 0,5 cm, (B): 50  $\mu$ m.

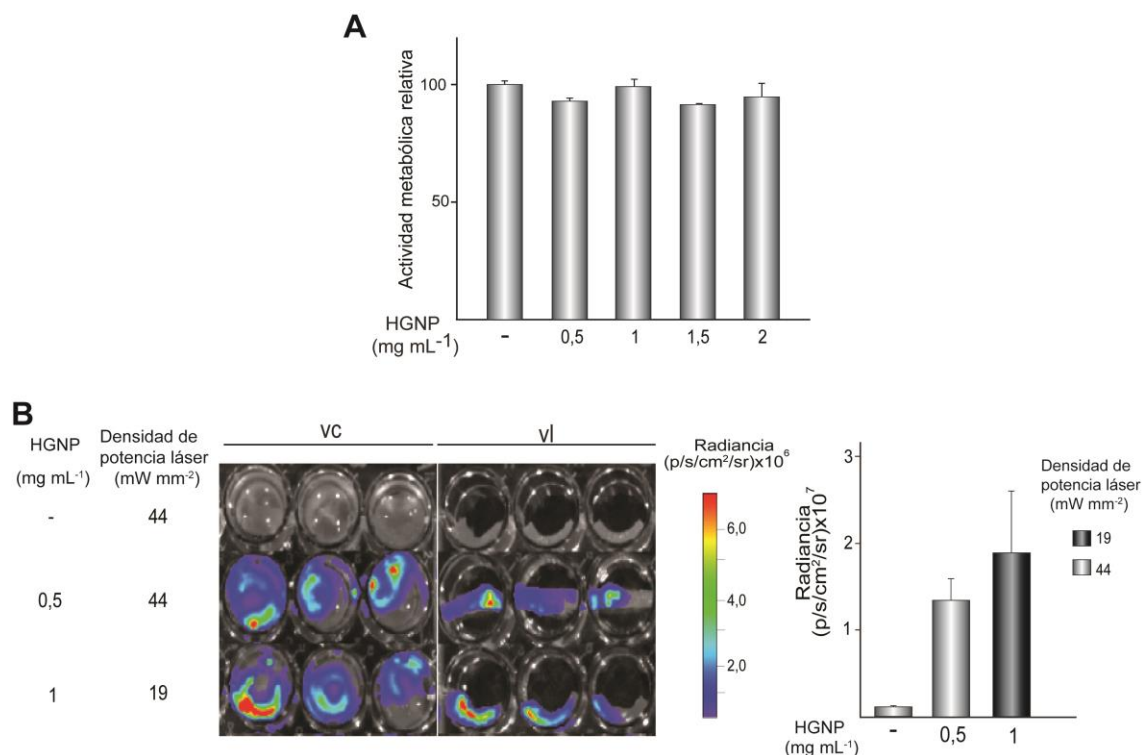
A continuación se caracterizó la capacidad fototérmica de los criogeles. Para ello se irradió la superficie del material con láser NIR durante 5 min, empleando una densidad de potencia de  $44 \text{ mW mm}^{-2}$  y tomándose termografías cada 60 s. Los criogeles que contenían HGNP experimentaron un rápido aumento de temperatura que resultó proporcional a la concentración de HGNP. La temperatura superficial en el punto de incidencia del láser aumentó  $11,5 \pm 1,9 \text{ }^\circ\text{C}$  en los criogeles conformados con  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP, mientras que en los se conformaron con  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  el aumento fue de  $46,3 \pm 0,9 \text{ }^\circ\text{C}$  (Fig. 43).



**Figura 43. Actividad fototérmica de criogel basados en HEMA:AA y HGNP.** Los criogel conformados con las concentraciones indicadas de HGNP o desprovistos de HGNP (-) se irradiaron con láser NIR empleando una densidad de potencia de  $44 \text{ mW mm}^{-2}$ . El calentamiento se monitorizó mediante termografía a los tiempos indicados. La gráfica muestra los valores promedio + DE de los incrementos de la temperatura máxima durante la irradiación con láser NIR.

### 3.3.1 Intermediarios tisulares basados en criogel de HEMA:AA fototérmicos para el control de la expresión transgénica

Una vez observado que es posible incrementar la temperatura de criogel que contienen HGNP tras su irradiación con láser NIR, se determinó si dicho incremento era suficiente para activar la expresión transgénica en células C3H/10T1/2-fLuc cultivadas en estos materiales. En primer lugar se evaluó la actividad metabólica de dichas células tras ser cultivadas durante 9 días en criogel conformados con HGNP en un rango de concentraciones entre  $0,5$  y  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  o que no incluían HGNP. Los resultados indicaron que la inclusión de HGNP en los criogel no afecta de manera significativa a la viabilidad celular (Fig. 44A). La irradiación con láser NIR en presencia de RM de criogel conformados con  $0,5$  o  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP indujo una expresión robusta de fLuc. Se observó que la actividad fLuc se expande a partir del punto de incidencia del láser, propagándose a lo largo del eje Z del constructo (Fig. 44B).

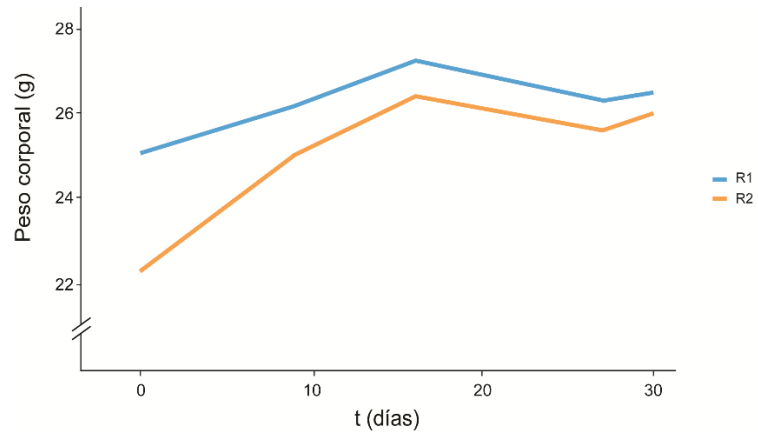


**Figura 44. Expresión transgénica inducida *in vitro* por la actividad fototérmica de criogel basados en HEMA:AA y HGNP.** Las células C3H/10T1/2-fLuc se sembraron sobre criogel conformados con HGNP a las concentraciones indicadas o desprovistos de HGNP (-). (A) Actividad metabólica de las células tras 9 días en cultivo. Los resultados se expresan como los valores promedio + DE y son relativos a los datos obtenidos en la condición (-) a los que se asignó un valor arbitrario de 100. (B) Los constructos se cultivaron durante 7 días, se trataron con RM y se irradiaron durante 10 min con láser NIR empleando las densidades de potencia indicadas. Tras 24 h se tomaron imágenes de bioluminiscencia de la superficie irradiada del hidrogel (vc; vista cenital) y de un lateral (vi; vista lateral). La gráfica muestra los valores promedio + DE de los niveles de radiancia de la luminiscencia inducida en las superficies irradiadas de los criogel.

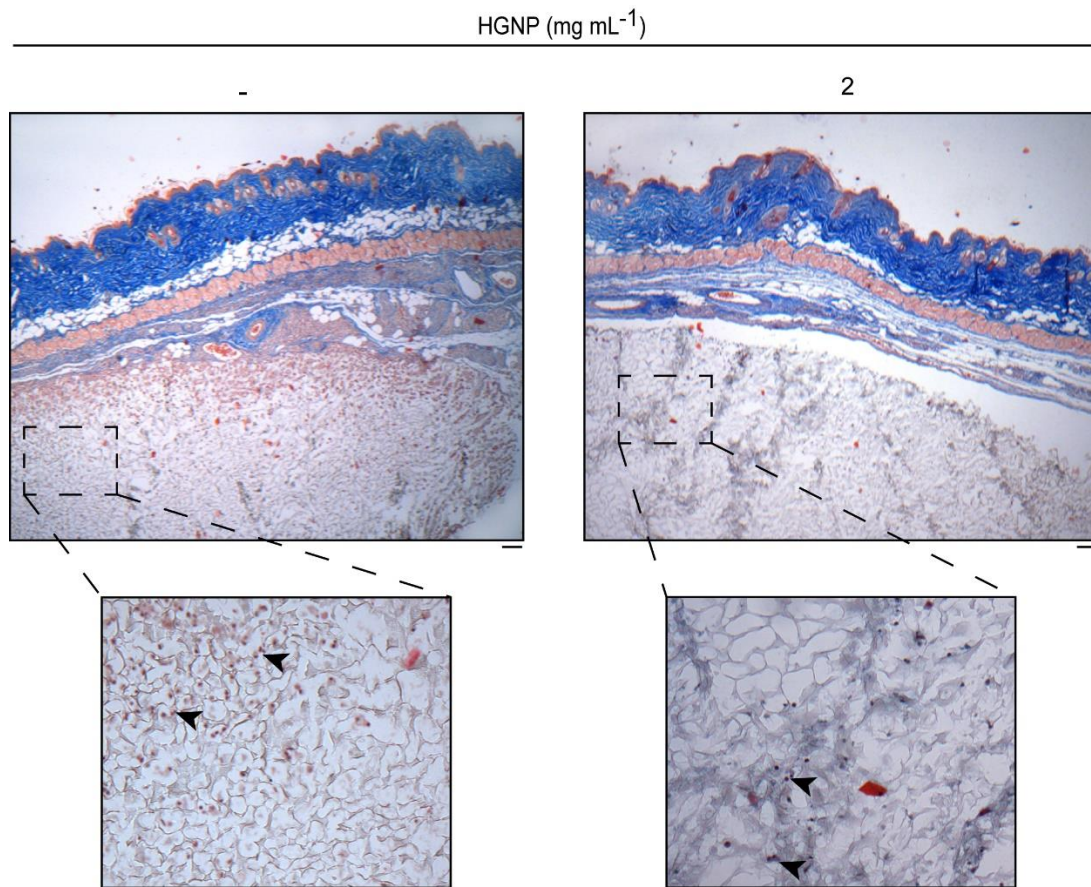
### 3.3.2 Implantación de criogel fototérmicos basados en HEMA:AA y HGNP

Con el fin de evaluar la biocompatibilidad de los criogel que contienen HGNP, éstos se implantaron en el espacio subcutáneo de la región dorsal posterior de ratones C3H/HeN. Tras 30 días se recuperaron los implantes, así como los tejidos circundantes y se realizó el análisis histológico de las muestras. La implantación de criogel no generó alteraciones visibles en la piel ni afectó al peso de los animales. (Fig. 45).

Independientemente de la incorporación de HGNP en los criogel, no se pudieron apreciar signos que evidenciaran su degradación tras la implantación. Se observó la formación de una cápsula de tejido conjuntivo alrededor de los constructos implantados y una patente infiltración de células mononucleares en las regiones más externas del implante. Las muestras que contenían HGNP mostraron zonas de color más oscuro, con una distribución heterogénea que indican zonas con una mayor concentración de agregados del nanotransductor (Fig. 46).



**Figura 45. Evolución del peso corporal de los ratones implantados con criogeles basados en HEMA:AA y HGNP.** Valores del peso corporal a los tiempos indicados de dos ratones (R1 y R2) implantados durante 30 días con dos criogeles, uno conformado con  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP y otro desprovisto HGNP.



**Figura 46. Respuesta *in vivo* a la implantación de criogeles basados en HEMA:AA y HGNP.** Tinción con tricrómico de Masson de cortes histológicos correspondientes a la zona de implantación de criogeles conformados con  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP o desprovistos de HGNP (-). Las puntas de flecha señalan infiltrados de células del hospedador. Barras de escala:  $50 \mu\text{m}$ ,  $12,5 \mu\text{m}$  (ampliaciones).

## **DISCUSIÓN**

---

En las últimas décadas los polímeros han jugado un papel crucial en el desarrollo de sistemas de liberación de agentes terapéuticos que persiguen controlar su liberación en dosis constantes durante largos periodos de tiempo, establecer patrones de dosificación cíclica y, en general, optimizar la liberación de los agentes cargados en función de su carácter hidrofílico o hidrofóbico. Actualmente en el campo de la liberación controlada existe un gran interés en diseñar polímeros a medida para incorporar un cargo específico y que además sean capaces de ejercer distintas funciones biológicas. Idealmente, estos polímeros deben poder implantarse como reservorios que posibiliten definir una ventana espaciotemporal de liberación de agentes terapéuticos con un régimen de administración pulsátil. A pesar de que las formulaciones farmacológicas clásicas han contribuido de manera determinante en el tratamiento de enfermedades, la emergencia de nuevos agentes terapéuticos biotecnológicos ha impulsado el desarrollo de sistemas de liberación “inteligentes”, si bien su implementación clínica está condicionada a la superación de numerosos obstáculos, relacionados con la liberación específica del agente terapéutico, el transporte intracelular o la biocompatibilidad.

Los polímeros “inteligentes”, capaces de responder a su entorno, son una clase de materiales que comprenden una gran variedad de polímeros lineales o ramificados o bien redes de polímeros entrecruzados (Altomare y col., 2018). Una característica fundamental de estos materiales es que tienen la capacidad de sufrir un cambio dramático a nivel físico o químico en respuesta a un estímulo externo. Frecuentemente, se usan cambios de temperatura y pH para disparar sus cambios de comportamiento, aunque estímulos alternativos como ultrasonidos, fuerza iónica, potencial redox, radiación electromagnética y agentes fisicoquímicos cobran una relevancia creciente. Estos estímulos se clasifican por su naturaleza, siendo los estímulos físicos (p. ej., temperatura, ultrasonidos, luz y campos magnéticos y eléctricos) los que modulan directamente el nivel de energía del polímero e inducen una respuesta del material. Nuestro grupo de investigación había generado con anterioridad hidrogeles “inteligentes” de fibrina que, mediante la incorporación de HGNP, eran capaces de responder a la energía NIR incidente generando un aumento local de la temperatura (Martín-Saavedra y col., 2014). La fibrina, biodegradable y bioerosionable, se revela como un sistema atractivo sobre el que la hipertermia generada mediante irradiación NIR puede ser utilizada como fuente de estimulación de sistemas de liberación controlada de agentes terapéuticos. La inclusión en este material de células capaces de responder a un estímulo térmico a través de la sobreexpresión de un transgén permite asimismo la generación de sistemas para la liberación controlada de proteínas solubles terapéuticas.

## 1. LIBERACIÓN CONTROLADA DE AGENTES TERAPEÚTICOS MEDIANTE LIPOGELES FOTOTÉRMICOS.

En el presente estudio hemos abordado el desarrollo de un nuevo sistema capaz de liberar agentes terapéuticos bajo demanda, como respuesta a una estimulación con láser NIR. Este sistema de liberación controlada consta de varios elementos: LSTL que contienen el agente terapéutico y evitan la liberación fortuita del mismo; HGNP o CuSNP, que transducen en calor la energía NIR aplicada localmente mediante láser y, finalmente, el polímero de fibrina que constituye la matriz que sustenta los componentes descritos. Dicha matriz tiene como objetivo final procurar la proximidad entre los elementos descritos en un espacio susceptible de ser iluminado con láser NIR. Este sistema de liberación de agentes terapéuticos se constituye durante el proceso de polimerización del fibrinógeno al incorporar simultáneamente LTSL y NIR-NP para obtener lipogeles que inmovilizan el componente liposomal y son capaces de convertir la energía NIR incidente en calor.

Para la caracterización del sistema de liberación, se han empleado LTSL que incluyen DOX como molécula modelo de agente terapéutico. La composición liposomal empleada para conformar los LTSL-DOX consistió en DPPC como componente principal; MSPC, un lisolípido que responde a un aumento de temperatura, aumentando la permeabilidad de la membrana a moléculas pequeñas y DSP-PEG2000 que proporciona un efecto estabilizador entre las distintas fases (Papahadjopoulos y col., 1973) y aporta estabilidad estérica cuando los lisolípidos inducen la permeabilización de la membrana en respuesta a calor permitiendo una rápida liberación del fármaco (Needham y col., 2013).

La temperatura de transición de LTSL-DOX en solución acuosa es de 40,5 °C. Tras el tratamiento en un baño a 42 °C durante 1 min se libera el 50 % de su contenido. Esta respuesta a temperatura es similar la que mostraron formulaciones de LTSL-DOX que incorporan el lisolípido 1-palmitoil-2-hidroxil-sn-glicero-3-fosfocolina (MPPC) (Needham y col., 2000; Gaber y col., 1996) y contrasta con la lenta liberación obtenida con formulaciones clásicas de LTS que incorporan fosfatidilcolina de soja hidrogenada y requieren 30 min de calentamiento a 42 °C para liberar el 40 % de la DOX incorporada (Needham y col., 2000). La encapsulación de LTSL-DOX en matrices de fibrina reduce la capacidad de la formulación para liberar DOX en respuesta a un tratamiento térmico. Independientemente de la incorporación de NIR-NP incluidas en estas matrices y de su concentración, los lipogeles liberaron el 30 % del contenido total de DOX tras un tratamiento térmico de 1 h en baño termostático a 42 °C. Cuando se focalizó el láser NIR sobre una región concreta de los lipogeles durante 10 min, se produjo una rápida descarga de fármaco circunscrita a la región

concéntrica al punto de incidencia del láser. Mientras que la cantidad de fármaco liberado fue similar tras la irradiación NIR o el tratamiento térmico en baño, la liberación de fármaco tras aplicar una fuente de calor no localizada sobre los lipogeles no se circunscribió a una región concreta, sino que ocurrió de manera generalizada en todo el lipogel.

Con el objetivo de comprobar la bioactividad del fármaco liberado, se trataron células HeLa con el medio condicionado por lipogeles estimulados con láser NIR. La aplicación de una única irradiación de 10 min de duración a una potencia de 44 mW mm<sup>-2</sup> sobre lipogeles conformados con 0,03 mg mL<sup>-1</sup> de HGNP liberó una cantidad de DOX capaz de reducir diez veces la actividad metabólica de células tumorales tratadas. El efecto del fármaco liberado de este modo es similar a la del fármaco liberado a partir de lipogeles que no contienen NIR-NP tras tratamiento en baño durante 1 h a 42 °C, lo que indica que la bioactividad del cargo liposomal no se ve afectada por la irradiación NIR. Hemos observado que modulando la concentración de HGNP incorporadas a los lipogeles o la intensidad de la energía NIR aplicada, se pueden obtener diferentes perfiles de temperatura para regular de forma precisa la liberación de la DOX cargada. Asimismo, se puede modular el número de irradiaciones y la duración de éstas con el fin de controlar la concentración final de agente terapéutico liberado desde los lipogeles. Por otra parte, la irradiación secuencial de los lipogeles en localizaciones espaciales solapadas permite también establecer un control sobre la cantidad de agente liberado, sin redundar en cambios significativos de la estructura del hidrogel.

La tasa de liberación de un fármaco condiciona la capacidad terapéutica de cualquier sistema de liberación. La dosis de fármaco debe alcanzar ciertos niveles para poder tener efectividad dentro de la ventana terapéutica, minimizando el riesgo de desarrollar efectos secundarios en localizaciones anatómicas que no requieren de tratamiento. La liberación controlada de agentes terapéuticos desde lipogeles que responden a energía NIR se beneficia de las ventajas que ofrece la fibrina como son la posibilidad de administración mediante inyección, su degradación paulatina en sistemas biológicos y una baja inmunogenicidad. Estas propiedades permiten superar ciertos problemas asociados a la administración I.V. de formulaciones liposomales. P. ej., los liposomas circulantes pueden ser captados por el RES lo que conduce a su acumulación en órganos asociados a este sistema como el bazo, el hígado o los ganglios linfáticos, causando toxicidad en los mismos. La pérdida de estabilidad por degradación, agregación o fusión de liposomas circulantes cuando acceden al órgano o tejido diana (Allen y Cullis, 2013; Storm y col., 1987; Zhang y Granick, 2006; Grimaldi



y col., 2016) es otro de los problemas que puede minimizar un sistema de liberación controlada basado en lipogeles.

Es un hecho bien conocido que la incorporación de colesterol en bicapas lipídicas provoca un incremento en el nivel de empaquetamiento de sus componentes. En el caso de formulaciones liposomales, la adición de colesterol aumenta la retención de las moléculas cargadas en las vesículas (Storm y col., 1987b; McIntosh, 1978; Cullis y Hope, 1980; Damen y col., 1981; Sadeghi y col., 2018). La incorporación de LTSL-C-DOX en matrices de fibrina mejora significativamente la eficiencia de este sistema de liberación. El colesterol no solo reduce la fuga de fármaco desde los lipogeles a 37 °C, sino que además incrementa de modo significativo la cantidad total de fármaco liberado tras el tratamiento térmico. Además, esta modificación no afecta a la estabilidad a largo plazo de la composición liposomal sintetizada.

El interés por desarrollar sistemas de liberación de factores terapéuticos capaces de ser eliminados del organismo tras cumplir con su función hace prioritario el uso de materiales biocompatibles susceptibles de ser degradados en el entorno fisiológico. Las matrices de fibrina cumplen con este requisito constituyendo plataformas óptimas para sistemas de liberación controlada. Las HGNP empleadas para la preparación de lipogeles fototérmicos basados en fibrina, a pesar de ser biocompatibles, conservan el carácter bioinerte del oro como material en bloque (Cobley y col., 2011), por lo que no son biodegradables. Esta circunstancia, sumada a la incapacidad de ser excretadas del organismo por vía renal, debido a su tamaño, o por vía hepatobiliar, debido a la imposibilidad de ser metabolizadas, conduce a que las HGNP implantadas se acumulen en el organismo por un tiempo indeterminado lo que implica riesgo de toxicidad. Un estudio reciente realizado en ratones demuestra como la inyección sistémica de HGNP pegiladas resulta en la acumulación en el hígado del 70% del nanomaterial administrado transcurridos 3 meses, relacionándose con el cambio en el perfil proteómico detectado en este órgano (Guo y col., 2013). En este mismo estudio, la administración sistémica de CuSNP pegiladas resulta en la eliminación de un 95 % de la dosis administrada transcurridos los 3 meses, sin que el perfil proteómico del hígado se vea afectado significativamente. En el presente trabajo hemos explorado la sustitución de HGNP por CuSNP como elemento transductor de energía NIR en sistemas de liberación controlada basados en lipogeles de fibrina. A idéntica concentración de NIR-NP, los lipogeles que contienen CuSNP presentan una menor capacidad fototérmica que los que incluyen HGNP lo que redundará en una ligera reducción de la DOX liberada tras la irradiación con láser NIR. Este resultado se justifica por el distinto comportamiento fototérmico de las NIR-NP, ya que las HGNP muestran un máximo de absorbancia NIR centrado en 810 nm (Martín-Saavedra y col.,

2014; Cebrián y col., 2013), coincidiendo con la longitud de onda emitida por el láser NIR empleado, mientras que el máximo de absorción de CuSNP se desplaza hacia los 1100 nm. A pesar de este efecto, la DOX liberada por lipogeles basados en CuSNP es bioactiva, como se observó en cultivos de células HeLa. Finalmente, el número de irradiaciones solapantes en lipogeles que incorporan CuSNP permite modular la concentración final de droga liberada, al igual que ocurre con los sistemas análogos basados en HGNP. Tomando todos estos datos en conjunto, se concluye que el sistema de liberación controlada basado en lipogeles fototérmicos admite el intercambio de HGNP por CuSNP como elemento nanotransductor sin que se vean afectadas sus características funcionales, manifestando como ventaja principal la capacidad de degradación que experimentan las CuSNP en sistemas acuosos.

La integración de la tecnología basada en la incorporación de LTSL en hidrogeles de fibrina que responden a energía NIR añade una ventaja importante respecto a otros sistemas que combinan liposomas y matrices poliméricas degradables para liberar moléculas bioactivas (Mufamadi y col., 2011). En este tipo de sistemas los polímeros utilizados deben presentar enlaces hidrolítica o proteolíticamente lábiles en su estructura. P. ej., se han utilizado con este fin polímeros sintéticos como ácido poliláctico o poliglicólico en los que la liberación depende exclusivamente de la cinética de degradación del polímero, lo que resulta en una insuficiente liberación del agente terapéutico al comienzo del tratamiento o en una descarga excesiva en fases posteriores de rápida degradación (Liechty y col., 2010).

Las moléculas bioactivas con actividad terapéutica susceptibles de ser cargadas en lipogeles fototérmicos basados en LTSL no se restringen únicamente a aquellas utilizadas en terapia antitumoral. El uso de esta tecnología se ha extendido a moléculas clave en ingeniería de tejidos. Se han incluido LTSL en matrices poliméricas inyectables basadas en quitosano para liberar deferoxamina, una molécula que aumenta la biodisponibilidad de VEGF, tras un aumento de temperatura (O'Neill y col., 2016). Asimismo se ha demostrado que es posible liberar dos moléculas diferentes a partir de un mismo lipogel mediante dos mecanismos de liberación independientes, difusión pasiva y LTSL estimulados térmicamente. López-Noriega y colaboradores (2014) utilizaron matrices de colágeno e hidroxiapatita funcionalizadas en su superficie con LTSL cargados con PTHrP(107-111) que se liberó tras tratamiento térmico. Estos trabajos proporcionan pruebas de concepto de sistemas de liberación controlada que emplean LTSL, si bien utilizan un baño termostático como fuente de calor, cuya forma de aplicación no es focalizable.

Por último cabe destacar que la tecnología desarrollada en este trabajo es susceptible de alcanzar un escenario clínico. La fibrina se utiliza en clínica como

sellador en cirugía y hemostático para evitar sangrados y complicaciones postoperatorias (Spotnitz, 2014). La mezcla de fibrinógeno, trombina, liposomas y NIR-NP explorada en este trabajo puede ser polimerizada *in situ* y, virtualmente, podría ser implantada en cualquier región anatómica. Para ello existen distintas aproximaciones que comprenden desde una implantación intraoperatoria directa en el órgano o tejido diana hasta la inyección en éstos guiada por técnicas de imagen y apoyada en cateterismo. Por otra parte, la limitada penetrancia del láser NIR en tejidos biológicos, que varía entre los 4 y 10 cm de profundidad dependiendo de la potencia aplicada (Weissleder y col., 2001), puede ser contrarrestada mediante procedimientos actualmente utilizados en el escenario clínico. Un ejemplo de este tipo es la “terapia láser intersticial”, metodología compatible con sistemas de liberación controlada basados en lipogeles fototérmicos. La aplicación eficiente de la energía NIR en lipogeles fototérmicos implantados requerirá un control preciso sobre el tiempo de irradiación, el régimen de emisión del láser, la densidad de potencia y la dispersión de la luz aplicada. En relación con esto, actualmente están disponibles en el mercado un amplio abanico de dispositivos, como difusores o *arrays* láser, que permiten definir con gran precisión la geometría de incidencia en las regiones anatómicas diana. Finalmente, la facilidad de manejo y los altos estándares de seguridad de los láseres NIR son factores críticos para facilitar la traslación clínica de la tecnología de lipogeles fototérmicos.

## **2. MATRICES POLIMÉRICAS FOTOTÉRMICAS PARA LA EXPRESIÓN CONTROLADA DE GENES TERAPEÚTICOS.**

### **2.1 Matrices poliméricas fototérmicas basadas en fibrina**

El desarrollo de sistemas de liberación capaces de ser eliminados del organismo tras cumplir con su función hace prioritario el uso de materiales biocompatibles que, además de no superar niveles aceptables de toxicidad, mutagenicidad e inmunogenicidad, sean degradados en el entorno fisiológico (Cvetković y col., 2018). Las matrices de fibrina son excelentes plataformas para liberación de factores terapéuticos pues cumplen con estos requerimientos y además tienen la ventaja de servir como excelente andamiaje para el crecimiento celular. Se han utilizado hidrogeles de fibrina como andamiajes para el trasplante de células madre en protocolos de ingeniería tisular para la reparación de hueso, tejido cardíaco, cartílago, piel tejido nervioso y ligamentos (Noori y col., 2017). En estas aplicaciones la distribución controlada de FC en la ventana espaciotemporal adecuada juega un papel crítico en el transcurso del proceso regenerativo. Los hidrogeles basados en fibrina

que responden a energía NIR mediante la incorporación de HGNP en su estructura, han demostrado ser andamios eficaces para introducir células modificadas genéticamente en un tejido diana y permitir el control de la expresión transgénica de VEGF (Martín-Saavedra y col., 2014).

En el presente trabajo se ha explorado el uso de CuSNP como elemento nanotransductor en hidrogeles de fibrina destinados a servir como andamiajes celulares con actividad fototérmica. Estas nanoestructuras, incorporadas durante la polimerización de fibrinógeno inducida por trombina, quedan asociadas a las fibras de fibrina que constituyen el hidrogel de la misma forma que las HGNP, sin repercutir significativamente en la morfología de la red de fibrina resultante. Como se describe en nuestro trabajo previo, la incorporación de HGNP modifica las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles de fibrina (Martín-Saavedra y col., 2014). En concreto el valor de  $G'$  aumenta con el contenido de HGNP y el punto crítico de estrés, aquel en el que se observa una reducción de  $G'$ , adquiere un valor más alto al aumentar la concentración de HGNP. Este comportamiento se explica por el efecto de refuerzo sobre las fibras de fibrina que provoca la incorporación de HGNP. La incorporación de CuSNP a matrices de fibrina altera de forma diferente las propiedades viscoelásticas del hidrogel, detectándose una reducción significativa de  $G'$  que se traduce en hidrogeles con menor resistencia mecánica.

A nivel fototérmico, la excitación con luz láser de 808 nm de los hidrogeles de fibrina que contienen CuSNP resulta en una menor eficiencia fototérmica que la de hidrogeles cargados con concentraciones similares de HGNP. Al igual que en los lipogeles, este comportamiento se justifica por el distinto perfil de absorbancia NIR mostrado por ambos tipos de nanotransductores. La inclusión de células C3H/10T1/2-*fLuc* en hidrogeles que contienen CuSNP permitió comprobar que, tras la irradiación NIR en presencia de RM, la inducción fototérmica genera un incremento de temperatura suficiente promover la expresión transgénica circunscrita a la zona donde el láser focaliza sobre el andamiaje. Hemos observado que, tanto *in vitro* como *in vivo*, el nivel de actividad transgénica inducida en estos constructos celulares puede ser modulado en función del aumento de temperatura alcanzado en el constructo celular. Este aumento de temperatura depende de la concentración de nanotransductor presente en la matriz. Así, un mismo protocolo de irradiación NIR puede conducir a diferentes niveles de actividad transgénica. Asimismo hemos observado que es posible reactivar la expresión transgénica de los constructos implantados mediante una segunda irradiación NIR en presencia de RM. La posibilidad de reactivación deliberada del sistema ya implantado permitiría controlar la producción del transgén terapéutico para ajustarlo a la ventana terapéutica. En conjunto, los resultados

obtenidos con estos constructos celulares en cuanto a su capacidad para activar la expresión transgénica tras irradiación NIR están en línea con los obtenidos en matrices de fibrina que contenían HGNP (Martín-Saavedra y col., 2014).

Hemos observado que los hidrogeles de fibrina que contienen CuSNP ejercen una influencia importante sobre la biología de células C3H/10T1/2 que no se observa cuando éstas colonizan matrices que incluyen HGNP. En respuesta a factores de diferenciación específicos, las células C3H/10T1/2 tienen el potencial de diferenciarse en una variedad de células especializadas como osteocitos, condrocitos, adipocitos, pericitos o células de músculo liso (Singh y col., 2003; Taylor y Jones, 1979; Katagiri y col., 1990; Tachibana y col., 2017). El estrés mecánico es un estímulo capaz de condicionar el crecimiento y diferenciación de células troncales multipotentes (Saha y col., 2006; Shimizu y col., 2008). En concreto, cuando las células C3H/10T1/2 perciben estímulos mecánicos responden iniciando programas alternativos de diferenciación. Un ejemplo de este tipo es la diferenciación hacia fenotipo endotelial inducida en células C3H/10T1/2 tras la deformación con fuerzas de cizalla de la matriz de colágeno tipo I sobre la que se cultivan (Wang y col., 2005). En el presente trabajo hemos observado que la inclusión de CuSNP en hidrogeles de fibrina que incluyen células C3H/10T1/2 promueve el aumento de su actividad metabólica, tasa de supervivencia y actividad fibrinolítica, así como un cambio profundo en la morfología celular que las asemeja al de un fenotipo endotelial. Tras 3 días de cultivo, el análisis del transcriptoma de células C3H/10T1/2 mostró que los niveles de expresión de los genes que codifican para marcadores de células endoteliales maduras como CD31, el factor de von Willebrand o la cadherina endotelial no se modifican cuando el sustrato de fibrina incorpora CuSNP. Por el contrario, la presencia de CuSNP en las matrices induce la sobreexpresión de *Ccl5*, gen que codifica una citoquina quimiotáctica que juega un rol importante en el reclutamiento de leucocitos a las zonas de inflamación (Marques y col., 2013) y que, mediante su interacción con el receptor CCR5, es capaz de dirigir el reclutamiento de células endoteliales progenitoras en los procesos de cicatrización tisular (Ishida y col., 2012). Otros genes que experimentan un incremento de expresión por la influencia de hidrogeles que incluyen CuSNP son los que codifican enzimas relacionadas con las familias de proteínas ADAMs y MMPs, implicadas en procesos de vascularización y migración celular a través de su participación en la remodelación de la matriz extracelular (Chang y Werb, 2001). En concreto, se detectó la sobreexpresión de *Adam8*, gen que codifica una enzima vascular selectiva relacionada con la proliferación y la migración de células endoteliales que ocurre como respuesta a un daño (Mahoney y col., 2009); y la de *Mmp13*, cuyo producto proteico promueve la migración y la formación de capilares en células HUVEC *in vitro* (Kudo y

col., 2013) y contribuye en la vascularización *de novo* de la membrana corioalantoidea durante el desarrollo de embriones de pollo (Zijlstra y col., 2004). Otros de los genes cuya expresión se induce en matrices que incluyen CuSNP es el que codifica MMP3, enzima que mediante la activación de MMP9 promueve la migración de células de músculo liso que intervienen en los procesos de cicatrización (Chen y col., 2013). Por otro lado, la forma activa de MMP9 es capaz de degradar la fibrina en condiciones libres de suero o células (Lelongt y col., 2001), proteolizar la lámina basal de vasos sanguíneos y promover la liberación de la forma activa de VEGF ligada a matrices extracelulares (Yabluchanskiy y col., 2013), actividades clave en la vascularización *de novo*. Los estudios de zimografía indicaron que el cultivo de células C3H/10T1/2 en hidrogeles que contienen CuSNP resulta en un incremento de la forma activa de MMP9. Este fenómeno podría estar relacionado con la rápida reducción del volumen de estos constructos que depende de la concentración del nanotransductor. Postulamos que la dinámica de degradación *in vivo* de las matrices de fibrina que incluyen CuSNP podría estar potenciada por la inducción de la actividad fibrinolítica de las células del hospedador que se encuentran en la proximidad del implante. Este fenómeno, unido al carácter biodegradable de las CuSNP justificaría también el diferente comportamiento fototérmico tras la implantación a largo plazo de hidrogeles que incluyen HGNP o CuSNP. Así, la región de implantación de hidrogeles conformados con  $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$  de HGNP muestra un creciente aumento de la eficiencia fototérmica a lo largo de 4 semanas (Martín-Saavedra y col., 2014), comportamiento que se explica por el incremento de la concentración local de NIR-NP no degradables a medida que la matriz de fibrina es reabsorbida. Por el contrario, la eficiencia fototérmica de la región de implantación de hidrogeles conteniendo la misma concentración de CuSNP se reduce de manera notable transcurridas 4 semanas. En este caso, la biodegradación acelerada de fibrina que promueve el contenido en CuSNP contribuye a la liberación del nanotransductor y su posterior degradación en la región de implantación, limitando en última instancia su persistencia en el tejido del hospedador.

La angiogénesis se apoya en intrincadas interacciones entre FC, citoquinas y enzimas cuyas funciones dependen de la disponibilidad de Cu. Mientras que el rol del Cu como facilitador de la angiogénesis está documentado desde hace más de 30 años (Raju y col., 1982) su modo de acción aún no ha sido bien establecido. Se ha vinculado la capacidad del Cu para mejorar la curación de heridas con la inducción de la biosíntesis de VEGF llevada a cabo en queratinocitos (Sen y col., 2002). VEGF es el factor angiogénico clave que regula el proceso de vascularización a largo plazo mediante la regulación de la proliferación, migración y supervivencia de células

endoteliales. Durante la última década se han realizado grandes esfuerzos en el desarrollo de andamiajes celulares biocompatibles que incorporaran Cu con el fin de promover la vascularización en protocolos de medicina regenerativa y de ingeniería tisular. Ejemplos de este tipo son las biocerámicas de silicato de calcio conjugadas con Cu, cuyos extractos iónicos promueven la formación de redes de estructuras tubulares en cultivos de células HUVEC (Kong y col., 2014), o bien los cristales basados en fosfato que incorporan Cu, que retrasa la muerte inducida por restricción de nutrientes de células HUVEC, una situación metabólica común para las células que colonizan las partes internas de andamiajes celulares (Stähli y col., 2013). La inducción de la actividad angiogénica en células troncales multipotentes incluidas en hidrogeles de fibrina que contienen CuSNP nos condujo a investigar la influencia directa de este tipo de biomaterial sobre células endoteliales, susceptibles de modular su fenotipo y diferenciación en respuesta a propiedades fisicoquímicas de los sustratos de manera independiente a la presencia de VEGF (Gloe y col., 2002). Los medios condicionados durante 7 días por hidrogeles que contienen CuSNP y cuya concentración de iones Cu alcanza hasta los  $110 \mu\text{mol L}^{-1}$  incrementaron la actividad metabólica de células HUVEC cultivadas en medio desprovisto de FC específicos. Estos resultados están en línea con lo observado por Li y colaboradores (2012), cuyo trabajo establece que los iones de Cu a concentraciones de hasta  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  pueden estimular el crecimiento de células HUVEC mientras que concentraciones a partir de  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  resultan citotóxicas. Por otra parte, observamos que las células HUVEC cultivadas en hidrogeles de fibrina son capaces de remodelar la matriz proteica estableciendo estructuras pseudocapilares en función de la concentración de CuSNP presente en el hidrogel. Este resultado está en línea con los obtenidos por Gérard y colaboradores (2010), quienes observaron que la capacidad de células HUVEC para formar estructuras tubulares cuando son cultivadas en hidrogeles de fibrina de  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  se ve fuertemente estimulada tras la adición de  $\text{CuSO}_4$  al medio de cultivo.

## **2.2 Matrices poliméricas fototérmicas basadas en polímeros sintéticos**

En este trabajo se han estudiado diferentes matrices poliméricas como alternativa a los andamios celulares basados en fibrina fototérmica. La tecnología del DNA recombinante en que se basan los ELR posibilita la adición de dominios bioactivos específicos a este biomaterial, ampliando así su repertorio de aplicaciones potenciales. Esta plasticidad le otorga ventajas sobre los hidrogeles de fibrina, cuya composición básica no puede modificarse. Algunos ejemplos de dominios añadidos a matrices basadas en ELR son p. ej., dominios con las secuencias RGD o REVD, que promueven la adhesión celular, dominios de FC con el fin de mimetizar las funciones

de la matriz extracelular (Rodríguez-Cabello y col., 2011b), dominios del péptido SNA15 que es capaz de unir fosfato cálcico que redundan en la generación de constructos mineralizados (Misbah y col., 2016) o dominios de péptidos fusogénicos como penetratina que mejoran la liberación de material genético (Piña y col., 2015). Los ELR constituyen un tipo de polímero “inteligente” debido a su característica temperatura de transición. Por debajo de esta temperatura el material, que es hidrofóbico, se encuentra en solución acuosa en un estado desordenado con plegamiento al azar. Por encima de dicha temperatura los ELR se ordenan en una estructura regular de hélice beta (Piña y col., 2015). La aplicación de la química de *click* en la tecnología de ELR permite la formación de hidrogeles de este biomaterial en ausencia de catalizador (González de torre y col., 2013). Esta propiedad, junto a la naturaleza fluida de sus precursores a temperatura ambiente y la facilidad de su manejo posibilita la administración de hidrogeles de ELR como inyectable (Fernández colino y col., 2018). La combinación de materiales basados en elastina y NP fototérmicas de oro se ha utilizado para generar dendrímeros que incluyen las NP en su estructura (Fukusima y col., 2015) así como para funcionalizar NP (Sun y col., 2018). En el presente trabajo se han incluido NIR-NP durante la conformación de los hidrogeles de ELR, lo que no afecta a la polimerización de los hidrogeles ni interfiere con el comportamiento fototérmico de las NIR-NP. Tal y como se había observado previamente en los constructos de fibrina, la eficiencia fototérmica de las matrices de ELR que contienen CuSNP resultó menor que la de las conformadas con una concentración similar de HGNP. Asimismo, el aumento neto de temperatura obtenido tras la irradiación NIR fue suficiente para inducir la actividad transgénica activada por calor y dependiente de RM en células incluidas en estas matrices. La excelente biocompatibilidad *in vitro* de los hidrogeles de ELR, previamente ensayada en células HUVEC (Ibáñez Fonseca y col., 2018; de Torre y col., 2015), fibroblastos humanos (García-Arévalo y col., 2012) o células troncales mesenquimales (Testera y col., 2015), no se vio afectada por la inclusión de NIR-NP.

Una de las principales desventajas de las matrices de fibrina es su limitado comportamiento mecánico, que puede limitar su utilización en algunas aplicaciones de ingeniería de tejidos. La criopolimerización es un método de procesamiento en el cual la mezcla de componentes polimeriza a temperaturas alrededor de -20 °C. A dicha temperatura se generan cristales por la congelación del solvente que actúa como porógeno. Tras la reacción de polimerización el sistema se descongela y se genera una red de macroporos interconectados en el espacio que ocupaba el solvente solidificado (Lozinsky, 2002; Bölgen y col., 2007). Los criogeles de HEMA:AA sintetizados mediante este proceso de síntesis presentan una alta densidad de poros



en su estructura pudiendo ser reforzados con partículas de wollastonita con el fin de obtener un material con un módulo elástico similar al del hueso trabecular (Rodríguez-Lorenzo y col., 2012). En el presente trabajo hemos incluido HGNP en criogeles de HEMA:AA otorgándoles la capacidad de absorber energía NIR y transformarla en calor. Estas matrices son susceptibles de ser utilizadas como plataforma de liberación controlada de FC ya que su irradiación con láser NIR activa la expresión transgénica de células que integran en su genoma un circuito activable por calor y dependiente de ligando. La biocompatibilidad *in vitro* de los criogeles, previamente estudiada empleando células troncales mesenquimales obtenidas a partir de medula ósea y de tejido adiposo (Rodríguez-Lorenzo y col., 2012), no se vio afectada por la inclusión de HGNP en su estructura. La criopolimerización se ha utilizado como técnica para generar andamios celulares en aplicaciones de ingeniería tisular ósea (Mishra y col., 2015) o pulmonar (Singh y col., 2013).

### **2.3 Respuesta a la implantación de matrices poliméricas fototérmicas**

El interés por desarrollar sistemas de liberación controlada basados en matrices poliméricas biocompatibles hace indispensable el estudio de la respuesta del hospedador tras la implantación. Para alcanzar este objetivo, se ha utilizado un modelo de implantación subcutánea de las diferentes matrices poliméricas estudiadas en este trabajo en ratones inmunocompetentes.

La implantación de hidrogeles de fibrina o ELR que conformados con 2 mg de CuSNP por kg de peso de los animales no generó signos de toxicidad. Chen y colaboradores (2006) habían observado previamente en ratones ICR que la dosis letal media, aquella que es capaz de matar a la mitad de una población testada tras un tratamiento de duración determinada, es de 110 mg kg<sup>-1</sup> para iones de Cu, de 413 mg kg<sup>-1</sup> para partículas de Cu con diámetro de 23,5 nm y de 5000 mg kg<sup>-1</sup> para partículas de 17 μm de diámetro.

La observación macroscópica de la cara interna de la piel bajo la cual se inyectaron los implantes de fibrina mostró depósitos residuales de CuSNP en el lugar ocupado anteriormente por los hidrogeles. En estas zonas observamos además la formación de estructuras vasculares. Nuestros resultados sugieren que las matrices que incorporan CuSNP pueden servir como reservorios de iones de Cu que una vez liberados favorecerán la integración del implante en el tejido hospedador mediante la aceleración del proceso natural de desintegración del andamiaje y la inducción de una repuesta angiogénica local. De este modo podría estimularse en la región anatómica necesitada de terapia la infiltración y supervivencia de las células reparadoras incluidas en la matriz.

La respuesta a la implantación de hidrogeles basados en ELR conteniendo NIR-NP ha sido comprobada mediante la evaluación macroscópica e histológica de las matrices y tejidos circundantes. La piel de los animales no mostró alteraciones relevantes y los parámetros de bienestar animal evaluados no indicaron efectos tóxicos adscritos a la implantación. No se observaron diferencias en la respuesta a la implantación independientemente del tipo de NIR-NP incluida en la matriz. El estudio histológico reveló que no ocurre degradación pronunciada del material durante la implantación de 34 días. Fernández Colino y colaboradores (2018) no encontraron respuesta inmune aguda tras la implantación de este material desprovisto del elemento nanotransductor. Los niveles en sangre de citoquinas como TNF $\alpha$ , interleuquinas 1 $\beta$ , 4, 6 y 10 tampoco aumentaron. Tras 6 meses de implantación la matriz se mantuvo estable y la respuesta inmune en términos de respuesta a cuerpo extraño fue mínima. De acuerdo con nuestros resultados, estos autores observaron una invasión del hidrogel por parte de las células del hospedador y formación de tejido conjuntivo nuevo alrededor del implante. La posibilidad de incorporar dominios funcionales específicos a los componentes de los hidrogeles basados en ELR hace posible generar materiales biodegradables. Así, Coletta y colaboradores diseñaron hidrogeles de ELR con dominios de reconocimiento para la enzima elastasa (2017), que degrada hidrogeles basados en elastina. Esta actividad puede ser aprovechada para generar sistemas de liberación de FC encapsulados en este tipo de hidrogeles.

En los experimentos presentados en esta memoria, la implantación de matrices basadas en fibrina o ELR se realizó mediante inyección subcutánea. Entre las ventajas terapéuticas que presentan las matrices inyectables destaca la mínima invasividad de su aplicación, que reduce el dolor asociado a los procedimientos quirúrgicos convencionales. Además la posibilidad de incluir células como agentes terapéuticos, confinándolas en la zona de administración, constituye otra de las ventajas que ofrecen este tipo de matrices (Testera y col., 2015).

Transcurridos 30 días desde la implantación de criogeles de HEMA:AA que incluyen HGNP no se observaron signos de toxicidad apreciables. Sin embargo, se pudo comprobar que la matriz fototérmica carecía de evidencias claras de degradación. Otros criogeles basados en HEMA y dextrano como los diseñados por Bölgen y colaboradores (2009) se comportaron como matrices biodegradables, si bien dicha degradación se observó a partir de los 30 días tras la implantación. La implantación subcutánea de estos criogeles resultó en la formación de una cápsula que incluía macrófagos, linfocitos y células gigantes junto con fibras de colágeno, respuesta similar a la que hemos observado en nuestro estudio.

Los tres tipos de matrices estudiadas han demostrado ser capaces de albergar NIR-NP, ser biocompatibles y servir como plataforma para el control de la expresión transgénica. Estas matrices difieren sin embargo en la respuesta que generan en el tejido hospedador. La excelente integración y rápida degradación de los hidrogeles de fibrina fototérmica contrasta con los resultados obtenidos con hidrogeles de ELR y criogeles que contienen NIR-NP, materiales cuya degradación en el entorno tisular ensayado se encuentra limitada. En cuanto al nivel de infiltración celular, los criogeles presentan una menor infiltración de células que los hidrogeles de ELR. Mientras que la metodología de implantación empleada y diferencias fisicoquímicas o estructurales entre los tipos de matrices ensayadas pueden jugar un papel muy relevante en el comportamiento que muestran *in vivo*, cabe señalar que estas mismas diferencias pueden ser explotadas para obtener matrices fototérmicas con diferentes tasas de degradación en función de la aplicación deseada.

## **CONCLUSIONES**

---

De todo lo expuesto, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Durante la polimerización de fibrina, es posible incorporar simultáneamente liposomas termosensibles que contienen doxorubicina (LTSL-DOX) y nanopartículas transductoras de energía de la región del infrarrojo cercano (NIR-NP) para dar lugar a lipogeles fototérmicos.
2. La irradiación de lipogeles fototérmicos con energía NIR resulta en la liberación de DOX bioactiva desde las localizaciones de la matriz donde el láser focaliza. La cantidad de DOX liberada por los lipogeles puede ser controlada modulando la concentración de NIR-NP, la potencia de salida del láser, el tiempo de irradiación y el patrón de irradiación espacial.
3. La incorporación de colesterol en la composición de LTSL-DOX disminuye la liberación de DOX a 37 °C y potencia su liberación inducida mediante irradiación NIR, incrementando la eficiencia del sistema de liberación basado en lipogeles fototérmicos.
4. La inclusión en lipogeles de NIR-NP basadas en sulfuro de cobre (CuSNP) como elemento nanotransductor de energía NIR permite generar sistemas de liberación de agentes terapéuticos completamente degradables en sistemas biológicos.
5. Durante la polimerización de fibrina, es posible incorporar simultáneamente CuSNP y células que integran en su genoma un circuito activable por calor y dependiente de rapamicina (RM), para generar intermediarios tisulares fototérmicos. En presencia de RM, la expresión transgénica de estas células puede ser regulada mediante el incremento local de temperatura inducido por radiación NIR.
6. La incorporación de CuSNP en matrices de fibrina incrementa la viabilidad células troncales multipotentes C3H/10T1/2, induce en éstas un fenotipo pseudoendotelial y promueve su actividad fibrinolítica, efectos que correlacionan bien con cambios en su transcriptoma.
7. La incorporación de CuSNP en matrices de fibrina reduce el módulo elástico de los hidrogeles resultantes que, tras su implantación, estimulan una respuesta angiogénica que facilita la integración en los tejidos del hospedador.

8. Es posible incorporar NIR-NP a recombinámeros de elastina (ELR) o a criogeles del copolímero 2-hidroxietil metacrilato y ácido acrílico (HEMA:AA) para constituir intermediarios tisulares que responden a la irradiación NIR con un aumento local de la temperatura suficiente para inducir patrones de expresión transgénica, en presencia de RM.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

Abraham RT. Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 1998, 10: 330-336.

Abu-Salah KM, Ansari AA, Alrokayan SA. DNA-Based applications in Nanobiotechnology. *J Biomed Biotechnol* 2010, 715295.

Ahmad E, Fatima MT, Hoque M, Owais M, Saleemuddin M. Fibrin matrices: The versatile therapeutic delivery systems (a review). *Int J Biol Macromol* 2015, 81: 121-136.

Ahmad MZ, Akhter S, Rahman Z, Akhter S, Anwar M, Mallik N, Ahmad FJ. Nanometric gold in cancer nanotechnology: current status and future prospect. *J Pharm Pharmacol* 2012, 65: 634-651.

Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008, 14: 199-215.

Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv* 2013, 65: 36-48.

Altomare L, Bonetti L, Campiglio CE, De Nardo L, Draghi L, Tana F, Farè S. Biopolymer-based strategies in the design of smart medical devices and artificial organs. *Int J Artif Organs* 2018, 41: 337-359.

Andreadis ST, Geer DJ. Biomimetic approaches to protein and gene delivery for tissue regeneration. *Trends Biotechnol* 2006, 24: 331-337.

Anyarambhatla GR, Needham D. Enhancement of the phase transition permeability of DPPC liposomes by incorporation of MPPC: A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia. *J Liposomes Res* 1999, 9: 491-506.

Arunkumar P, Raju B, Vasantharaja R, Vijayaraghavan S, Preetham Kumar B, Jeganathan K, Premkumar K. Near infrared laser mediated photothermal and antitumor efficacy of doxorubicin conjugated gold nanorods with reduced cardiotoxicity in swiss albino mice. *Nanomedicine* 2015, 11: 1435-1444.

Beck C, Uramoto H, Borén J, Akyürek LM. Tissue-specific targeting for cardiovascular gene transfer. Potential vectors and future challenges. *Curr Gene Ther* 2004, 457-467.



Beik J, Abed Z, Ghoreishi FS, Hosseini-Nami S, Mehrzadi S, Shakeri-Zadeh A, Kamrava SK. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced application. *J Control Release* 2016, 235: 205-221.

Bi H, Dai Y, Lv R, Zhong C, He F, Gai S, Gulzar A, Yang G, Yang P. Doxorubicin-conjugated CuS nanoparticles for efficient synergistic therapy triggered by near-infrared light. *Dalton Trans* 2016, 45: 5101-10.

Bibi S, Lattmann E, Mohammed AR, Perrie Y. Trigger release liposome systems: local and remoted controlled delivery? *J Microencapsulation* 2012, 29: 262-276.

Biffi S, Voltan R, Rampazzo E, Prodi L, Zauli G, Secchiero P. Applications of nanoparticles in cancer medicine and beyond: optical and multimodal *in vivo* imaging, tissue targeting and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2015, 12: 1837-1849.

Bloom DC, Feller J, McAnany P, Vilaboa N, Voellmy R. Replication-Competent Controlled Herpes Simplex Virus. *J Virol* 2015, 89:10668-10679.

Bölgen N, Plieva F, Galaev I, Mattiasson B, Piskin E. Cryogelation for preparation of novel biodegradable tissue-engineering scaffolds. *J Biomater Sci Polymer Edn* 2007, 18: 1165–1179.

Bölgen N, Vargel I, Korkusuz P, Güzel E, Plieva F, Galaev I, Matiasson B, Pişkin E. Tissue responses to novel tissue engineering biodegradable cryogel scaffolds: an animal model. *J Biomed Mater Res A* 2009, 91: 60-8.

Cappetta D, Rossi F, Piegari E, Quaini F, Berrino L, Urbanek K, De Angelis A. Doxorubicin targets multiple players: a new view of an old problem. *Pharmacol Res* 2018, 127: 4-14.

Carroll L, Humphreys TR. LASER-tissue interactions. *Clin Dermatol* 2006, 24: 2-7.

Cebrián V, Martín-Saavedra F, Gómez L, Arruebo M, Santamaria J, Vilaboa N. Enhancing of plasmonic photothermal therapy through heat-inducible transgene activity. *Nanomedicine* 2013, 9: 646-656.

Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001, 11: 37-43.

Chang KJ, Reid T, Senzer N, Swisher S, Pinto H, Hanna N, Chak A, Soetikno R. Phase I evaluation of TNFerade biologic plus chemoradiotherapy before esophagectomy for locally advanced resectable esophageal cancer. *Gastrointest Endosc* 2012, 75: 1139-1146.

Changenet-Barret P, Gustavsson T, Markovitsi D, Manet I, Monti S. Unravelling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy. *Phys Chem* 2013, 15: 2937-2944.

Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, Wang T, Yuan H, Ye C, Zhao F, Chai Z, Zhu C, Fang X, Ma B, Wan L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. *Toxicol Lett* 2006, 163: 109-120.

Chen YS, Hung YC, Liao I, Huang GS. Assessment of the *in vivo* toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2009, 8: 858-864.

Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediat Inflamm* 2013, 928315.

Cheng A, Schwartz Z, Kahn A, Li X, Shao Z, Sun M, Ao Y, Boyan BD, Chen H. Advances in porous scaffold design for bone and cartilage tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2018, 20.

Choudhury P, Kumar S, Singh A, Kumar A, Kaur N, Sanyasi S, Chawla S, Goswami C, Goswami L. Hydroxyethyl methacrylate grafted carboxy methyl tamarind (CMT-g-HEMA) polysaccharide based matrix as a suitable scaffold for skin tissue engineering. *Carbohydr Polym* 2018, 189: 87-98.

Christians ES, Benjamin IJ. Heat shock response: lessons from mouse knockouts. *Handb Exp Pharmacol* 2006, 172: 139-152.

Chung TW, Yang MC, Tsai WJ. A fibrin encapsulated liposomes-in-chitosan matrix (FLCM) for delivering water-soluble drugs. Influences of the surface properties of liposomes and the crosslinked fibrin network. *Int J Pharm* 2006, 311: 122-129.

Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng* 2012, 40: 516-533.

Cobley CM, Chen J, Cho EC, Wang LV, Xia Y. Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem Soc Rev* 2011, 40: 44-56.

Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991, 15: 3114-3124.

Coletta DJ, Ibáñez-Fonseca A, Missana LR, Jammal MV, Vitelli EJ, Aimone M, Zabalza F, Issa JPM, Alonso M, Rodríguez-Cabello JC, Feldman S. Bone regeneration mediated by a bioactive and biodegradable extracellular matrix-like hydrogel based on elastin-like recombinamers. *Tissue Eng Part A* 2017, 23: 1361-1371.

Cools P, Mota C, Lorenzo-Moldero I, Ghobeira R, De Geyter N, Moroni L, Morent R. Acrylic acid plasma coated 3d scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *Sci Rep* 2018, 8: 3830.

Cullis PR, Hope MJ. The bilayer stabilizing role of sphingomyelin in the presence of cholesterol: a <sup>31</sup>P NMR study. *Biochim Biophys Acta* 1980, 597: 533-542.

Cvetković VJ, Takić Miladinov D, Stojanović S. Genotoxicity and Mutagenicity Testing of Biomaterials. *Biomaterials in Clinical Practice* 2018.

Damen J, Regts J, Scherphof G. Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins. Dependence on cholesterol content and phospholipid composition. *Biochim Biophys Acta* 1981, 665: 538-545.

De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 2008, 29: 1912-1919.

de Torre IG, Wolf F, Santos M, Rongen L, Alonso M, Jockenhoevel S, Rodríguez-Cabello JC, Mela P. Elastin-like recombinamer-covered stents: Towards a fully biocompatible and non-thrombogenic device for cardiovascular diseases. *Acta Biomater* 2015, 12: 146-155.

Deckers R, Quesson B, Arsaut J, Eimer S, Couillaud F, Moonen CT. Image-guided, noninvasive, spatiotemporal control of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 27: 1175-1180.

Deguchi T, Itoh M, Urawa H, Matsumoto T, Nakayama S, Kawasaki T, Kitano T, Oda S, Mitani H, Takahashi T, Todo T, Sato J, Okada K, Hatta K, Yuba S, Kamei Y. Infrared laser-mediated local gene induction in medaka, zebrafish and *Arabidopsis thaliana*. *Dev Growth Differ* 2009, 51: 769-775.

Ding K, Zeng J, Jing L, Qiao R, Liu C, Jiao M, Li Z, Gao M. Aqueous synthesis of PEGylated copper sulfide nanoparticles for photoacoustic imaging of tumors. *Nanoscale* 2015, 7: 11075-11081.

Dou Y, Hynynen K, Allen C. To heat or not to heat: challenges with clinical translation of thermosensitive Liposomes. *J Control Release* 2017, 249: 63-73.

Dreano M, Brochot J, Myers A, Cheng-Meyer C, Rungger D, Voellmy R, Bromley P. High-level, heat-regulated synthesis of proteins in eukaryotic cells. *Gene* 1986, 49: 1-8.

Du B, Han S, Li H, Zhao F, Su X, Cao X, Zhang Z. Multi-functional liposomes showing radiofrequency-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor multi-mechanism therapy. *Nanoscale* 2015, 7: 5411-5426.

Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat. Nanotechnol* 2010, 6: 13-22.

Einstein A. Zur Quanten theorie der Strahlung. *Physiol Z* 1917, 18: 121-128.

Epstein N. Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery: The evidence continues to mount. *Surg Neurol Int* 2013; 4: S343-S352.

Evans CH. Gene delivery to bone. *Adv Drug Deliv Rev* 2012, 64: 1331-1340.

Fenaroli F, Repnik U, Xu Y, Johann K, Van Herck S, Dey P, Skjeldal FM, Frei DM, Bagherifam S, Kocere A, Haag R, De Geest BG, Barz M, Russell DG, Griffiths G. Enhanced permeability and retention-like extravasation of nanoparticles from the vasculature into tuberculosis granulomas in zebrafish and mouse models. *ACS Nano* 2018, 28: 8646-8661.

Fernández-Colino A, Wolf F, Keijdener H, Rütten S, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S, Rodríguez-Cabello JC, Mela P. Macroporous *click*-elastin-like hydrogels for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018, 88: 140-147.

Foldvari M, Chen DW, Nafissi N, Calderon D, Narsineni L, Rafiee A. Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *J Control Release* 2016, 28: 165-190.

Forbes N, Pallaoro A, Reich NO, Zasadzinski JA. Rapid, reversible release from thermosensitive liposomes triggered by near-infra-red light. *Part Syst Charact* 2014, 31: 1158-1167.

Fritze A, Hens F, Kimpfler A, Schubert R, Peschka-Süss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1758:1633-1640.

Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008, 3: 254-64.

Fujita S, Arai Y, Nakagawa S, Takahashi KA, Terauchi R, Inoue A, Tonomura H, Hiraoka N, Inoue H, Tsuchida S, Mazda O, Kubo T. Combined microwave irradiation and intraarticular glutamine administration-induced *HSP70* expression therapy prevents cartilage degradation in a rat osteoarthritis model. *J Orthop Res* 2012, 30:401-407.

Fukushima D, Sk UH, Sakamoto Y, Nakase I, Kojima C. Dual stimuli-sensitive dendrimers: Photothermogenic gold nanoparticle-loaded thermo-responsive elastin-mimetic dendrimers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015, 132: 155-60.

Fülöp Z, Gref R, Loftsson T. A permeation method for detection of self-aggregation of doxorubicin in aqueous environment. *Int J Pharm* 2013, 15: 559-561.

Gaber MH, Wu NZ, Hong K, Huang SK, Dewhirst MW, Papahadjopoulos D. Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996, 36: 1177-1187.

García-Arévalo C, Pierna M, Girotti A, Ariasab FJ, Rodríguez-Cabello JC. A comparative study of cell behavior on different energetic and bioactive polymeric surfaces made from elastin-like recombinamers. *Soft Matter* 2012, 8: 3239-3249.

Garrison KR, Donell S, Ryder J, Shemilt I, Mugford M, Harvey I, Song F. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review. *Health Technol Assess* 2007, 11: 1-150.

Gérard C, Bordeleau LJ, Barralet J, Doillon CJ. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials* 2010, 31: 824-831.

Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh MH, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *Arch Bone Jt Surg* 2018, 6: 90-99.

Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med* 2018, 20: 3015.

Girotti A, Reguera J, Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Testera MA. Design and bioproduction of a recombinant multi(bio)functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes. *J Mater Sci Mater Med* 2004, 15: 479-484.

Gloe T, Sohn HY, Meiningner GA, Pohl U. Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin  $\alpha(v)\beta3$ . *J Biol Chem* 2002, 277: 23453-23458.

Goel S, Chen F, Cai W. Synthesis and Biomedical Applications of Copper Sulfide Nanoparticles: From Sensors to Theranostics. *Small* 2014, 26: 631-645.

Goh KL, Holmes DF. Collagenous extracellular matrix biomaterials for tissue engineering: lessons from the common sea urchin tissue. *Int J Mol Sci* 2017, 25: 18.

González de Torre I, Santos M, Quintanilla L, Testera A, Alonso M, Rodríguez Cabello JC. Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties. *Acta Biomater* 2014, 10: 2495-2505.

Graham SM, Carlisle R, Choi JJ, Stevenson M, Shah AR, Myers RS, Fisher K, Peregrino MB, Seymour L, Coussios CC. Inertial cavitation to non-invasively trigger and monitor intratumoral release of drug from intravenously delivered liposomes. *J Control Release* 2014, 28: 101-107.

Griffin RJ, Dings RP, Jamshidi-Parsian A, Song CW. Mild temperature hyperthermia and radiation therapy: Role of tumor vascular thermotolerance and relevant physiological factors. *Int J Hyperth* 2010, 26: 256-263.

Grimaldi N, Andrade F, Segovia N, Ferrer-Tasies L, Sala S, Veciana J, Ventosa N. Lipid-based nanovesicles for nanomedicine. *Chem Soc Rev* 2016, 45: 6520-6545.

Grull H, Langereis S. Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound. *J Controlled Release* 2012, 161: 317-327.

Guilhon E, Voisin P, de Zwart JA, Quesson B, Salomir R, Maurange C, Bouchaud V, Smirnov P, de Verneuil H, Vekris A, Canioni P, Moonen CTJ. Spatial and temporal control of transgene expression *in vivo* using a heat-sensitive promoter and MRI-guided focused ultrasound. *Gene Med* 2003, 5: 333-342.

Guo L, Panderi I, Yan, K. Szulak DD, Li Y, Chen YT, Ma H, Niesen DB, Seeram N, Ahmed A, Yan B, Pantazatos D, Lu W. A comparative study of hollow copper sulfide nanoparticles and hollow gold nanospheres on degradability and toxicity. *ACS Nano* 2013, 7: 8780-8793.

Hanft JR, Pollak RA, Barbul A, van Gils C, Kwon PS, Gray SM, Lynch CJ, Semba CP, Breen TJ. Phase I trial on the safety of topical rhVEGF on chronic neuropathic diabetic foot ulcers. *J Wound Care* 2008, 17:30-37.

Hecht JR, Farrell JJ, Senzer N, Nemunaitis J, Rosemurgy A, Chung T, Hanna N, Chang KJ, Javle M, Posner M, Waxman I, Reid A, Erickson R, Canto M, Chak A, Blatner G, Kovacevic M, Thornton M. EUS or percutaneously guided intratumoral TNFerade biologic with 5-fluorouracil and radiotherapy for first-line treatment of locally advanced pancreatic cancer: a phase I/II study. *Gastrointest Endosc* 2012, 75: 332-338.

Heyde M, Partridge KA, Oreffo RO, Howdle SM, Shakesheff KM, Garnett MC. Gene therapy used for tissue engineering applications. *J Pharm Pharmacol* 2007, 59: 329-350.

Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci* 1963, 52: 1145-1149.

Hillen W, Wissman A. Protein-nucleic acid interaction: Tet repressor-tet operator interaction, in topics in molecular & structural biology. Heinemann U 1989, 10: 143.

Hu WW, Wang Z, Krebsbach PH. Virus immobilization on biomaterial scaffolds through biotin-avidin interaction for improving bone regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2016, 10: 63-72.

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009, 4: 44-57.

Hurwitz MD. Today's thermal therapy: Not your father's hyperthermia: Challenges and opportunities in application of hyperthermia for the 21st century cancer patient. *Am J Clin Oncol* 2010, 33: 96-100.

Hyzy SL, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z, Boyan BD. BMP2 induces osteoblast apoptosis in a maturation state and noggin-dependent manner. *J Cell Biochem* 2012, 113: 3236-3245.

Ibáñez-Fonseca A, Ramos TL, González de Torre I, Sánchez-Abarca LI, Muntión S, Arias FJ, Del Cañizo MC, Alonso M, Sánchez-Guijo F, Rodríguez-Cabello JC. Biocompatibility of two model elastin-like recombinamer based hydrogels formed through physical or chemical cross-linking for various applications in tissue engineering and regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2018, 12: 1450-1460.



Indraccolo S, Moserle L, Tisato V, Gola E, Minuzzo S, Roni V, Persano L, Chieco-Bianchi L, Amadori A. Gene therapy of ovarian cancer with IFN- $\alpha$ -producing fibroblasts: comparison of constitutive and inducible vectors. *Gene Ther* 2006, 13: 953-965.

Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, Kondo T. Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing, *J Clin Investig* 2012, 122: 711-721.

Issels RD Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem BC, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner CM, Vujaskovic Z, Wessalowski R, Jauch KW, Dürr HR, Ploner F, Baur-Melnyk A, Mansmann U, Hiddemann W, Blay JY, Hohenberger P. Neoadjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localized high-risk soft-tissue sarcoma: A randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol* 2010, 11: 561-570.

Jaque D, Martínez Maestro L, del Rosal B, Haro-González P, Benayas A, Plaza JL, Martín Rodríguez E, García Solé J. Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale* 2014, 6: 9494-9530.

Jiang Y, Chen J, Deng C, Suuronen EJ, Zhong Z. *Click* hydrogels, microgels and nanogels: emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2014, 35: 4969-4985.

Johnston MJ, Semple SC, Klimuk SK, Edwards K, Eisenhardt ML, Leng EC, Karlsson G, Yanko D, Cullis PR. Therapeutically optimized rates of drug release can be achieved by varying the drug-to-lipid ratio in liposomal vincristine formulations. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1758: 55-64.

Kaddah S, Khreich N, Kaddah F, Charcosset C, Greige-Gerges H. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. *Food Chem Toxicol* 2018, 113: 40-48.

Kamata H, Li X, Chung UI, Sakai T. Design of Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv Healthc Mater* 2015, 18: 2360-2374.

Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Tanaka H, Omura S, Suda T. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is

induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 172: 295-299.

Kirsebom H, Aguilar MR, San Roman J, Fernandez M, Prieto MA, Bondar B. Macroporous Scaffolds Based on Chitosan and Bioactive Molecules. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 2007, 22: 621-636.

Kobsa S, Saltzman WM. Bioengineering approaches to controlled protein delivery. *Pediatr Res* 2008, 63: 513-519.

Koetting MC, Peters JT, Steichen SD, Peppas NA. Stimulus-responsive hydrogels: theory, modern advances, and applications. *Mater Sci Eng R* 2015, 93: 1-49.

Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 2001, 40: 2004-2021.

Kong N, Lin K, Li H, Chang J. Synergy effects of copper and silicon ions on stimulation of vascularization by copper-doped calcium silicate. *J Mater Chem* 2014, 8: 1100-1110.

Koria P. Self-assembled nanosystems as delivery vehicles for regenerative medicine. *Ther Deliv* 2012, 3: 583-587.

Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Tsunematsu T, Kondo T, Subarnbhesaj A, Deraz EM, Siriwardena SB, Tahara H, Ishimaru N, Ogawa I, Takata T. Matrix metalloproteinase-13 (MMP13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis. *J Biol Chem* 2012, 287: 38716-38728.

Kumar R, Maitra AN, Patanjali PK, Sharma P. Hollow gold nanoparticles encapsulating horseradish peroxidase. *Biomaterials* 2005, 26: 6743-6753.

Kwon IK, Lee SC, Han B, Park K. Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors. *J Control Release* 2012, 164: 108-114.

Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJ, Allen TM. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin Cancer Res* 2005, 11: 6944-6949.

Lamichhane N, Udayakumar TS, D'Souza WD, Simone CB 2nd, Raghavan SR, Polf J, Mahmood J. Liposomes: Clinical applications and potential for image-guided drug delivery. *Molecules* 2018, 30: 23.

Landon CD, Park JY, Needham D, Dewhurst MW. Nanoscale drug delivery and hyperthermia: the materials design and preclinical and clinical testing of low temperature-sensitive liposomes used in combination with mild hyperthermia in the treatment of local cancer. *Open Nanomed J* 2011, 1: 38-64.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993, 260: 920-926.

Lelongt B, Bengatta S, Delauche M, Lund LR, Werb Z, Ronco PM. Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. *J Exp Med* 2001, 193: 793-802.

Li Y, Lu W, Huang Q, Huang M, Li C, Chen W. Copper sulfide nanoparticles for photothermal ablation of tumor cells. *Nanomedicine (Lond)* 2010, 5: 1161-1171.

Li S, Xie H, Li S, Kang YJ. Copper stimulates growth of human umbilical vein endothelial cells in a vascular endothelial growth factor-independent pathway. *Exp Biol Med* 2012, 237: 77-82.

Li Y, Meng H, Liu Y, Lee BP. Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering. *Scientific World Journal* 2015, 685690.

Li P, Shi YW, Li BX, Xu WC, Shi Z, Zhou C, Fu S. Photothermal effect enhances the efficiency of radiotherapy using Arg-Gly-Asp peptides-conjugated gold nanorods that target  $\alpha v \beta 3$  in melanoma cancer cells. *J Nanobiotechnology* 2015, 28: 13-52.

Li J, Mooney DJ. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater* 2016, 1.

Li N, Sun Q, Yu Z, Gao X, Pan W, Wan X, Tang B. Nuclear-targeted photothermal therapy prevents cancer recurrence with near-infrared triggered copper sulfide nanoparticles. *ACS Nano* 2018.

Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter BV, Peppas NA. Polymers for drug delivery systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2010, 1: 149-173.

Little CJ, Bawolin NK, Chen X. Mechanical properties of natural cartilage and tissue-engineered constructs. *Tissue Eng Part B Rev* 2011, 17: 213-227.

Liu T, Tian J, Chen Z, Liang Y, Liu J, Liu S, Li H, Zhan J, Yang X. Anti-TROP2 conjugated hollow gold nanospheres as a novel nanostructure for targeted photothermal destruction of cervical cancer cells *Nanotechnology* 2014, 25: 345103.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25: 402-408.

Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Field MR, Ianuzzo SE, Ianuzzo CD. Activation of heat-shock factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol* 1995, 268: 1387-1394.

Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)* 2008, 3: 703-717.

López-Noriega A, Hastings CL, Ozbakir B, O'Donnell KE, O'Brien FJ, Storm G, Hennink GE, Duffy GP, Ruiz-Hernandez E. Hyperthermia-induced drug delivery from thermosensitive liposomes encapsulated in an injectable hydrogel for local chemotherapy. *Adv Healthcare Mater* 2014, 3: 854-859.

López-Noriega A, Ruiz-Hernández E, Quinlan E, Storm G, Hennink WE, O'Brien FJ. Thermally triggered release of a pro-osteogenic peptide from a functionalized collagen-based scaffold using thermosensitive liposomes. *J Controlled Release* 2014, 187: 158-166.

Lozinsky VI, Galaev IY, Plieva FM, Savina IN, Jungvid H, Mattiasson B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends Biotechnol* 2003, 21: 445-451.

Lozinsky VI. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. *Russian Chemical Reviews* 2002, 71: 489-511.

Lundquist JT 4th, Pelletier JC. Improved solid-phase peptide synthesis method utilizing alpha-azide-protected amino acids. *Org Lett* 2001, 8: 781-783.

Mahoney ET, Benton RL, Maddie MA, Whittemore SR, Hagg T. ADAM8 is selectively up-regulated in endothelial cells and is associated with angiogenesis after spinal cord injury in adult mice. *J Comp Neurol* 2009, 512: 243-255.

Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 1960, 187:493-494.

Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets* 2013, 17: 1439-60.

Martín-Saavedra FM, Wilson CG, Voellmy R, Vilaboa N, Franceschi RT. Spatiotemporal control of vascular endothelial growth factor expression using a heat-shock-activated, rapamycin-dependent gene switch. *Hum Gene Ther Methods* 2013, 24: 160-170.

Martín-Saavedra FM, Cebrián V, Gomez L, Lopez D, Arruebo M, Wilson CG, Franceschi RT, Voellmy R, Santamaria J, Vilaboa N. Temporal and spatial patterning of transgene expression by near-infrared irradiation. *Biomaterials* 2014, 35: 8134-8143.

Martínez-Osorio H, Juárez-Campo M, Diebold Y, Girotti A, Alonso M, Arias FJ, Rodríguez-Cabello JC, García-Vázquez C, Calonge M. Genetically engineered elastin-like polymer as a substratum to culture cells from the ocular surface. *Curr Eye Res* 2009, 34: 48-56.

Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res* 1986, 46: 6387-6392.

McIntosh TJ. The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1978, 513: 43-58.

Melo LG, Gnecci M, Pachori AS, Kong D, Wang K, Liu X, Pratt RE, Dzau VJ. Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24: 1761-1764.

Mester ESB, Tota JG. Effect of laser on hair growth of mice. *KiserlOrvostud* 1967, 19: 628-631.

Migliario M, Sabbatini M, Mortellaro C, Renò F. Near infrared low level laser therapy and cell proliferation: the emerging role of redox sensitive signal transduction pathways. *J Biophotonics* 2018, 2: e201800025.

Mills JK, Needham D. Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1716: 77-96.

Misbah MH; Espanol M; Quintanilla L; Ginebra MP, Rodríguez-Cabello JC. Formation of calcium phosphate nanostructures under the influence of self-assembling hybrid elastin-like-statherin recombinamers. *RSC Adv* 2016, 6: 31225-31234.

Mishra R, Raina DB, Pelkonen M, Lidgren L, Tägil M, Kumar A. Study of *in vitro* and *in vivo* bone formation in composite cryogels and the influence of electrical stimulation. *Int J Biol Sci* 2015, 4: 1325-1336.

Miyako E, Deguchi T, Nakajimac Y, Yudasakad M, Hagiharaa Y, Horiea M, Shichiri M, Higuchi Y, Yamashita F, Hashida M, Shigeri Y, Yoshida Y, Iijima S. Photothermic regulation of gene expression triggered by laser-induced carbon nanohorns. *PNAS* 2012, 109: 7523-7528.

Moros EG, Peñagaricano J, Novák P, Straube WL, Myerson RJ. Present and future technology for simultaneous superficial thermoradiotherapy of breast cancer. *Int J Hyperth* 2010, 26: 699-709.

Moseley PL. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann NY Acad Sci* 1998, 856: 206-213.

Moss IL, Gordon L, Woodhouse KA, Whyne CM, Yee AJ. A novel thiol-modified hyaluronan and elastin-like polypeptide composite material for tissue engineering of the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 2011, 36: 1022-1029.

Mufamadi MS, Pillay V, Choonara YE, Du Toit LC, Modi G, Naidoo D, Ndesendo VM. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *J Drug Deliv* 2011, 939851.

Müller K, Engesser R, Metzger S, Schulz S, Kämpf MM, Busacker M, Steinberg T, Tomakidi P, Ehrbar M, Nagy F, Timmer J, Zubriggen MD, Weber W. A red/far-red light-responsive bi-stable toggle switch to control gene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2013, 41: e77.

Müller K, Engesser R, Schulz S, Steinberg T, Tomakidi P, Weber CC, Ulm R, Timmer J, Zurbriggen MD, Weber W. Multi-chromatic control of mammalian gene expression and signaling. *Nucleic Acids Res* 2013b, 41: e124.

Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Int J Biol Macromol* 2017, 105: 1358-1368.

Myers TJ, Granero-Molto F, Longobardi L, Li T, Yan Y, Spagnoli A. Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2010, 10:1663-1679.

Needham D, Anyarambhatla G, Kong G, Dewhirst MW. A new temperature sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res* 2000, 60: 1197-1201.

Needham D, Park JY, Wright AM, Tong J. Materials characterization of the low temperature sensitive liposome (LTSL): effects of the lipid composition (lysolipid and DSPE-PEG2000) on the thermal transition and release of doxorubicin. *Faraday Discussions* 2013, 161: 515-534.

No D, Yao TP, Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 3346-3351.

Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2017, 12: 4937-4961.

Norouzi H, Khoshgard K, Akbarzadeh F. *In vitro* outlook of gold nanoparticles in photothermal therapy: a literature review. *Lasers Med Sci* 2018, 33: 917-926.

O'Neill HS, Herron CC, Hastings CL, Deckers R, Lopez Noriega A, Kelly HM, Hennink WE, McDonnell CO, O'Brien FJ, Ruiz-Hernández E, Duffy GP. A stimuli responsive liposome loaded hydrogel provides flexible on-demand release of therapeutic agents. *Acta Biomater* 2017, 15: 110-119.

Ortiz de Solórzano I, Prieto M, Mendoza G, Alejo T, Irusta S, Sebastian V, Arruebo M. Microfluidic synthesis and biological evaluation of photothermal biodegradable copper sulfide nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016, 33: 21545-21554.

Ottenbrite RM, Park K, Okano T. *Biomedical Applications of Hydrogels*. Springer, 2010.

Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Investig* 2004, 113: 516-527.

Papahadjopoulos D, Jacobson K, Nir S, Isac T. Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1973, 311: 330-348.

Park K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *J Control Release* 2007, 120: 1-3.

Park J, Park J, Ju EJ, Park SS, Choi J, Lee JH, Lee KJ, Shin SH, Ko EJ, Park I, Kim C, Hwang JJ, Lee JS, Song SY, Jeong SY, Choi EK. Multifunctional hollow gold nanoparticles designed for triple combination therapy and CT imaging. *J Control Release* 2015, 207: 77-85.

Peng J, Han XX, Zhang QC, Yao HQ, Gao ZN. Copper sulfide nanoparticle-decorated graphene as a catalytic amplification platform for electrochemical detection of alkaline phosphatase activity. *Anal Chim Acta* 2015, 9: 87-94.

Pérez P, Plieva F, Gallardo A, San Roman J, Aguilar MR, Morfin I, Ehrburger-Dolle F, Bley F, Mikhalovsky S, Galaev IY, Mattiasson B. Bioresorbable and nonresorbable



macroporous thermosensitive hydrogels prepared by cryopolymerization. Role of the cross-linking agent. *Biomacromolecules* 2008, 9: 66-74.

Piña MJ, Alex SM, Arias FJ, Santos M, Rodriguez-Cabello JC, Ramesan RM, Sharma CP. Elastin-like recombinamers with acquired functionalities for gene delivery applications. *J Biomed Mater Res A* 2015, 103: 3166-3178.

Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater* 2009, 8: 457-470.

Ponce AM, Vujaskovic Z, Yuan F, Needham D, Dewhirst MW. Hyperthermia mediated liposomal drug delivery. *Int. J Hyperthermia* 2006, 22: 205-213.

Preciado-Flores S, Wang D, Wheeler DA, Newhouse R, Hensel JK, Schwartzberg A, Wang L, Zhu J, Barboza-Flores M, Zhang JZ. Highly reproducible synthesis of hollow gold nanospheres with near infrared surface plasmon absorption using PVP as stabilizing agent. *J Mater Chem* 2011, 21: 2344-2350.

Puri A, Loomis K, Smith B, Lee JH, Yavlovich A, Heldman E, Blumenthal R. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2009, 26: 523-580.

Raju KS, Alessandri G, Ziche M, Gullino PM. Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1982, 69: 1183-1188.

Ramadan S, Guo L, Li Y, Yan B, Lu W. Hollow copper sulfide nanoparticle-mediated transdermal drug delivery. *Small* 2012, 8: 3143-3150.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015, 43: e47.

Rivera VM, Clackson T, Natesan S, Pollock R, Amara JF, Keenan T, Magari SR, Phillips T, Courage NL, Cerasoli F Jr, Holt DA, Gilman MA. Humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med* 1996, 2: 1028-1032.

Rodríguez-Cabello JC, Martín L, Girotti A, García-Arévalo C, Arias FJ, Alonso M. Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers. *Nanomedicine (Lond)* 2011, 6: 111-122.

Rodríguez-Cabello JC, Pierna M, Fernández-Colino A, García-Arévalo C, Arias FJ. Recombinamers: combining molecular complexity with diverse bioactivities for advanced biomedical and biotechnological applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2011,125: 145-179.

Rodríguez-Lorenzo LM, Saldaña L, Benito-Garzón L, García-Carrodegua R, de Aza S, Vilaboa N, Román JS. Feasibility of ceramic-polymer composite cryogels as scaffolds for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2012, 6: 421-433.

Rowe SL, Lee S, Stegemann JP. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomaterialia* 2007, 3: 59-67.

Roy P, Srivastava SK. Nanostructured Copper Sulfides: Synthesis, Properties and Applications. *Cryst Eng Comm* 2015, 17: 7801-7815.

Sadeghi N, Deckers R, Ozbakir B, Akthar S, Kok RJ, Lammers T, Storm G. Influence of cholesterol inclusion on the doxorubicin release characteristics of lysolipid-based thermosensitive liposomes. *Int J Pharm* 2018, 548: 778-782.

Saha S, Ji L, de Pablo J, Palecek S. Inhibition of human embryonic stem cell differentiation by mechanical strain. *J Cell Physiol* 2006, 206:126-137.

Sakudo A. Near-infrared spectroscopy for medical applications: Current status and future perspectives. *Clin Chim Acta*, 2016 455: 181-188.

Salminen WF Jr, Voellmy R, Roberts SM. Differential heat shock protein induction by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1997, 282: 1533-1540.

Sapra P, Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res*, 2003: 439-462.

Schiller P, Amin J, Ananthan J, Brown ME, Scott WA, Voellmy R. Cis-acting elements involved in the regulated expression of a human *HSP70* gene. *J Mol Biol* 1988, 203: 97-105.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012, 28: 676-682.

Schwartzberg AM, Olson TY, Talley CE, Zhang JZ. Synthesis, characterization, and tunable optical properties of hollow gold nanospheres. *J PhysChem B* 2006, 110: 19935-19944.

Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, Roy S. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *American journal of physiology. Heart Circ Physiol* 2002, 282: 1821-1827.

Shamraiz U, Hussain RA, Badshah A. Fabrication and applications of copper sulphide (CuS) nanostructures. *Journal of Solid State Chemistry* 2016, 238: 25-40.

Shastry S, Toft DO, Joyner MJ. *HSP70* and *HSP90* expression in leucocytes after exercise in moderately trained humans. *Acta Physiol Scand* 2002, 175: 138-146.

Shi H, Yan R, Wu L, Sun Y, Liu S, Zhou Z, He J, Ye D. Tumor-targeting CuS nanoparticles for multimodal imaging and guided photothermal therapy of lymph node metastasis. *Acta Biomater* 2018, 72: 256-265.

Shiekh PA, Singh A, Kumar A. Oxygen-releasing antioxidant cryogel scaffolds with sustained oxygen delivery for tissue engineering applications. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018, 6: 18458-18469.

Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Masumura T, Shimano Y, Naruse K, Yamashita JK, Igarashi T, Ando J. Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor beta. *J Appl Physiol* 2008, 104: 766-772.

Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology* 2003, 144: 5081-5088.

Singh D, Zo SM, Kumar A, Han SS. Engineering three-dimensional macroporous hydroxyethyl methacrylate-alginate-gelatin cryogel for growth and proliferation of lung epithelial cells. *J Biomater Sci Polym Ed* 2013, 24: 1343-1359.

Smith BE, Roder PB, Zhou X, Pauzauskie PJ. Nanoscale materials for hyperthermal theranostics. *Nanoscale* 2015, 7: 7115-7126.

Song J, Qu J, Swihart MT, Prasad PN. Near-IR responsive nanostructures for nanobiophotonics: emerging impacts on nanomedicine. *Nanomedicine* 2016, 12: 771-788.

Song R, Murphy M, Li C, Ting K, Soo C, Zheng. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Des Devel Ther* 2018, 24: 3117-3145.

Sood N, Bhardwaj A, Mehta S, Mehta A. Stimuli-responsive hydrogels in drug delivery and tissue engineering. *Drug Deliv* 2016, 23: 758-780.

Spotnitz WD. Fibrin Sealant: The Only Approved Hemostat, Sealant, and Adhesive—a Laboratory and Clinical Perspective. *ISRN Surg* 2014, 4: 203943.

Stähli C, Muja N, Nazhat SN. Controlled copper ion release from phosphate-based glasses improves human umbilical vein endothelial cell survival in a reduced nutrient environment. *Tissue Eng Part A* 2013, 19: 548-557.

Stern JM, Kibanov Solomonov VV, Sazykina E, Schwartz JA, Gad SC, Goodrich GP. Initial evaluation of the safety of nanoshell-directed photothermal therapy in the treatment of prostate disease. *Int J Toxicol* 2016, 35: 38-46.

Storm G, Van Gessel HJ, Steerenberg PA, Speth PA, Roerdink FH, Regts J, Van Veen M, De Jong WH. Investigation of the role of mononuclear phagocytes in the transportation of doxorubicin-containing liposomes into a solid tumor. *Cancer Drug Deliv* 1987, 4: 89-104.

Storm G, Roerdink FH, Steerenberg PA, de Jong WH, Crommelin DJ. Influence of lipid composition on the antitumor activity exerted by doxorubicin-containing liposomes in a rat solid tumor model. *Cancer Res* 1987b, 47: 3366-3372.

Strachota B, Matějka L, Sikora A, Spěváček J, Konefał R, Zhigunov A, Šlouf M. Insight into the cryopolymerization to form a poly(N-isopropylacrylamide)/clay macroporous gel: structure and phase evolution. *Soft Matter* 2017, 13: 1244-1256.

Sun W, Fan J, Wang S, Kang Y, Du J, Peng X. Biodegradable drug-loaded hydroxyapatite nanotherapeutic agent for targeted drug release in tumors. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018, 10: 7832-7840.

Tachibana M, Yamazaki Y, Liu CC, Bu G, Kanekiyo T. Pericyte implantation in the brain enhances cerebral blood flow and reduces amyloid- $\beta$  pathology in amyloid model mice. *Exp Neurol* 2018, 300: 13-21.

Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 1979, 17: 771-779.

Testera AM, Girotti A, de Torre IG, Quintanilla L, Santos M, Alonso M, Rodríguez-Cabello. Biocompatible elastin-like click gels: design, synthesis and characterization. *J Mater Sci Mater Med* 2015, 26: 105-107.

Tierney EG, Duffy GP, Hibbitts AJ, Cryan SA, O'Brien FJ. The development of non-viral gene-activated matrices for bone regeneration using polyethyleneimine (PEI) and collagen-based scaffolds. *J Control Release* 2012, 10:304-311.

Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med* 2005, 26: 268-298.

van Straten D, Mashayekhi V, de Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future direction. *Cancers (Basel)* 2018, 18: 9(2).

Venkateshan VS, Marquet E. Heat shock protein 72/73 in normal and diseased kidneys. *Nephron* 1996, 73: 442-449.

Verma S, Domb AJ, Kumar N. Nanomaterials for regenerative medicine. *Nanomedicine (Lond)* 2011, 6: 157-81.

Vermonden T, Censi R, Hennink WE. Hydrogels for protein delivery. *Chem Rev* 2012, 9: 2853-88.

Vilaboa N, Fenna M, Munson J, Roberts SM, Voellmy R. Novel gene switches for targeted and timed expression of proteins of interest. *Mol Ther* 2005, 12: 290-298.

Vilaboa N, Voellmy R. Deliberate regulation of therapeutic transgenes recent advances in system development and uses. *Gene and Cell Therapy* 2015, 25.

Voellmy R, Ahmed A, Schiller P, Bromley P, Rungger D. Isolation and functional analysis of a human 70,000-dalton heat shock protein gene segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82: 4949-4953.

Wang H, Riha GM, Yan S, Li M, Chai H, Yang H, Yao Q, Chen C. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25: 1817-1823.

Wang SS, Yang MC, Chung TW. Liposomes/chitosan scaffold/human fibrin gel composite systems for delivering hydrophilic drugs-release behaviors of tirofiban *in vitro*. *Drug Deliv* 2008, 15: 149-157.

Wang Z, Sun J, Qiu Y, Li W, Guo X, Li Q, Zhang H, Zhou J, Du Y, Yuan H, Hu F, You J. Specific photothermal therapy to the tumors with high EphB4 receptor expression. *Biomaterials* 2015, 68: 32-41.

Wang J, Wu Z, Pan G, Ni J, Xie F, Jiang B, Wei L, Gao J, Zhou W. Enhanced doxorubicin delivery to hepatocellular carcinoma cells via CD147 antibody-conjugated immunoliposomes. *Nanomedicine* 2018, 14: 1949-1961.

Weichselbaum RR, Kufe D. Translation of the radio- and chemoinducible TNFerade vector to the treatment of human cancers. *Cancer GeneTher* 2009, 16: 609-619.

Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell Biochem* 2017, 82: 405-456.

Weissleder R. A clearer vision for *in vivo* imaging. *Nat Biotechnol* 2001, 19: 316-317.

Wilson CG, Martín-Saavedra FM, Padilla F, Fabilli ML, Zhang M, Baez AM, Bonkowski CJ, Kripfgans OD, Voellmy R, Vilaboa N, Fowlkes JB, Franceschi RT. Patterning expression of regenerative growth factors using high intensity focused ultrasound. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 20: 769-779.

Worley B, Cohen JL. Combination Ablative Approach to Laser Therapy in Advanced Aging of the Face. *J Drugs Dermatol* 2018, 7: 796-799.

Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2018, 15: 1-30.

Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology* 2013, 28: 391-403.

Yang Z, Cao Y, Li J, Lu M, Jiang Z, Hu X. Smart CuS nanoparticles as peroxidase mimetics for the design of novel label-free chemiluminescent immunoassay. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016, 8: 12031-12038.

Yatvin MB, Weinstein JN, Dennis WH, Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* 1978, 202: 1290-1293.

Ye H, Daoud-El Baba M, Peng RW, Fussenegger M. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science* 2011, 332: 1565-1568.

Yeh YC, Creran B, Rotello VM. Gold Nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale* 2012, 21: 1871-1880.

You J, Zhang R, Zhang G, Zhong M, Liu Y, Van Pelt CS, Liang D, Wei W, Sood AK, Li C. Photothermal-chemotherapy with doxorubicin-loaded hollow gold nanospheres: A platform for near-infrared light-triggered drug release, *J Control Release* 2012, 158: 319-328.

You J, Zhou J, Zhou M, Liu Y, Robertson JD, Liang D, Van Pelt C, Li C. Pharmacokinetics, clearance, and biosafety of polyethylene glycol-coated hollow gold nanospheres. *Part Fibre Toxicol* 2014, 30: 26.

Zhang L, Granick S. How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles), *Nano Lett* 2006, 6: 694-698.

Zhang S, Uludağ H. Nanoparticulate systems for growth factor delivery. *Pharm Res* 2009, 26: 1561-1580.

Zhang Q, Mochalin VN, Neitzel I, Hazeli K, Niu J, Kontsos A, Zhou JG, Lelkes PI, Gogotsi Y. Mechanical properties and biomineralization of multifunctional nanodiamond-PLLA composites for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2012, 33: 5067-5075.

Zhang B, Zhang PB, Wang ZL, Lyu ZW, Wu H. Tissue-engineered composite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxiapatite nanoparticles seeded with autologous mesenchymal stem cells for bone regeneration. *J Zhejiang Univ Sci B* 2017, 18: 963-976.

Zijlstra A, Aimes RT, Zhu D, Regazzoni K, Kupriyanova T, Seandel M, Deryugina EI, Quigley JP. Collagenolysis-dependent angiogenesis mediated by matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3). *J Biol Chem* 2004, 279: 27633-27645.



## **APÉNDICE**

---

Los datos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido empleados en la elaboración de las siguientes publicaciones científicas:

Martín-Saavedra F, Ruiz-Hernández E, Escudero-Duch C, Prieto M, Arruebo M, Sadeghi N, Deckers R, Storm G, Hennink WE, Santamaría J, Vilaboa N. Lipogels responsive to near-infrared light for the triggered release of therapeutic agents. *Acta Biomater* 2017, 1: 54-65.

Martín-Saavedra F\*, Escudero-Duch C\*, Prieto M, Sánchez-Casanova S, López D, Arruebo M, Voellmy R, Santamaría J, Vilaboa N. Pro-angiogenic near infrared-responsive hydrogels for deliberate transgene expression. *Acta Biomater* 2018, 15: 123-136.

\* Ambos autores son primeros autores del artículo

Además se han elaborado las siguientes publicaciones científicas:

Martín-Saavedra F, Crespo L, Escudero-Duch C, Saldaña L, Gómez-Barrena E, Vilaboa N. Substrate Microarchitecture Shapes the Paracrine Crosstalk of Stem Cells with Endothelial Cells and Osteoblasts. *Sci Rep* 2017, 9: 15182.

Palao-Suay R, Martín-Saavedra FM, Rosa Aguilar M, Escudero-Duch C, Martín-Saldaña S, Parra-Ruiz FJ, Rohner NA, Thomas SN, Vilaboa N, San Román J. Photothermal and photodynamic activity of polymeric nanoparticles based on  $\alpha$ -tocopheryl succinate-RAFT block copolymers conjugated to IR-780. *Acta Biomater* 2017, 15: 70-84.