UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

Dispositivos de vidrios mesoporosos bioactivos enriquecidos con iones biológicamente activos para el tratamiento de defectos e infecciones óseas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Javier Jiménez Holguín

Directores

Jesús Salinas Sánchez
Sandra Sánchez Salcedo

Madrid

© Javier Jiménez Holguín, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DISPOSITIVOS DE VIDRIOS MESOPOROSOS BIOACTIVOS ENRIQUECIDOS CON IONES BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS PARA EL TRATAMIENTO DE DEFECTOS E INFECCIONES ÓSEAS

JAVIER JIMÉNEZ HOLGUÍN

DIRECTORES:

ANTONIO JESÚS SALINAS SÁNCHEZ

SANDRA SÁNCHEZ SALCEDO

2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecerle a la profesora María Vallet Regí el abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en un grupo de investigación tan distinguido como este. Aunque todo este tiempo, hemos coincidido pocas veces, el trato recibido siempre ha sido amable y cercano. Tengo que mencionar el gesto que tuviste conmigo para permitirme finalizar el doctorado en un momento en el que no lograba ver la luz al final del túnel, por ello, te estoy profundamente agradecido.

Quiero agradecerle a Antonio Salinas el que confiara en mí de entre todos aquellos estudiantes que pujaban por entrar en el laboratorio hace 4 años. A ti he podido acudir los buenos y en los malos momentos, siempre con una actitud calmada, conciliadora y cariñosa. De ti he aprendido los fundamentos teóricos de los trabajos que hemos realizado y, no menos importante, las estrictas normas de redacción de un manuscrito que pueden aplicarse en muchas otras facetas de la vida.

A Sandra Sánchez le debo toda la parte experimental del trabajo de laboratorio. Creo que decir que conmigo ha tenido el estudiante más gruñón y con la cabeza más dura que el hormigón, es quedarse corto. Estaré eternamente agradecido con ella por la paciencia que ha tenido conmigo por todas las veces que "se me ha ido la pinza", por desenredar cada uno de los problemas que me han surgido (que solo yo puedo provocar) y por ponerse conmigo en la realización de los ensayos como una compañera más.

A Clara por ser la compañera con la que más tiempo he pasado trabajando y riendo. Los dos hemos vivido multitud de momentos buenos y malos como si de una montaña rusa se tratara, pero aun así hemos sabido animarnos mutuamente y hacer más llevadero los días. Gracias por hacer de psicóloga y confidente conmigo, te deseo todo lo mejor.

A Adela que fue quien me rescató de más de un aprieto al entrar en el laboratorio y me ha seguido ayudando en infinitud de ocasiones tanto en el laboratorio como en la burocracia para solicitar becas. No he conocido jamás a una persona que acumule más horas de trabajo en laboratorio y premios antes de acabar la carrera. No me cabe duda de que alcanzarás todas las metas que te propongas.

A Carla, mi cordobesa favorita, aunque llegó de las últimas, será una de las personas de las que más me costaría despedirme. Por todos los buenos momentos que hemos pasado ya sea en la hora del café con la obligatoria palmera, la hora de la comida o picándonos en los "Risketos" porque siempre sacas muchas tiradas de 6 (o porque yo estoy gafado). En ti he encontrado una persona alegre, con la que comparto casi todas las aficiones y una de las que más cariño tengo.

A Anna, una de las personas más dulces que he conocido. Por tener esa capacidad de traer alegría a cualquier situación sin importar lo dura que sea. De ti he aprendido tanto a nivel profesional como a nivel personal. Te agradezco enormemente haberme escuchado tantas veces y ser un apoyo estos 4 años. Con tu valor y buen corazón se te abrirán todas las puertas.

A Víctor (alias Victorius), por ser un ejemplo de investigador, persona y jugador de Risk (aunque de esto último podamos discutir largo y tendido). Por ser una de esas personas con las que puedes hablar tanto de ciencia, cultura o economía, y cuando te despistas te dejan imágenes recortadas de la cara de una llama debajo del ratón del ordenador. Te considero una persona sobresaliente en muchos campos y para ti solo tengo buenas palabras.

Gracias a Rafaela (Rafí) por acompañarme, por ser tan cariñosa y preocuparte de mí tanto por el doctorado como por mi vida privada. Por estar día a día apoyándome y dando tan buenos consejos incluso para la decoración de la casa. Espero que tu futuro solo te depare buenos momentos.

Gracias Elena por reírme tantísimo contigo, por hacer de cada momento una situación divertida. Sin embargo, tu valor no se resume al de una persona graciosa, pues has sido un ejemplo de perseverancia y fuerza de voluntad. Me has ayudado en momentos muy duros con palabras amables y notas esperanzadoras. Te deseo todo lo mejor.

Gracias a Manuel por tu actitud calmada y conciliadora. Por ser tan noble y tener tan buen corazón. Siempre recordaré las charlas que he tenido contigo y las veces que me he reído cuando decías “hulio”. Tus esfuerzos serán recompensados, no me cabe duda de que llegaras a ser un gran profesional en este trabajo tan duro y serás reconocido por ello.

A Rafa por prestarse a ayudar en numerosas ocasiones y enseñarme en el cacharreo del laboratorio. Por las charlas que hemos tenido de temas científicos, históricos o bélicos, y por aportar su punto de vista como “abogado del diablo”.

Gracias a Gonzalo (Gonchu) por ese buen rollo que transmites a tu alrededor y hacer de nuestro despacho el mejor del departamento, a Juan Luis por ser una fuente de conocimientos y estar siempre dispuesto a ayuda, a Naty por su enorme ayuda y adorabilidad, a Rocio por sus buenos consejos al poco de entrar en el laboratorio y a Alejandro Baeza por poder hablar contigo de todo e incluso de videojuegos con el humor que tanto te caracteriza.

Gracias a Jesús Luis Pablos por ser tan amable, servicial y empático con las personas que te rodean. Tanto tus estudiantes como tus compañeros de trabajo hablan maravillas de ti y yo aportaré mi granito hablando de tu implicación a nivel personal y del buen ambiente que trasmites con tu talante alegre y tus chistes (algunos bastante malos jaja).

Gracias a Dani Arcos por ese rescate que me hiciste cuando llegue a un punto de crisis en mi tesis doctoral. Por enseñarme tantísimo en tan poco tiempo de tu forma de trabajar y los enormes conocimientos que tienes en este campo de la ciencia y de otros de la vida. Gracias por contarnos tantas historias de diversa índole a la hora de la comida y por hacernos reír con ellas.

Gracias a José por ser el único que me entendía cuando hablaba de ordenadores y me ha solucionado una gran cantidad de problemas con el ordenador, el bioplotter e incluso la impresora que tanta guerra nos da. Las notas cómicas que dejas en el laboratorio no pueden ser mejores.

Gracias a Isabel por tu humor y consejos a la hora de realizar ensayos con bacterias, a Blanca por gestionar diversos aspectos del laboratorio y poner orden en él, y a Montse por tus palabras amables y el apoyo en las etapas finales de esta tesis doctoral.

A Vicky por ayudarme tanto con las impresoras 3D y el TG cada vez que tenía un problema. A Juan por levantarme el ánimo con las bromas que sueles gastar con ese humor tuyo tan característico y por el paseo tan romántico en Granada. PD: Aun espero que me fabriques una calavera con chistera con la impresora 3D.

Gracias a Ana García por ayudarme con el BET y diversos equipos del laboratorio tantas veces cuando apenas me quedaban neuronas al final del día. Muchas veces me has ayudado como jefa suplente y te estaré eternamente agradecido.

Gracias a Dani Lozano y a Mónica por ayudarme siempre que os he necesitado para los ensayos de células y por gestionar la zona de cultivo de células que ha sido siempre mi preferida. Gracias a Ana Martín por ser tan servicial, amable y permitirme requisar tantas cosas del laboratorio 206 para subirlas al departamento. A María del personal de limpieza. Por preguntarnos como nos encontramos cada día y desearnos siempre de todo corazón que nos vaya bien.

Gracias a Noemí por tu ayuda y sacarme una sonrisa con tu espontaneidad única, a Miguel Manzano por las risas a la hora de la comida. Gracias a Juan Carlos, Antonio Luis, María Teresa, África y a Lidia porque sin vosotros el laboratorio hubiese sido muy diferente.

Gracias a Matteo por ayudarme en mis inicios del doctorado y ser tan buen compañero (siempre envidiare lo bien que hablabas español e inglés). A Mónica Mura y a Bárbara por ser tan simpáticas y jugar tan bien al pictionary. A Irene que, aunque coincidimos poco tiempo, siempre te recordaré tan alegre. A Cristina por ser tan risueña y divertida (arriba el rock!). A Bianca por ser tan amable conmigo y prestarse a ayudar siempre que puede.

A Laura, que llegó de las últimas, pero con ella ya acumulo numerosos buenos momentos y espero que siga habiendo muchos más mientras sea su españolito favorito. A Verónica por ser tan divertida y reírnos tantísimo cuando empezamos a hablar de crónicas vampíricas y de los libros que lee (jaja). Te deseo la mejor de las suertes y espero poder contar contigo más veces.

A los chicos que han aguantado con tanto aplomo mis humildes enseñanzas: a Álvaro por ser tan divertido y compartir conmigo una publicación, a Claudia que siempre nos contagiaba con su risa y se encargada del resto de chicos en mi ausencia, a Jonathan por ser tan trabajador y contagiarme tu pasión por la ciencia cada día. A Carlota que me ayudó enormemente con el proyecto de Dani (Si sigues siendo tan buena en todo algún día nos quitaras a todos el trabajo). A Mario por ser un tío de 10, currante como el solo a la par que divertido (y tener paciencia con mis meteduras de pata). A Olga por ser tan comprensiva en mis últimos momentos de estrés durante la tesis, a José Antonio por entender mis referencias de Forjado a Fuego y Hans zimmer (jaja). A Carlos por dar buenos consejos personales y ayudarme a hacer mis mejores scaffolds hasta la fecha. A María por sacarme más de una vez una carcajada con su forma de ser. A Inés por ser tan trabajadora y prestarse a ayudarme cuando el mundo

se me venía abajo en estas etapas finales. Tengo que agradecer también a aquellos con los que he tenido menos trato, pero han aportado su granito de arena: a Bea, Almudena, Salvador (benditas tus notas de la impresora 3D), Naiara, Robertiki y a Guille.

También a aquellas personas fuera del laboratorio que me han ayudado indirectamente a hacer mis días más amenos: A mis amigas de la carrera Lety y Alba que siempre han estado conmigo, me han apoyado y han dado ánimos, a mis amigos desde la infancia Miguel y Guille por celebrar conmigo cada pequeño logro. A los chavales de la Hermandad Deluxe por tener a los mejores herejes en un grupo de WhatsApp (PD: Hydra Dominatus!). A los chicos del Mournival y Taberna, a Sergio, Alex, Arteaga (por las críticas constructivas tan divertidas), Fer, Chema y a Raúl (el que era de muchas facciones desde pequeñito) por distraerme cuando más lo necesitaba.

A mis padres, Francisco y Joaquina, que con su apoyo me han permitido tener todo lo que tengo y sin ellos no hubiese llegado hasta donde estoy hoy en día. A mis hermanos Roberto y Jesús por darme ánimos, por preocuparse por mi bienestar y ayudarme a desconectar.

Y sobre todo quiero dar gracias a Sara mi pareja de hace casi 10 años. Gracias por tu cariño, a pesar de que sea un gruñón irritable, por dejarme notas en la pizarra de la nevera con mensajes alentadores, por tus abrazos cuando llegaba sin fuerzas a casa, por animarme y darme esperanzas cuando yo las he perdido. Siempre has sido la primera en celebrar conmigo cada pequeño éxito y avance en nuestras vidas, aunque fuera a las 12 de la noche. Gracias por ser la persona que ha estado conmigo en tantas etapas de mi vida y mantenerte a mi lado siempre tan divertida y optimista. Gracias a ti, puedo llamar hogar a donde tu estés. Deseo que todas tus metas se cumplan y nunca me faltes.

Espero no haberme olvidado de nadie. Gracias a cada una de las personas que me han apoyado durante esta etapa tan importante en mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE

(I) RESUMEN.....I

(II) ABSTRACT.....V

(III) ABREVIATURAS Y SIGLAS.....IX

(IV) NOMENCLATURA, COMPOSICIÓN Y COMPONENTES DE LOS MATERIALES DESARROLLADOS.....XV

I. INTRODUCCIÓN.....1

I.1 SISTEMA ESQUELÉTICO.....1

I.2 PRINCIPALES PATOLOGÍAS DEL SISTEMA ESQUELÉTICO.....11

I.3 OSTEOMIELITIS.....13

I.4 PROTOCOLOS DE ACTUACIÓN FRENTE A UNA INFECCIÓN ÓSEA.....22

I.5 VIDRIOS MESOPOROSOS BIOACTIVOS (MBG).....26

I.6 ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LAS APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS MBG.....42

II. OBJETIVOS.....55

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....59

III.1.ANDAMIOS 3D DE MBG DOPADOS CON IONES TERAPÉUTICOS PARA APLICACIONES CLÍNICAS.....59

III.1.1. Sr-modified scaffolds based on MBG/Polyvinyl alcohol systems for bone regeneration.....59

III.1.1.1 Introducción.....59

III.1.1.2 Resumen.....60

III.1.1.3 Artículo: Jiménez-Holguín et al. Materials, 2020, 13, 5526.....63

III.1.2. Multifunctional antibiotic- and Zn-containing MBG scaffolds to fight bone infection.....81

III.1.2.1 Introducción.....81

III.1.2.2 Resumen.....82

III.1.2.3 Artículo: Heras et al. Acta Biomater, 2020, 114,395-406.....85

III.1.3. Development and evaluation of Cu-containing MBG for bone defects therapy.....97

III.1.3.1 Introducción.....97

III.1.3.2 Resumen.....98

III.1.3.3 Artículo: Jiménez-Holguín et al. Micropor Mesopor Mat, 2020, 308, 110454.....101

III.1.4. Andamios de Cu-MBG zwiterionicos.....113

III.1.4.1 Síntesis y caracterización fisicoquímica de las composiciones 114

III.1.4.2 Proceso de funcionalización y caracterización de los MBG funcionalizados.....116

III.1.4.3 Ensayo de Citocompatibilidad: Elección del MBG más adecuado.....120

III.1.4.4 Ensayo de citocompatibilidad con andamios 3D de MBG-APTS-MPC/PVA.....122

III.1.4.5 Conclusiones.....123

III.2. NANOPARTÍCULAS HUECAS DE VIDRIO BIOACTIVO PARA EL TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE OSTEOMIELITIS.....124

III.2.1. Cu-doped hollow bioactive glass nanoparticles for bone infection treatment.....124

III.2.1.1 Introducción.....124

III.2.1.2 Resumen.....126

III.2.1.3 Artículo Jiménez-Holguín et al Pharmaceutics, 2022, 14, 845.....130

IV. CONCLUSIONES.....155

V. ANEXO I: METODOLOGÍA Y TÉCNICAS EMPLEADAS.....159

V.1. METODOLOGÍA.....159

V.2. EQUIPOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS.....164

VI. ANEXO II: RESULTADOS DERIVADOS DE LA TESIS.....175

VII. BIBLIOGRAFÍA.....179

RESUMEN

I RESUMEN

El envejecimiento poblacional es un proceso que se está acentuando con el paso de los años. Los resultados presentados por la Oficina Europea de la Estadística pronosticaron que para el año 2050, el 30% de la población tendrá más de 65 años y esto conlleva a una elevada tasa de afecciones óseas como fracturas, defectos óseos, osteoporosis e infecciones óseas que necesitan de intervención una intervención quirúrgica. El procedimiento para tratar dichas afecciones consiste en realizar autoinjertos o bien implantar aleaciones metálicas recubiertas de diversos compuestos. Sin embargo, los implantes autólogos generan morbilidad en la región donadora y los implantes metálicos se contaminan fácilmente durante la cirugía, desembocando en procesos de infección en un tejido difícilmente tratable con antibióticos convencionales. En los peores casos, se pueden desarrollar resistencia frente a dichos fármacos.

Ante tal necesidad, la ingeniería ha presentado materiales sintéticos alternativos con este fin, como son los materiales poliméricos, cerámicas, metálicos o materiales compuestos.

Durante la tesis, se han desarrollado cuatro biomateriales con el objetivo de abordar diferentes escenarios, pero con una base fundamental: promover la regeneración del tejido óseo y aplicar un tratamiento combinado que prevenga procesos de osteomielitis, el desarrollo de resistencias a fármacos y elimine poblaciones bacterianas tanto en estado planctónico como en biofilms. Todas las alternativas se basan en el empleo de biocerámicas conocidas como vidrios mesoporoso bioactivos (MBG) del sistema SiO_2—P_2O_5—CaO. Esta familia de materiales está ampliamente reconocida por la comunidad científica en el ámbito de los biomateriales, como uno de los candidatos más prometedores dentro de los materiales propuestos para la sustitución de tejido óseo. Los materiales descritos en este trabajo tienen en común la estrategia de enriquecerlos con iones metálicos terapéuticos con propiedades osteogénicas y/o antibacterianas, como son el estroncio, zinc o el cobre.

El primer estudio descrito en este estudio se trata de una biocerámica enriquecida con iones *estroncio*, ya que el estroncio ha sido empleado ampliamente en tratamientos osteoporóticos debido a la participación de este ion metálico en la diferenciación de los osteoblastos y regulación de los osteoclastos. En este estudio se conformaron andamios de MBG de composición SiO_2—P_2O_5—CaO-**SrO**, y polivinil alcohol (PVA), obtenidos mediante plantillas sacrificables y moldes negativos de ácido elaboradas por modelado por deposición fundida. Estos materiales presentaron resultados prometedores presentando elevada citocompatibilidad, estimulación de la proliferación y diferenciación celular.

El segundo material se basa en andamios de MBG/policaprolactona de composición SiO_2—P_2O_5—CaO-**ZnO**, pues los iones *zinc* han sido descritos como potentes inductores de la osteogénesis, así como un elemento antibacteriano. Los andamios se recubrieron de gelatina entrecruzada con glutaraldehído y se cargaron con distintos antibióticos para evaluar su efecto antibacteriano. Los principales resultados mostraron un potente efecto sinérgico antimicrobiano entre la acción de los iones Zn^{2+} y los

antibióticos cargados, permitiendo reducir la cantidad de antibiótico necesario para realizar un tratamiento.

El tercer estudio se ha enfocado en la obtención de un MBG de composición SiO_2─P_2O_5─CaO-**CuO**. Los iones *cobre* poseen un abanico muy amplio de aplicaciones ya que promueven la osteogénesis, la angiogénesis y presentan un potente efecto antibacteriano y antiviral. Este estudio se ha centrado en la optimización de su proceso de síntesis y el estudio de la influencia del catalizador en la integración de los iones de cobre dentro de la red de sílice. Este estudio concluyó que los materiales catalizados por HNO_3 dieron lugar a materiales con una elevada porosidad, superficie específica, reactividad a SBF superior a los catalizados por HCl. Además, la catálisis por HCl daba lugar a la formación de fosfatos de calcio y/o cobre, mientras que los catalizados por el HNO_3 daba lugar a la formación de nanopartículas de cobre metálico y presentaban una respuesta bioactiva más acelerada.

El estudio posterior continuó la optimización de la cantidad de cobre integrada en MBG catalizados con HNO_3, así como su funcionalización con aminopropiltrietoxisilano (APTS) y 2-metacriloiloxietilfosforilcolina (MPC) que otorgan una superficie zwitterionica que aumenta la citocompatibilidad y repelen el anclaje bacteriano al material. La composición $84{,}95SiO_2$─$5P_2O_5$─10CaO─0,05CuO fue la más idónea y su conformación en andamios meso-macroporosos con PVA mostro niveles de citocompatibilidad iguales al material control funcionalizado, y superior al resto de composiciones sin funcionalizar.

El último estudio presentado se trata de un MBG de composición SiO_2─P_2O_5─CaO-**CuO** en escala nanométrico conocido como nanopartículas huecas de vidrio bioactivas (HBGN) enriquecidas con *cobre*. Este material presentó propiedades texturales y químicas superiores a las obtenidas por los MBG. Los ensayos in vitro mostraron una elevada citocompatibilidad con células pre-osteoblasticas. Los estudios de carga y liberación de danofloxacino mostraron una liberación disminuida en las HBGN con cobre. Además, se demostró un potente efecto antimicrobiano entre el efecto de los iones Cu^{2+}y el danofloxacino frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. En estado planctónico, sésil e incluso protegidos por un biofilm.

En resumen, los cinco estudios realizados en la presente tesis muestran diferentes abordajes para la resolución de defectos óseos, así como el tratamiento de infecciones óseas mediante el empleo de materiales basados en los vidrios mesoporosos bioactivos

ABSTRACT

II ABSTRACT

Population aging is a process that is becoming more pronounced as the years go by. The results presented by the European Statistical Office predicted that by the year 2050, 30% of the population will be over 65 years of age and this leads to a high rate of bone conditions such as fractures, bone defects, osteoporosis and bone infections that require surgical intervention. The procedure to treat these conditions consists of performing autografts or implanting metal alloys coated with various compounds. However, autologous implants generate morbidity in the donor region and metallic implants are easily contaminated during surgery, leading to tissue infections that are difficult to treat with conventional antibiotics. In the worst cases, resistance to these drugs can develop.

Faced with this need, engineering has presented alternative synthetic materials for this purpose, such as polymeric materials, ceramics, metallic or composite materials.

During the thesis, four biomaterials have been developed with the aim of addressing different scenarios, but with a fundamental basis: to promote the regeneration of bone tissue and to apply a combined treatment that prevents osteomyelitis processes, the development of drug resistance and eliminates bacterial populations both in planktonic state and in biofilms. All the alternatives are based on the use of bioceramics known as mesoporous bioactive glasses (MBG) of the SiO_2–P_2O_5–CaO system. This family of materials is widely recognized by the scientific community in the field of biomaterials as one of the most promising candidates among the materials proposed for the replacement of bone tissue. The materials described in this work have in common the strategy of enriching them with therapeutic metal ions with osteogenic and/or antibacterial properties, such as strontium, zinc or copper.

The first study described in this paper deals with a bioceramic enriched with *strontium* ions, since strontium has been widely used in osteoporotic treatments due to the participation of this metal ion in the differentiation of osteoblasts and regulation of osteoclasts. In this study, MBG scaffolds of SiO_2–P_2O_5–CaO–**SrO** composition, and polyvinyl alcohol (PVA), obtained by means of sacrificial templates and acid negative molds made by fused deposition modeling, were formed. These materials showed promising results with high cytocompatibility, stimulation of cell proliferation and differentiation.

The second material is based on MBG/polycaprolactone scaffolds of SiO_2–P_2O_5–CaO–**ZnO** composition, as *zinc* ions have been described as potent inducers of osteogenesis, as well as an antibacterial element. The scaffolds were coated with glutaraldehyde-crosslinked gelatin and loaded with different antibiotics to evaluate their antibacterial effect. The main results showed a potent antimicrobial synergistic effect between the action of Zn^{2+} ions and the loaded antibiotics, allowing to reduce the amount of antibiotic needed to perform a treatment.

The third study has focused on obtaining an MBG of SiO_2–P_2O_5–CaO–**CuO** composition. Copper ions have a wide range of applications since they promote osteogenesis, angiogenesis and have a potent antibacterial and antiviral effect. This study has focused on the optimization of their synthesis process

and the study of the influence of the catalyst on the integration of copper ions into the silica network. This study concluded that the HNO_3 catalyzed materials resulted in materials with high porosity, specific surface area, reactivity to SBF superior to those catalyzed by HCl. In addition, HCl catalysis resulted in the formation of calcium and/or copper phosphates, while those catalyzed by HNO_3 resulted in the formation of metallic copper nanoparticles and exhibited a more accelerated bioactive response.

Further study continued the optimization of the amount of copper integrated in HNO_3-catalyzed MBG, as well as its functionalization with aminopropyltriethoxysilane (APTS) and 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) which impart a zwitterionic surface that increases cytocompatibility and repels bacterial anchoring to the material. The $84.95SiO_2$─$5P_2O_5$─10CaO─0.05**CuO** composition was the most suitable and its conformation in meso-macroporous scaffolds with PVA showed cytocompatibility levels equal to the functionalized control material, and superior to the rest of the non-functionalized compositions.

The last study presented is a nanoscale MBG of SiO_2─P_2O_5─CaO─**CuO** composition known as bioactive hollow glass nanoparticles (HBGN) enriched with copper. This material presented textural and chemical properties superior to those obtained by MBGs. In vitro tests showed high cytocompatibility with pre-osteoblastic cells. Loading and release studies of danofloxacin showed a decreased release in copper-bearing HBGN. In addition, a potent antimicrobial effect was demonstrated between the effect of Cu^{2+} ions and danofloxacin against *E. coli* and *S. aureus* strains. In a planktonic state, sessile and even protected by a biofilm.

In summary, the five studies carried out in this thesis show different approaches for the resolution of bone defects, as well as the treatment of bone infections using materials based on bioactive mesoporous glasses.

ABREVIATURAS

III ABREVIATURAS Y SIGLAS

3DP: Impresión 3D directa

ALP: Fosfatasa alcalina

APTS: 3-Aminopropil trietoxisilano

BCP: Fosfatos de calcio bifásicos

CAD: Diseño asistido por computadora

CaSR: Receptor sensor del calcio

cFMS: Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos

COL1A1 **y** ***COL1A2***: Genes codificantes de las cadenas α del colágeno I

CPB: cetylpyridinium bromide

CRO: Célula de revestimiento óseo

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E. coli*: Escherichia coli*

EISA: Autoensamblaje inducido por evaporación

FDM: Modelado de deposición fundida

FL: Fosfolípidos

FTIC: Isocianato de fluoresceína

FTIR: Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier

GENTA: Gentamicina

GRGDSP: Secuencia de aminoácidos Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro

HA: Hidroxiapatita

HBGN: Nanopartículas huecas de vidrio bioactivo

HCA: Hidroxicarbonato apatita

HIF-1α: Factor 1 α inducible por hipoxia

IL-1β: Interlequina 1-β

IL-6: Interleuquina-6

LEVO: Levofloxacino

MBG: Vidrio mesoporoso bioactivo

MCM-41: Mobil Composition of Matter

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MIC: Concentraciones mínimas inhibitorias

MMP-9: Metaloproteinasa-9

MPC: 2-Metacriloiloxietilfosforilcolina:

MRSA: *S. aureus* resistente a meticilina

MSC: Células madre mesenquimales

OPG: Osteoprotegerina

PCL: Policaprolactona

PEG: Polietilenglicol

PLA: Ácido poliláctico

PMMA: Polimetilmetacrilato

PS-b-PAA: Co-polímero aniónico di-bloque de poli(estireno-b-ácido)

PTH: Hormona paratoidea

PVA: Polivinil alcohol

RIFAM: Rifampicina

RANKL: Ligando del factor nuclear kappa-B

RC: Robocasting

RGD: Secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp

RNA: Ácido ribonucleico

***S.aureus**: Staphylococcus aureus*

SBA-15: Santa Barbara Amorphous-15

SBF: Fluido corporal simulado

SCV: Variantes de colonias pequeñas

SLA: Estereolitografía

SLS: Bioimpresión asistida por láser

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TEOS: Tetraetil ortosilicato

TEP: Trietil fosfato

TG/ DTA: Termogravimetría y análisis térmico diferencial

TGF-β: Factor de crecimiento transformante

TLR: Receptores tipo toll

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

TRAP: Fosfatasa ácida resistente al tartrato

VANCO: Vancomicina

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VM: Vesícula de matriz

Las abreviaturas se encuentran escritas en inglés, aunque la redacción de la tesis se encuentra en español, para facilitar la comprensión de ciertos terminas que en español no tienen su homólogo.

NOMENCLATURA

IV. NOMENCLATURA, COMPOSICIÓN Y COMPONENTES DE LOS MATERIALES DESARROLLADOS

Nomenclatura	Composición (% mol)	Procesado/Forma	Fármaco
0Sr-MBG	$85SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO	Molde PLA/ Andamios	-
2.5Sr-MBG	$82.5SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**2.5SrO**		
5Sr-MBG	$80SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**5SrO**		
BL	$80SiO_2$–$5P_2O_5$–15CaO	Robocasting /Andamios	-
4ZN	$80SiO_2$–$5P_2O_5$–15CaO		
BL-GE (Gelatina)	$82,2SiO_2$–3,3 P_2O_5–10,3CaO–**4,2ZnO**	Robocasting /Andamios	Levofloxacino Vancomicina Gentamicina Rifampicina
4ZN-GE (Gelatina)	$82,2SiO_2$–3,3 P_2O_5–10,3CaO–**4,2ZnO**		
0% Cu_HCl	$85SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO	Prensado/ Polvos y Discos Densos	--
2.5% Cu_HCl	$82.5SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**2.5CuO**		
5% Cu_HCl	$80SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**5CuO**		
0% Cu_HNO_3	$85SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO		
2.5% Cu_HNO_3	$82.5SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**2.5CuO**		
5% Cu_HNO_3	$80SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**5CuO**		
0.05% Cu_HNO_3	$84.95SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**0.05CuO**	Prensado y Robocasting /Polvos, Discos densos y Andamios	-
0.1% Cu_HNO_3	$84.9SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**0.1CuO**		
0.25% Cu_HNO_3	$84.75SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**0.25CuO**		
0% Cu-HBGN	$79.5SiO_2$–$2.5P_2O_5$–18CaO	Stöber modificado	Danofloxacino
2.5% Cu-HBGN	$79.5SiO_2$–$2.5P_2O_5$–15.5CaO–**2.5CuO**		
5% Cu-HBGN	$79.5SiO_2$–$2.5P_2O_5$–13CaO–**5CuO**		

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I.1 Sistema esquelético

El sistema esquelético está compuesto por todos los huesos y articulaciones. En el ser humano, se contabilizan un total de 206 huesos: 80 pertenecientes al esqueleto axial presentes la cabeza, el tórax y columna vertebral, mientras que 126 pertenecen al esqueleto apendicular, ubicados en las extremidades, hombros, y pelvis (**T 1**).

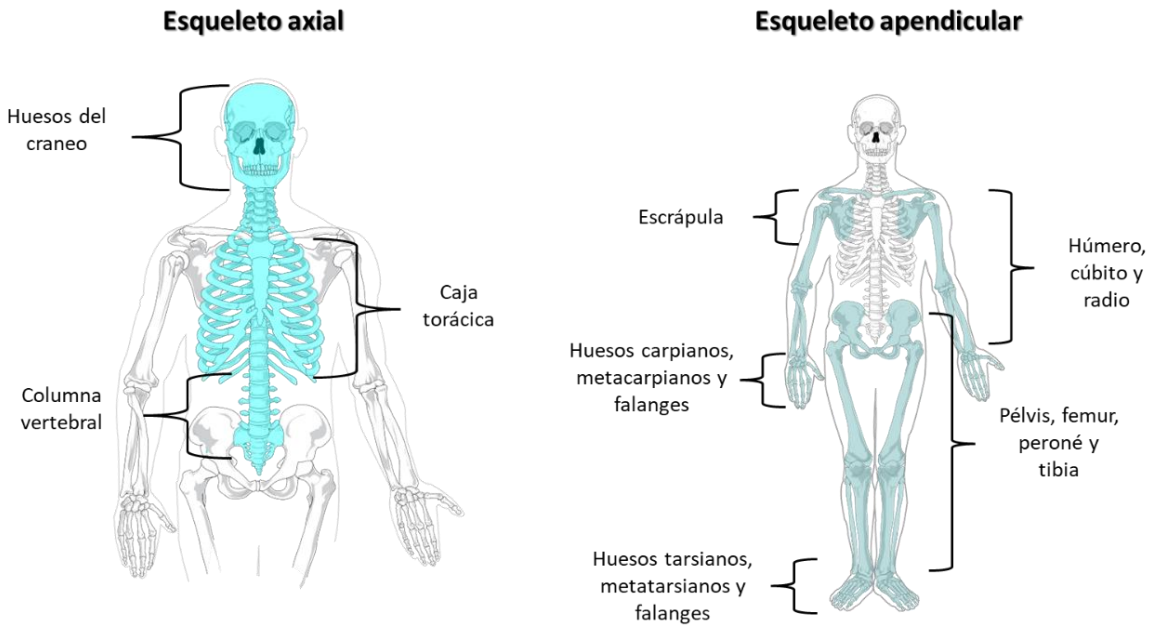


Figura 1. Componentes del sistema esquelético axial y apendicular.

El hueso es un tipo de tejido conectivo especializado que se encuentra en todos los vertebrados. La matriz extracelular de este tejido se encuentra mineralizada, otorgando rigidez y resistencia, a la par que otorga cierto grado de elasticidad. Además, el tejido es sumamente ligero, supone menos del 20% del peso total de un cuerpo entero, mientras que una red metálica que desempeñara la misma función de soporte que el esqueleto, pesaría unas 5 veces más [1].

A) <u>Funciones del sistema esquelético</u>

Entre las funciones que desarrolla el sistema esquelético destacamos las siguientes:

- **Soporte**: El esqueleto proporciona el soporte mecánico que sostiene el cuerpo y da forma al individuo, como ocurre con la pelvis que se encarga de sostener todo el tórax. Además de dar apoyo, también permite que determinados órganos internos no colapsen, como es el caso de los pulmones alojados en la caja torácica.

- **Locomoción**: Las articulaciones entre los huesos permiten realizar los movimientos y que se producen por acción de los músculos esqueléticos que se insertan en los huesos y ejercen sobre ellos su fuerza, bajo la coordinación del sistema nervioso.

- **Protección:** El esqueleto ayuda a proteger nuestros numerosos órganos internos vitales para que no se dañen.
    - El cráneo protege el cerebro.
    - Las vértebras protegen la médula espinal.
    - La caja torácica, la columna vertebral y el esternón protegen los pulmones, el corazón y los principales vasos sanguíneos.
- **Fábrica de células hematopoyéticas y adiposas:** En el interior de los huesos podemos encontrar la medula roja o la médula ósea amarilla dependiendo de la edad de la persona. Durante la niñez la mayoría de las médulas son rojas, con la madurez, las medulas óseas rojas se van sustituyendo por médulas óseas amarillas, por lo que en la etapa adulta solamente la pelvis, cráneo, vértebras y el esternón desarrollan activamente la hematopoyesis [1].
    - La médula ósea roja es responsable de la hematopoyesis, es decir, el proceso de formación de las células sanguinas mediante el que se obtienen: Eritrocitos, leucocitos y las plaquetas.
    - La médula ósea amarilla se compone principalmente de adipocitos, funcionando como almacén de ácidos grasos.
- **Almacén:** El hueso funciona como principal reservorio de calcio, por medio de la matriz ósea y hierro en forma de ferritina, además de participar activamente en el metabolismo de ambos. Además, dado que el hueso está compuesto por una mezcla de sulfato de condroitina e hidroxiapatita (HA) (30-70%), sirve también de reserva de fósforo y azucares.
- **Regulación endocrina:** Las células óseas producen la osteocalcina, una hormona que contribuye a la regulación de la glucosa en sangre, la deposición de las grasas. La osteocalcina juega un papel muy importante en la secreción de insulina, la sensibilidad, así como aumentar la cantidad de células productoras de insulina y reducir la reserva de grasa [2].

B) <u>Tipos de huesos</u>

Los huesos pueden ser de dos tipos: **cortical** (compacto) que supone el 80% [3], o **trabecular** (esponjoso). La composición celular y molecular de ambos componentes son idénticas [1], sin embargo difieren en su arquitectura y función. Las diferencias estructurales atienden a las funciones para las que están destinadas cada tipo de hueso: el hueso esponjoso se encarga de transferir la carga mecánica al hueso cortical y desarrollar funciones metabólicas [4,5] mientras que el hueso cortical proporciona funciones mecánicas y protectoras [6]. En el hueso cortical, las fibrillas de colágeno densamente empaquetadas forman laminillas concéntricas y las fibrillas de las laminillas adyacentes discurren en planos perpendiculares como en el contrachapado, mientras que el hueso esponjoso tiene una matriz porosa poco organizada [7].

C) Componentes del hueso

El hueso está formado por la matriz extracelular y las células que lo componen. A su vez, la matriz extracelular está compuesta por **componentes orgánicos** y **componentes inorgánicos**.

El componente orgánico, también conocida como **osteoide**, está constituida principalmente por proteínas colágenas que constituye aproximadamente el 90% del contenido orgánico del hueso mientras que el 10% restante está compuesto por proteoglicanos y numerosas proteínas no colágenas. El colágeno puede ser definido como una proteína estructural que contiene uno o más dominios α que se superenrollan formando una triple hélice dextrógira. Existen 21 tipos de colágeno dentro del cuerpo y se clasifican en tres grupos:

- **Grupo de los colágenos fibrilares**: Formada por los colágenos tipo I, II, V y XI. Se caracterizan por formar triples hélices largas y continuas que se autoensamblan en fibrillas organizadas. Tienen una elevada resistencia a la tracción y juegan un papel crucial al aportar soporte estructural.

- **Grupo de los colágenos asociados a fibrillas**: Constituida por los tipos IX, XII y XIV. Su función es la de interconectar diferentes fibrillas de colágeno y mediar interacciones con otros componentes de la matriz extracelular.

- **Grupo de los colágenos formadoras de láminas**: Compuesto por los colágenos tipo IV y tipo VII, se encargan de formar una compleja red tridimensional que forma el componente principal de las membranas basales.

El colágeno tipo I es el más importante de todos debido a que puede recubrirse de nanocristales en un proceso llamado “mineralización del hueso” [7].

El componente inorgánico está constituido por nanocristales en formas carbonatadas de hidroxiapatita (HCA) [7]. Su fórmula química es $Ca_{8.3}(PO_4)_{4.3}(CO)_{3\chi}(HPO_4)_{\gamma}(OH)_{0.3}$. Sin embargo, dicha fórmula representa una composición promedio del hueso, ya que está composición varia con la edad, incrementándose el valor de χ y disminuyendo el valor de Y, pero siempre manteniendo un valor sumatorio de $\gamma + \chi$ igual a 1,7 [8]. Además, la red cristalina se caracteriza por incorporar HPO_4^{2-} y CO_3^{2-} en su red cristalina, así como, diferentes sustituciones con Na^+, Mg^{2+}, F^-, K^+, Sr^{2+}, Cl^-, etc. La hidroxiapatita fisiológica difiere en gran medida de la hidroxiapatita estequiométrica, tanto en su fórmula ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), como en su relación molar Ca/P, siendo siempre inferior a la estequiométrica (Ca/P <1,67)[9] (**Figura 2**).

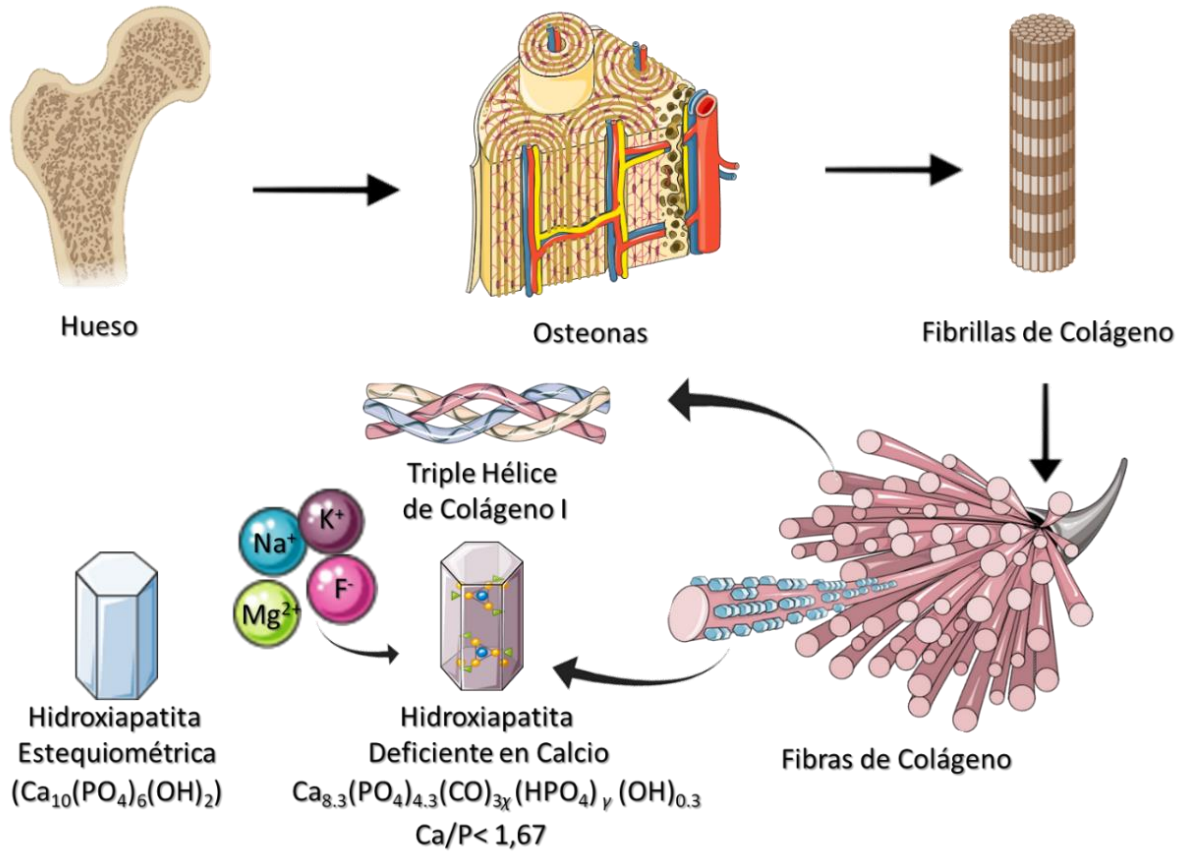


Figura 2. Composición inorgánica del hueso.

D) Composición celular del sistema esquelético

El tejido óseo es un macrosistema formado por una población heterogénea de diferentes tipos de celulares, clasificados en: Osteoblastos, a célula de revestimiento óseo (CRO), osteocitos y osteoclastos (**Figura 3**). Cada tipo celular tiene una función específica y para poder desarrollarla necesita de una continua comunicación con el resto de los tipos celulares. Para lograr la homeostasis, es necesario que se produzca un estrecho equilibrio entre la actuación de cada una de las partes, de otra forma produciría diferentes enfermedades.

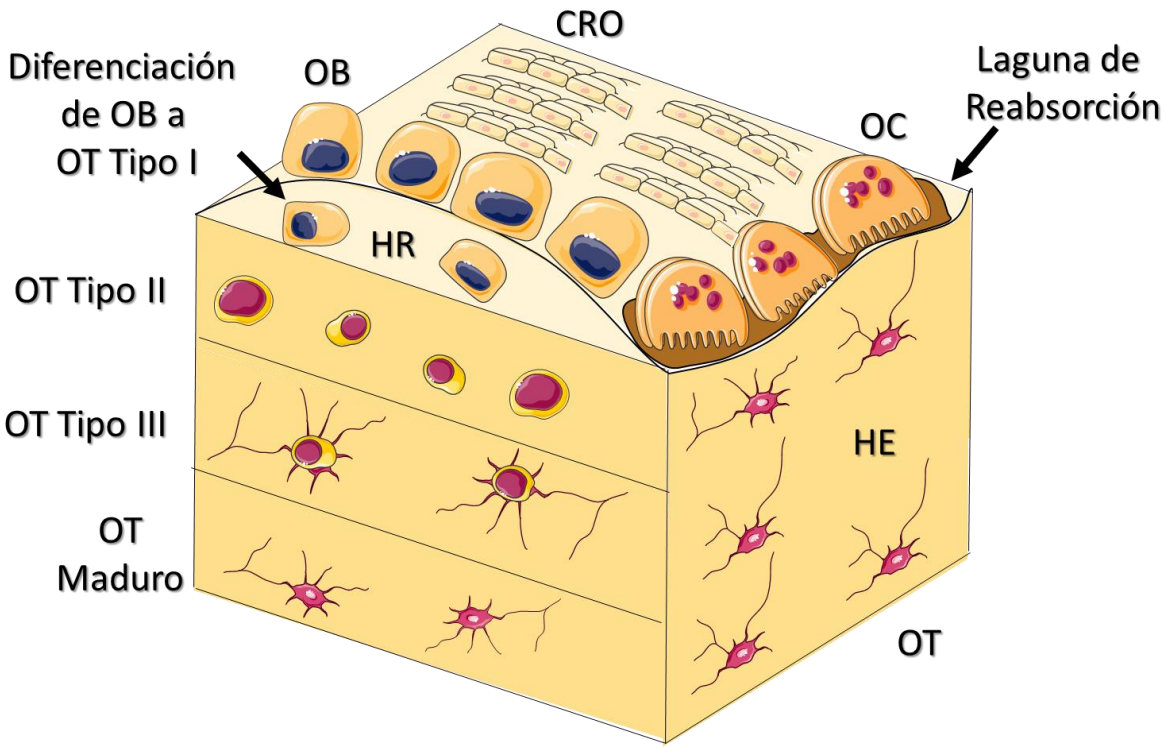


Figura 3. Composición celular del hueso. Osteoblastos (**OB**), osteoclastos (**OC**), Células de revestimiento óseo (**CRO**), osteocito (**OT**), hueso reciente (**HR**) y hueso envejecido (**HE**).

- **Osteoblastos:** Estas células componen el 4-6% las células del hueso, localizándose principalmente en la superficie del hueso. Son células cuboidales que presentan un mayor tamaño de retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, además de un gran número de vesículas secretoras [10]. Estas células se encargan de secretar el osteoide a través de la matriz extracelular y regular la diferenciación de los osteoclastos por medio del receptor de la hormona paratoidea (PTH), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) y la osteoprotegerina (OPG) [11,12]. Los osteoblastos provienen de las células madre mesenquimales (MSC) y para que se produzca su diferenciación es necesario que se activen determinadas rutas metabólicas de entre las que destacamos:

    - La expresión de *Runx2* y *Osterix*: Estos genes son cruciales para la diferenciación de las células osteoprogenitoras a osteoblastos [13]. La carencia de *Runx2* da lugar a un fenotipo sin osteoblastos [14].

    - La síntesis de las proteínas morfogenéticas del hueso: Son factores de transcripción con la capacidad de inducir fuertemente la formación del tejido óseo, cartílago y tejido conjuntivo [15].

    - La expresión de la fosfatasa alcalina (ALP): Su expresión se correlaciona con la síntesis de colágeno I, proteínas de la matriz extracelular y la adquisición de la morfología de los osteoblastos [10].

Una vez termina la diferenciación, el osteoblasto queda recubierto de la matriz extracelular que comienza a mineralizarse. Es en esta etapa cuando el osteoblasto puede enfrentar tres caminos: iniciar la apoptosis, comenzar su diferenciación a osteocito o diferenciarse a CRO [16].

- **Osteocito**: Los osteocitos representan el 90-95% del número total de células que componen un hueso [17]. Los osteocitos son células con forma dendrítica con una superficie casi 100 veces superior a la superficie del hueso trabecular [18]. Como se ha mencionado, los osteocitos provienen de los osteoblastos. Una vez comienza la fase de diferenciación de osteoblasto a osteocito comienzan a producirse cambios morfológicos y ultraestructurales, entre los que destacamos la encapsulación en el osteoide, la reducción del tamaño del citoplasma, así como de los orgánulos de su interior, y finalmente la mineralización de la matriz extracelular. Según los cambios que se van produciendo se pueden catalogar en osteocitos tipo I, II o III [17]. Estas células funcionan como mecanosensores, permitiendo la regulación de osteoblastos y osteoclastos en función de las presiones y cargas mecánicas [19] por medio de un sistema de cánulas, conocido como sistema lacuno-canalicular osteocitario [18,20], mediante señales quimiotácticas de su apoptosis [21] o bien por la secreción de la proteína esclerostina, involucrada en la formación ósea por la vía Wnt/β-catenina [22] y el factor de crecimiento transformante β (TGF β)[23].

- **Células de revestimiento óseo (CRO)**: Se caracterizan por presentar una morfología aplanada y alargada. Las CRO presentan pocos orgánulos citoplasmáticos e incluso carecen de alguno de ellos como es el caso de los ribosomas [24]. Las CRO se localizan en la superficie del hueso formando varias capas dando lugar a uniones tipo gap entre las CRO y con los osteocitos. Su función está aún en debate. Sin embargo, participan en la regulación de la remodelación ósea por medio de la secreción de OPG y ligando activador del factor nuclear kappa-B (RANKL) necesarios para la diferenciación de los osteoclastos. También impiden que la remodelación no se lleve a cabo, ya que se encuentran en las regiones donde la reabsorción no debe producirse [25].

- **Osteoclastos**: Son células grandes multinucleadas. Estás células provienen del linaje de células madre mononucleares hematopoyéticas sometidas a la influencia de varios factores. Entre los más importantes destacamos:

    - El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF): Secretado por las células mesenquimales oteoprogenitoras y osteoblastos. Su unión al receptor cFMS da lugar la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos [26].

    - RANKL: Es un ligando secretado por osteoblastos, ostecitos y células estromales. Al unirse al receptor RANK, se produce la diferenciación a osteoclasto. RANKL, se encuentra estrechamente relacionado con OPG, debido a que OPG al unirse a RANKL

impide su interacción con el receptor RANK y por consiguiente se bloquea la osteoclastogénesis [27].

- La MCP-1: Una proteína secretada por los osteoblastos en respuesta a la PTH. Promueve la diferenciación de osteoclastos, en la etapa de fusión y multinucleación de los pre-osteoclastos [11].

La función de los osteoclastos es degradar la matriz extracelular del hueso. Durante la remodelación ósea los osteoclastos se anclan a la matriz extracelular mediante el dominio conocido como zona de sellamiento, permitiendo la colocación del ribete en cepillo en la región del hueso en la que comenzará el proceso de reabsorción [28]. Tras esto, se forman unos pequeños podosomas en el ribete en forma de cepillo necesarios para la reabsorción [29]. En este momento, el ribete en cepillo se divide en dos dominios a su vez: la zona clara responsable de la endocitosis de los productos de degradación y la zona periférica de fusión, responsable de la acidificación del medio y excreción de vesículas con diversas enzimas relacionadas con la degradación y anclaje a la matriz. Las más destacadas son:

- Fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP): involucrada en la adhesión de los osteoclastos al hueso por medio de la regulación de la proteína osteopontina, la desfosforilación de ciertas proteínas de la matriz, el tráfico vesicular de los productos de degradación y la formación del dominio de membrana conocido como la zona de sellado [30].
- Catepsina K: una enzima clave en la degradación de la matriz extracelular del hueso al tener como sustrato el colágeno I y la conectina entre otras [31].
- Metaloproteinasa-9 (MMP-9): una enzima colagenasa que además de degradar proteínas del tipo colágeno, también participa en la migración de los osteoclastos [32].

La interacción entre la matriz extracelular del hueso y las enzimas secretadas por el osteoclasto da lugar a una concavidad denominada laguna de reabsorción. En esta región se forman los productos de degradación de la matriz celular produciéndose un intercambio continuo de iones HCO_3^- por Cl^-. En el proceso de reabsorción juegan un papel crítico dos dominios: El dominio basolateral, encargado de mantener la el transporte de iones HCO_3^- y Cl^- para mantener el estado isoeléctrico intracelular, y el dominio funcional secretor, encargado de excretar las moléculas matriz degradadas mediante transcitosis desde la laguna de reabsorción al medio extracelular [33] (**Figura 4)**.

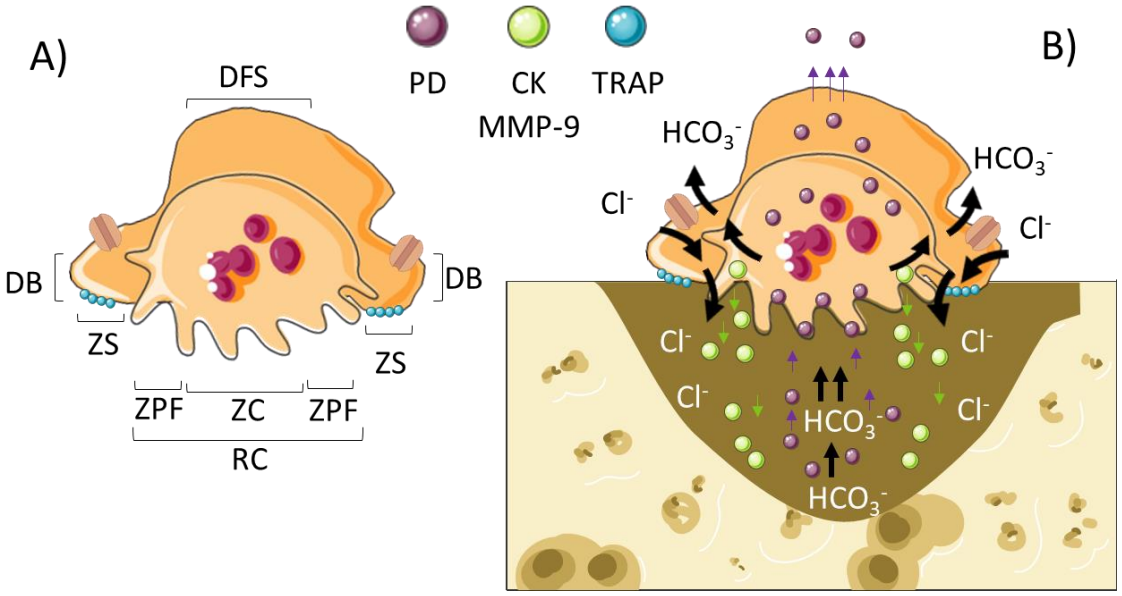


Figura 4. A) Dominios presentes en un osteoclasto. B) Proceso de reabsorción del hueso mediado por los osteoclastos. Dominio basolateral (DB), dominio funcional secretor (DFS), zona de sellado (ZS), zona periférica de fusión (ZPF), zona clara (ZC), ribete en forma de cepillo (RC).

Osteogénesis

La osteogénesis es el proceso por el cual comienza a formarse el tejido óseo. Se produce en el desarrollo embrionario, en el crecimiento y cuando se produce una fractura o defecto en el hueso. Se inicia durante la octava semana del desarrollo embrionario comenzando por el hueso de la clavícula. Se lleva a cabo por dos mecanismos: La osificación intramembranosa y la endocondral. Muchos huesos requieren que se produzcan ambos mecanismos de formación ósea, como ocurre con el hueso de la mandíbula.

- **Osificación intramembranosa**: Se caracteriza por realizarse directamente en la mesénquima, produciéndose la diferenciación directamente a osteoblasto. En primer lugar, se forma el "molde óseo" a partir de MSC. Seguidamente las MSC comienzan a diferenciarse a osteoblastos y a secretar los componentes del osteoide [34]. Finalmente, se da lugar el proceso de mineralización hasta la formación del hueso maduro.

- **Osificación endocondral**: En este proceso de osificación es necesario la presencia previa de un molde cartilaginoso del hueso. El proceso comienza por la formación del molde del futuro hueso a partir de MSC. Las MSC se diferencian a condroblastos, los responsables de la formación del molde cartilaginoso. Llegado un momento, los vasos sanguíneos penetran en el molde por la diáfisis permiten la entrada de osteoblastos, más células mesenquimales y minerales necesarios para la osificación del hueso. Los osteoblastos comenzarán a osificar la matriz interrumpiendo el flujo sanguíneo, lo que dará lugar a la apoptosis de los condrocitos dejando espacios huecos conocidos como zonas de muerte celular. Estas cavidades son las que servirán a los osteoblastos para formar las trabéculas y las placas epifisarias desde las que se elongará el hueso. [34].

El proceso de mineralización del hueso es común en ambos procesos de osificación y consta de dos pasos: En primer lugar, se lleva a cabo la secreción mayoritaria de colágeno I, así como diversas proteínas no colágenas y proteoglicanos que conforman la matriz extracelular. Seguidamente se produce la mineralización de la matriz producida en dos fases: vesicular y fibrilar [35] (**Figura 5**).

- **Fase vesicular:** Los osteoblastos forman pequeñas vesículas de unos 30 a 200 nm, conocidas como "vesículas de matriz". Estas vesículas presentan canales de calcio, transportadores de fósforo inorgánico y la fosfatasa citosólica PHOSPHO1 [36] que también produce fósforo inorgánico dentro de la vesícula, dando lugar a la acumulación de calcio [37] y fósforo inorgánico. Gracias a la presencia de fosfolípidos (FL) con elevada afinidad por el calcio [38], se mantiene separado el calcio y fósforo acumulados [39]. Los osteoblastos liberan las vesículas de matriz (VM) desde el dominio apical de su membrana a la naciente matriz extracelular donde se une con los proteoglicanos y otros componentes. Llegado un momento los osteoblastos secretan enzimas (metaloproteinasas entre otras) que degradan los proteoglicanos, permitiendo los iones calcio y fosforo nucleen formando los nanocristales de hidroxiapatita [40].

- **Fase fibrilar:** Comienza cuando la hidroxiapatita formada en la vesícula crece y atraviesa la membrana de la vesícula, liberandose al espacio extracelular de la matriz. La hidroxiapatita se elonga gracias a la concentración de calcio y fosforo presente en el fluido fisiológico y comienza a acumularse en el espacio entre las fibrillas de colágeno localizadas en la matriz [41,42].

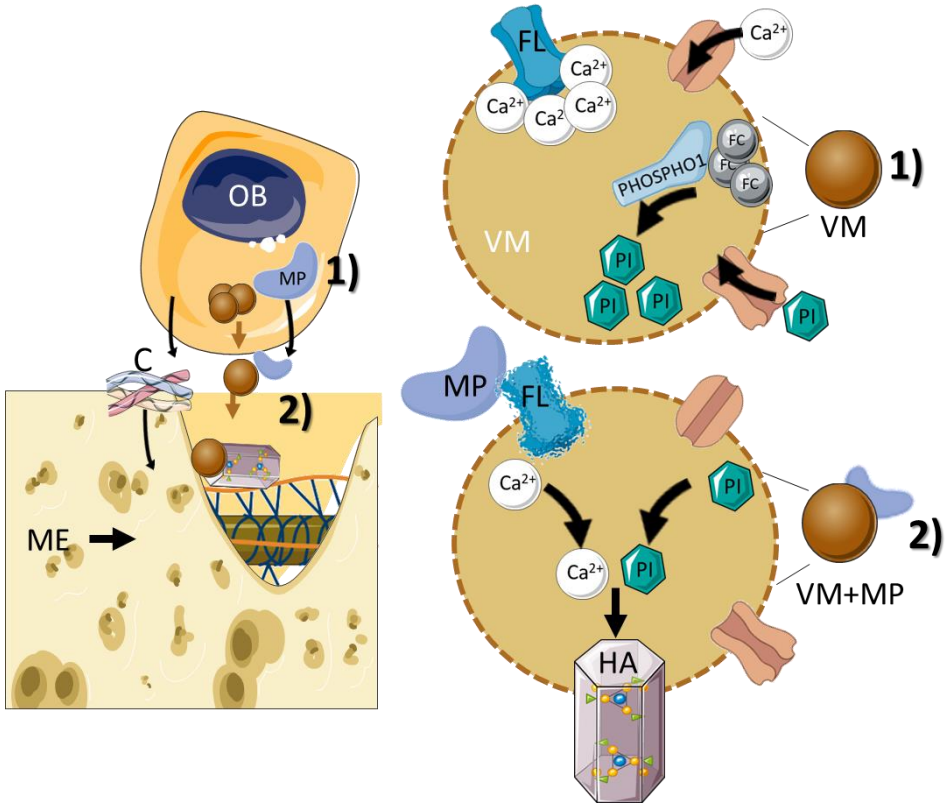


Figura 5. Osteogénesis mediada por los osteoblastos. **1)** Fase vesicular. **2)** Fase fibrilar. Colágeno (**C**) fosfocolina (**FC**), fosfolípido (**FL**), fósforo inorgánico (**PI**), metaloproteinasa (**MP**), hidroxiapatita (**HA**), vesículas de matriz (**VM**).

Remodelación ósea

La remodelación ósea es el proceso que se produce en el tejido óseo que consiste en la eliminación del tejido envejecido, defectuoso o fracturado y se sustituye por tejido óseo nuevo. Este proceso es también el que permite que se lleven a cabo injertos e implantes en una región dañada y con el tiempo se integre en la estructura ósea. Es un proceso que requiere de una estricta coordinación entre todas las células que constituyen el sistema esquelético. Para ello son necesarios diferentes mecanismos de regulación tanto a nivel sistémico como local, de otro modo, se produciría un desbalance de la actividad de las distintas partes que participan en el proceso dando lugar a una patología ósea, como es el caso de la osteopetrosis o la osteoporosis.

El proceso de remodelación ósea consta de cinco fases consecutivas: activación, resorción, reversión, formación y terminación [43] (**Figura 6**).

- **Fase de activación**: Consiste en la detección de señales de remodelación ósea. Esta señal puede producirse por múltiples vías: tensión mecánica detectada por los osteocitos [21], inmovilización de la extremidad [44] o daño en la matriz ósea dando lugar a la apoptosis de los osteocitos e interrumpiendo la producción de factores que inhiben la osteoclastogénesis [23]. Por otro lado, la señal hormonal de la PTH activa una cascada transcripcional que da lugar al reclutamiento de los precursores de osteoclastos, su diferenciación y activación.

- **Fase de resorción**: Los osteoblastos en respuesta a la señal recibida por PTH, comienzan a incrementar la producción de MCP-1 y M-CSF [11,26], así como la producción de RANKL dando lugar al reclutamiento, proliferación y activación de los osteoclastos [27]. En este punto, las CRO y los osteoblastos se retraen para que los osteoclastos puedan adherirse a la superficie de la matriz extracelular por medio de sus dominios de sellado [28]. Seguidamente, el osteoclasto forma un entorno ácido y comenzar a disolver la matriz gracias a la secreción de TRAP, catepsina K y MMP-9 [30–32] en la laguna de resorción [33].

- **Fase reversión**: Tras la actuación de los osteoclastos, actúan un linaje de células que no está del todo determinado, conocidas como células “reversas”. Los estudios más recientes indican que pueden tratarse de células de la línea de los osteoblastos, probablemente CRO, que se encargan de limpiar los restos de matriz que quedan dentro de la laguna de resorción, con ayuda de macrófagos óseos [45], y cementar con pequeñas fibras de colágeno fibrilar en las regiones depuradas [46].

- **Fase de formación**: Bajo la influencia de TGF-β [47], moléculas de la matriz y la PTH [48,49] se detiene la producción de esclerostina, la actividad de los osteoclastos y se estimula la diferenciación de las células mesenquimales hacia líneas osteoblásticas. Estas células comenzaran a sintetizar la matriz extracelular a la par que comienzan su proceso de diferenciación a osteocito. La fase de formación culmina con la diferenciación completa a osteocito y el recubrimiento de estos por una nueva matriz extracelular mineralizada [17].

- **Fase de terminación**: Mediante un mecanismo de regulación del que no se tiene plena certeza, se lleva a cabo un balance de la cantidad neta de hueso resorbida y la formada de nuevo, de forma que cesan los estímulos que activan la osteoclastogénesis, vuelve a expresarse la esclerostina y los osteoclastos sufren apoptosis. Esta fase permanece remanente hasta que comienza a producirse otro ciclo de remodelado en el hueso.

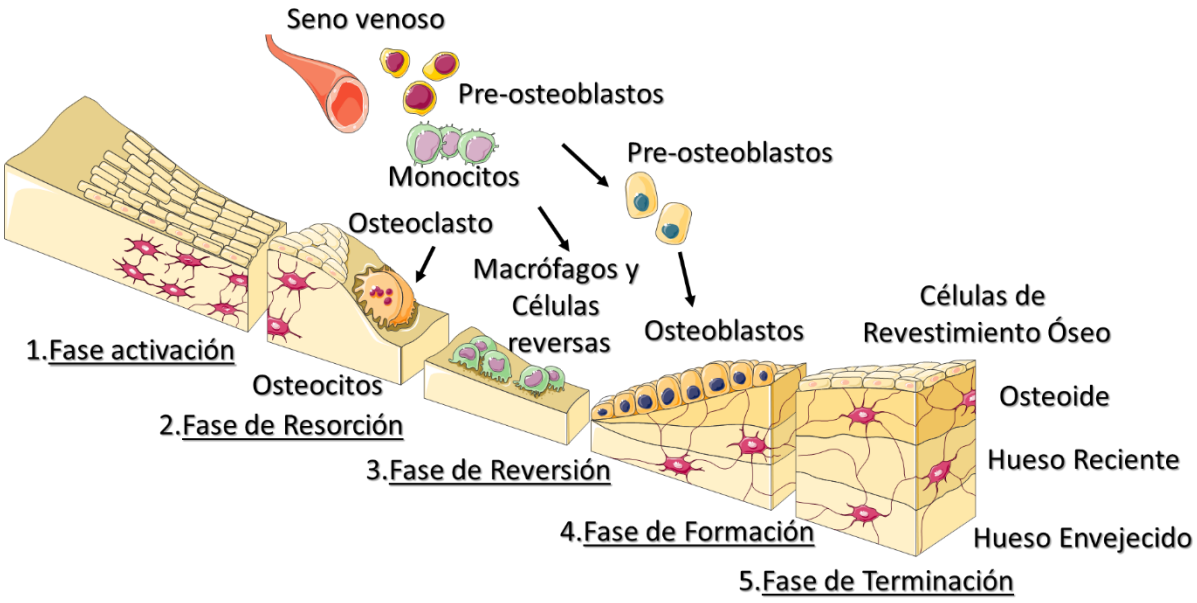


Figura 6. Esquema del proceso de remodelación ósea.

I.2 Principales patologías del sistema esquelético

La formación de un hueso sano depende de que tenga la cantidad tejido óseo-correcta, mantenga el diseño y la arquitectura necesaria para desarrollar su función y se localice en el lugar correcto. El proceso de formación del tejido óseo durante el desarrollo embrionario está sometido al influjo de diferentes factores e incluso ambientales que pueden desajustarlo. En esta sección se van a comentar las patologías más comunes del tejido óseo:

A) **Osteopetrosis:** Esta enfermedad de carácter genético se caracteriza por el bloqueo de la actividad remodeladora de los osteoclastos, dando lugar a un aumento aberrante de la masa ósea. La osteopetrosis se categoriza como una enfermedad rara en la que se estima que 1 de entre 250.000 pueden padecerla [50,51].

B) **Osteogénesis imperfecta:** Es una enfermedad causada por la mutación de los que codifican para las cadenas α del colágeno I (*COL1A1 y COL1A2*). Esta condición da lugar a la formación de hueso extremadamente frágiles, baja estatura, piel y ligamentos hiperlaxos. Se estima que entre 20.000 y 50.000 personas en Estados Unidos sufren esta enfermedad [52]

C) **Raquitismo/Osteomalacia**: Estas enfermedades se debe a deficiencia en la obtención de la vitamina D, calcio y fósforo, ya sea por carencias en la nutrición o metabólicas. En función de si esta deficiencia se produce en la infancia o en la adultez se la categoriza como raquitismo u

osteomalacia. Ambas se caracterizan por ocasionar un reblandecimiento de los huesos y propensión a la fractura, así como síndrome tetánico latente en las manos y en la mandíbula. Se estima que la osteomalacia la sufren cerca del 4% de la población anciana [53,54], mientras que la prevalencia del raquitismo está en torno al 25% en Reino Unido, 42% en Etiopia, 9% en Nigeria y 3,3% en Gambia [55].

D) **Cáncer óseo:** La causa de esta enfermedad es la mutación de los genes retinoblastoma, p53 y genes codificantes de la DNA helicasa [56]. Pueden ser de diferentes tipos, los más comunes son los osteosarcomas, condrosarcomas y el sarcoma de Ewing. Se considera una enfermedad extremadamente rara, representando el 0.2% de todos los cánceres diagnosticados y suelen tener un buen pronóstico.

E) **Enfermedad de Paget**: Se caracteriza por incremento drástico en el ciclo de resorción y producción de masa ósea, como resultado, se obtienen huesos en los que la resistencia mecánica y la morfología no es la adecuada, facilitando el riesgo de sufrir fracturas patológicas. Aunque no se tiene una evidencia clara, se cree que se debe a mutaciones genéticas que provocan un aumento de la PTH y la sensibilidad de los osteoclastos a RANKL Es una enfermedad rara presente en el 8% de los hombres y 5% de las mujeres de más de 55 años en Reino Unido [57].

F) **Enfermedad de Legg-Calvé-Perthes**: Presenta un abanico amplio de patologías desde leves secuelas hasta graves deformidades. Está causada por una irrigación insuficiente o nula que conduce a la necrosis y al bloqueo del proceso de remodelación. El origen de esta enfermedad permanece aún desconocido. La incidencia de esta enfermedad es de 0.4 a 29 niños por cada 100.000 personas inferiores a 15 años [58].

G) **La Osteoporosis** se caracteriza por un drástico descenso en la masa ósea, aumentando la fragilidad y la probabilidad de que se produzca una rotura. La osteoporosis está causada por un desequilibrio entre la resorción-formación de tejido óseo. Esta enfermedad se produce por multitud de factores, dependiendo de su origen se categoriza en dos grupos:

   - **Osteoporosis primaria**: Está principalmente asociado con la edad y la deficiencia en las hormonas como los estrógenos y la testosterona, que con la edad se agrava por la inactivación de las enzimas responsable de su fijación en los tejidos. Se caracteriza por un deterioro paulatino de las trabéculas del hueso.

   - **Osteoporosis secundaria**: Causada por diferentes enfermedades y el uso de distintos fármacos relacionados con la disminución de la densidad mineral ósea. Las enfermedades que afectan a la fijación del calcio, la obtención de la vitamina D o la síntesis de las hormonas sexuales están asociadas a menudo con la osteoporosis secundaria. En el caso de los hombres, está más relacionado con el consumo excesivo de alcohol, hipogonadismo y la ingesta des glucocorticoides. En el caso de las mujeres se ha relacionado más con

hipercalciuria, déficit de calcio y vitamina D, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo o hipercalcemia hipocalciúrica [59].

Es una de las enfermedades óseas más extendidas afectando alrededor de 200 millones de personas de todo el mundo, sin embargo, al ser una enfermedad silente, el número de casos reales sigue sin determinarse. Se estima que en Estados Unidos cada año se producen cerca de 1.5 millones de fracturas relacionadas con la osteoporosis, 700.000 ocurren en la espina dorsal, suponiendo un riesgo adicional [60].

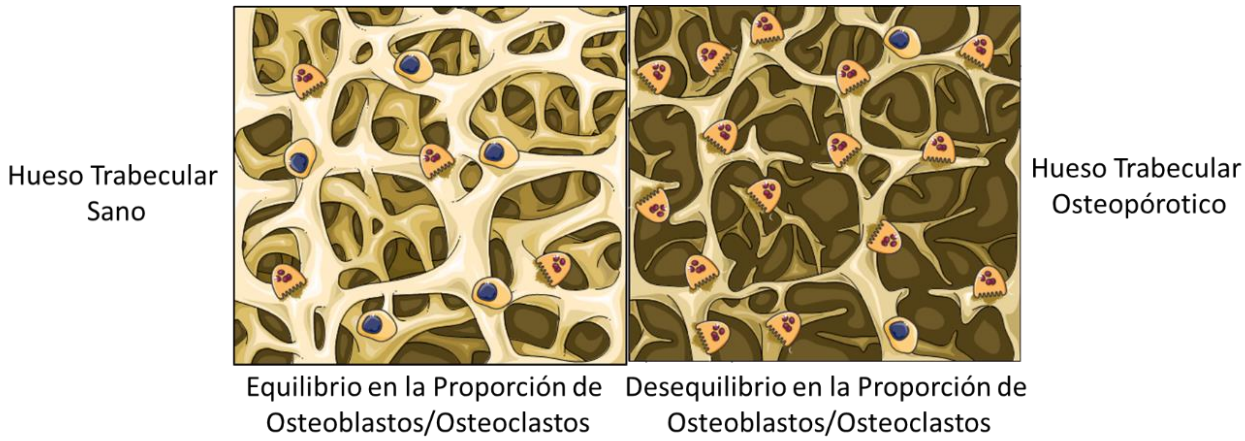


Figura 7. Hueso trabecular en distintos escenarios: Hueso sano y Hueso osteoporótico

I.3 Osteomielitis

La osteomielitis es una enfermedad del tejido óseo causada por la infección de un microorganismo Suele ir acompañada de un proceso de inflamación que destruye gran parte del tejido óseo, así como la irrigación hacia la zona dañada, desembocando en una isquemia.

Es una enfermedad heterogénea en cuanto a su fisiopatología, presentación clínica y su tratamiento. La osteomielitis se clasifica en función de varios aspectos como la patogenicidad, la ubicación dentro del hueso, el periodo de tiempo en desarrollar síntomas.

Hay cuatro tipos descritos:

- **Osteomielitis hematógena**: Está causada por la diseminación del microorganismo por el torrente sanguíneo directamente al interior del hueso. Más del 80% de los casos se dan en personas menores de 17 años, mientras que en adultos se debe a infecciones óseas no resueltas ocasionadas en la infancia. En adultos el foco de infección suele darse en las regiones distales y metáfisis de los huesos largos y las vértebras [61]. El foco primario de infección suele ser, el tracto urinario, piel o tejidos blandos, catéteres intravenosos y endocarditis [62].

- **Osteomielitis secundaria a una infección contigua**: Este tipo de osteomielitis supone la mitad de todos los casos diagnosticados [61]. Se debe a un proceso de infección que prolifera desde una región adyacente al hueso infectada a consecuencia de una fractura [63], a una intervención médica[64], ulceras de decúbito [65] o abcesos dentales [66]. En muchos de los

casos esta osteomielitis sigue una progresión crónica en la que se caracteriza por tejido óseo necrótico, poco vascularizado y en el interior de un tejido blando comprometido, condiciones que vuelven ineficaz cualquier tratamiento o respuesta del sistema inmune [67].

- **Osteomielitis derivada de un riego vascular insuficiente o con una neuropatía concomitante:** Predominante en personas diabéticas [68], este proceso de infección suele derivar de un proceso de infección en los tejidos blandos del pie, debido a que los diabéticos sin diagnosticar o con un tratamiento ineficiente, sufren de una combinación de factores como una isquemia cutánea y ósea de las extremidades así como, una neuropatía motora y sensorial [69,70]

- **Osteomielitis en huéspedes sensibilizados**: Esta clasificación agrupa a todos los pacientes de osteomielitis que se encuentran inmunodeprimidos bajo la influencia de multitud de factores y que han contraído la infección por la ruta hematógena. Se caracterizan por presentar la infección en regiones poco frecuentes para este tipo de patología, como el esternón, la sínfisis del pubis, etc [71,72].

En función de la duración de la infección, se puede clasificar la osteomielitis en aguda o crónica.

- **Osteomielitis aguda y subaguda**: Tiene una progresión rápida que puede evolucionar a lo largo de 10 días si es aguda y de 2 semanas a un mes si es subaguda. Un proceso de infección aguda y sub aguda, se caracteriza por originar edemas, anoxia y formación de pus [73]. En el caso de ser una osteomielitis hematógena con tratamientos antibióticos adecuados, la enfermedad remite al cabo de 2-4 semanas [74] y no suele hacer falta una cirugía [67]

- **Osteomielitis crónica**: Esta osteomielitis, presenta síntomas al cabo de muchos meses, caracterizándose siempre por la presencia de osteonecrosis y falta de vascularización [73]. Dada la carencia de irrigación, los tratamientos convencionales son ineficaces al tratar este tipo de infecciones, haciendo obligatorio la combinación de un tratamiento con antibióticos antes y después de una cirugía para eliminar el tejido necrótico e infectado [75].

A) Escenario de osteomielitis

En la osteomielitis hematógena de los huesos largos, la metáfisis de la tibia o el fémur es donde más se producen este tipo de infecciones. Esto se debe a la presencia de capilares en bucle donde el flujo sanguíneo se ralentiza [76] favoreciendo que las bacterias se establezcan y comiencen un proceso de inflamación. En la mayoría de los casos, las bacterias penetran en el torrente sanguineo a través de pequeños hematomas localizados en las extremidades inferiores, originando bacteriemias transitorias [77].

El primer paso de la infección consiste en el anclaje de las bacterias a la superficie del hueso a fin de eludir la respuesta inmune y proliferar. La colonización se lleva a cabo mediante unas proteínas de anclaje a la matriz extracelular llamadas adhesinas que interaccionan específicamente con distintos componentes proteícos de la matriz extracelular del huésped. En el caso del tejido óseo, interaccionan con fibronectina, fibrinógeno, colágeno, eslastina, laminina, trombospondina, sialopretínas óseas, etc

[78]. Una vez colonizado el hueso, comienza un proceso de infección aguda, dando lugar a una celulitis local, seguido de la degradación de los leucocitos, aumento de la presión sanguínea, descenso de la cantidad de oxígeno y de pH, condiciones que favorecen más el establecimiento de la infección y su propagación por el hueso, avanzando por los canales de Havers y Volkmann. La situación se vuelve cada vez más comprometida al perderse capilares y segmentos de hueso cortical y esponjoso, dificultando cada vez más respuesta inmune [79].

Para que la infección se establezca, los microorganismos tienen que eludir la respuesta inmune innata del huésped. Para ello, disponen distintos mecanismos como toxinas, proteasas, cápsulas o biofilms de polisacáridos. A medida que la población de bacterias crece las condiciones del medio circundante cambian y sirven de señal para que la población bacteriana module la expresión de los genes responsables de su adhesión, evasión del sistema inmune y secreción de toxinas, conocidos generalmente como factores de virulencia. Las señales encargadas de su expresión pueden ser el pH [80], osmolaridad [81], niveles de glucosa [80,82] , incluso temperatura [83] Además de estos mecanismos de evasión de la respuesta inmune, poseen mutaciones o plásmidos que codifican mecanismos para resistir el efecto de los antibióticos o aumentar su patogenicidad [84,85]. El tercer paso que da una población de bacterias es la de promover la invasión o penetrar en el tejido huésped por medio de diferentes hidrolasas o exotoxinas que ataquen a las células del huésped.

Existen tres posibles desenlaces una vez existe una infección activa: La infección se resuelve favorablemente, la infección pasa a ser quiescente y duradera, o convertirse en una infección crónica progresando por todo el hueso y deteriorándolo [86].

En el caso de una osteomielitis hematógena crónica el hueso comienza a degradarse hasta ser necrótico. Cuando algún segmento del hueso cortical necrótico se desprende, el tejido granular lo identifica como una señal para que reabsorba el hueso o para ser eliminado. Sin embargo, el hueso es demasiado grande o la respuesta inmune se encuentra comprometida debido a la perdida de irrigación en el tejido necroso. Esto provoca que la respuesta del organismo se decante por rodear con tejido fibroso, células inflamatorias y hueso neoformado por encima del tejido óseo necrótico (sequestrum), formando lo que se denomina involucrum, manteniendo de esta forma secuestrada toda la zona afectada y dar continuidad esquelética al conjunto. El involucro es una estrategia de último recurso, para contener la infección, sin embargo, la vascularización reducida y la baja tensión de oxígeno hacen ineficaz la respuesta del huésped para reabsorber o eliminar la infección. La remanencia del tejido óseo necrótico supone una plataforma para que las bacterias formen un biofilm y sirvan de puente para el establecimiento de la infección en otra región del huésped [87]. Rara vez este tipo de infección conduce a un proceso agudo en el mismo tejido, pero con el tiempo conducen a isquemias, ulceración y drenajes crónicos [79].

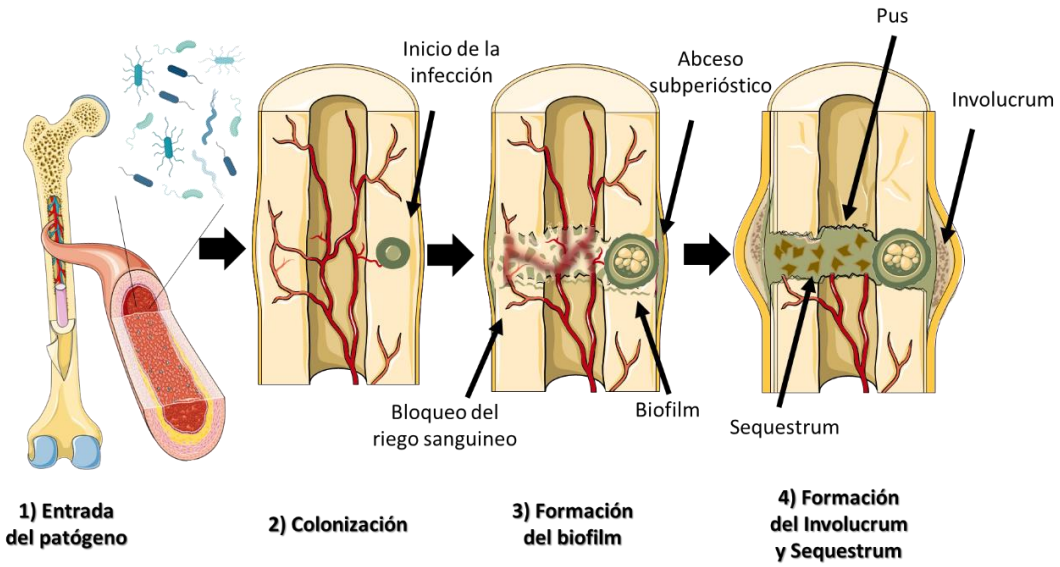


Figura 8. Fases de la osteomielitis. 1) La entrada del patógeno puede darse debido a una lesión en el propio hueso o viajar a través del torrente sanguíneo hasta el tejido óseo. 2) Los microorganismos logran colonizar parte del tejido óseo y comienzan a proliferar. 3) Activación de los factores de virulencia dando lugar a la formación de un biofilm. La infección desemboca en la degradación del hueso y vasos sanguíneos, impidiendo la llegada de células inmunes. 4) El hueso forma el involucrum y para frenar la infección alrededor del sequestrum o tejido óseo.

B) **<u>Cepas bacterianas más comunes en un proceso de infección ósea</u>**

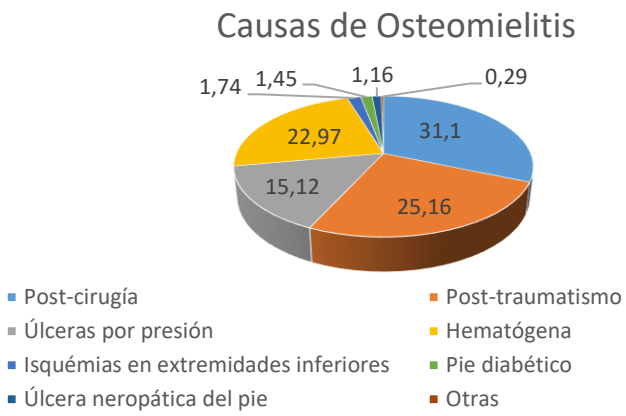


Figura 9. Principales causas asociadas a procesos de osteomielitis [88]

Los procesos de infección ósea están causados por multitud de cepas bacterianas, pero no suelen estar causados por más de una especie bacteriana al mismo tiempo. Estudios recientes, en los que se tomaron muestras microbiológicas en 219 pacientes de osteomielitis crónica, demuestran que en el 88.2% de los casos de osteomielitis crónica, esta causado por una especie microbiana, mientras que solamente el 11.7% esta causado por una población heterogénea de especies. Los cultivos bacteriológicos realizados a partir de segmentos de huesos necróticos revelaron que en el 67.5% de los casos fueron causados por especies bacterianas Gram +, siendo la especie *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) la más predominante (63%). Mientras que de las Gram -, la especie más aislada fue *Escherichia coli* (*E. coli*) (11.7%), seguido de Pseudomonas aeruginosa y Klebsiella pneumoniae [89].

Mientras que en otro estudio del Hospital Universitario Central de Asturias se determinaron las principales causas de infección ósea de entre 1994 y 2015 diagnosticados en el mismo hospital. Como se observa en la **Figura 9.** el principal tipo de infección fue post-operatoria.

Como han indicado en numerosos trabajos [67,79,87], el género *Staphylococcus* es el principal causante de las infecciones óseas y dentro de dicho género, *S. aureus* es la especie bacteriana más presente. Esta bacteria de entre 0,5 y 1,8 µm, pertenece al grupo de las bacterias Gram +, lo que quiere decir que su pared celular está compuesta por multitud de capas de peptidoglicano, ácido lipoteicoco y acido teicoico [90]. Las bacterias del género *Staphylococcus* crecen agrupadas como una única colonia, en tétradas o formando racimos de uvas, razón por la que reciben este nombre, del griego *Staphyle*. *S. aureus* se caracteriza por ser una bacteria inmóvil carente de flagelos, no esporulada ni con cápsula. Sin embargo, se tienen datos de que forma un recubrimiento de polisacáridos conocido como *slime* que cumple un doble objetivo: la adhesión a multitud de células y la evasión inmunitaria [91].

Como la mayoría de las bacterias de este género, es catalasa positiva lo que la permite desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y O_2 [92]. Se la diferencia del resto de especies de S*taphylococcus* por producir coagulasa, una enzima que permite coagular el plasma sanguíneo para protegerse de la respuesta inmune. Otro rasgo para su identificación es la formación de colonias lisas, elevadas brillantes y de bordes enteros. Las colonias presentan consistencia cremosa y pigmentación que va desde el amarillo al dorado debido a la producción de carotenoides. Casi todas las especies del género *Staphylococcus* presentan β-Hemólisis, sin embargo, *S. aureus* produce dos formas de coagulasa, una ligada a la membrana y otra libre que le permite coagular el plasma sanguíneo a diferencia del resto de especies del mismo género [93].

Presenta un metabolismo anaerobio facultativo, a excepción de subespecies (*S.aureus anaerobius* o *S. aureus saccharolyticus*) que crecen exclusivamente de forma anaerobia y además son catalasa negativas.

S. aureus es una bacteria ampliamente distribuida por el mundo, presentando una prevalencia de aproximadamente el 30% de la población colonizada, pero no infectada, siendo una de las bacterias comensales más habituales de las fosas nasales, manos y axilas. La colonización por esta bacteria es tan común que en diversos estudios de cohorte en los que se les ha repetido durante un largo periodo de tiempo, se ha demostrado que el 20% de los participantes portaban de forma permanente la bacteria, mientras que otro 20% de los participantes nunca llegaron a portar la bacteria y el 60% restante, portaba la bacteria de forma intermitente [94].

Otra de las especies más comunes en las infecciones óseas es *E. coli* [89]. Pertenece al grupo de las Enterobacterias. Se caracteriza por presentar una morfología de bacilo de unos 2 µm de largo y hasta 1 µg de diámetro [95], con múltiples flagelos que le permiten desplazarse por múltiples medios y completamente rodeado de fimbrias [96]. Pertenece al grupo de las Gram -, lo que significa que su pared celular de peptidoglicano es fina y está rodeada de dos membranas celulares lo que le permite resistir presiones osmóticas relativamente elevadas. *E. coli* no produce formas esporuladas y a

excepción de las cepas patógenas, no produce capsulas mucilaginosas [97]. E coli se puede identificar mediante su siembra en medios selectivos como el agar MacConkey en donde crece formando colonias rosas, opacas circulares de 2 a 4 mm de diámetro, de bordes enteros y suaves. Se caracteriza por ser oxidasa negativa, catalasa positiva, producir indol a partir de triptófano y ser capaz de utilizar el citrato como fuente de carbono. Tiene un metabolismo anaerobio facultativo basado en la fermentación mixta obteniendo dando como producto grandes cantidades de CO_2 y H_2 lo que provoca la acidificación del medio donde crece [98].

Tabla 1. Especies bacterianas más frecuentes y enfermedades óseas derivadas [99].

Microorganismo	Osteomielitis	Infección asociada a un implante	Artritis articular
Staphylococcus aureus	●	●	●
Staphylococcus pyogenes	●	●	●
Staphylococcus agalactiae	●	●	●
Haemophilus influenzae	●		●
Especies Enterocócicas	●	●	●
Pseudomonas aeruginosa	●	●	
Serratia marcescens	●		
Propionibacterium acnés	●	●	
Finegoldia magna		●	
Neisseria gonorrhoeae			●
Kingella kingae			●
Streptococcus pneumoniae		●	●

Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal de los infantes a las pocas horas de vida, produciéndose una relación simbiótica entre la bacteria y el huésped, formando de esta forma uno de los microorganismos que forman parte de nuestra flora intestinal [100].Sin embargo, cuando el huésped esta inmunodeprimido, o las barreras inmunitarias del tracto gastrointestinal se encuentran mermadas, todos los microorganismos presentes en la flora pueden causar una infección. Sin embargo, incluso en un estado de salud robusto, determinadas cepas de *E. coli* portan factores de virulencia para infectar al huésped. Las afecciones más recurrentes por esta bacteria son: infecciones en el tracto urinario, sepsis/meningitis, enfermedad entérica/diarreica y en menor medida infecciones óseas. Las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican en dos grupos principalmente: las que producen infecciones en el tracto gastro intestinal, conocidas como *E. coli* diarrogénicas (con seis patotipos clasificados en virtud de su patogenicidad) y las cepas causantes de infecciones fuera del tracto gastrointestinal, denominadas *E. coli* extraintestinales [97], done se encuentran las cepas causantes de osteomielitis.

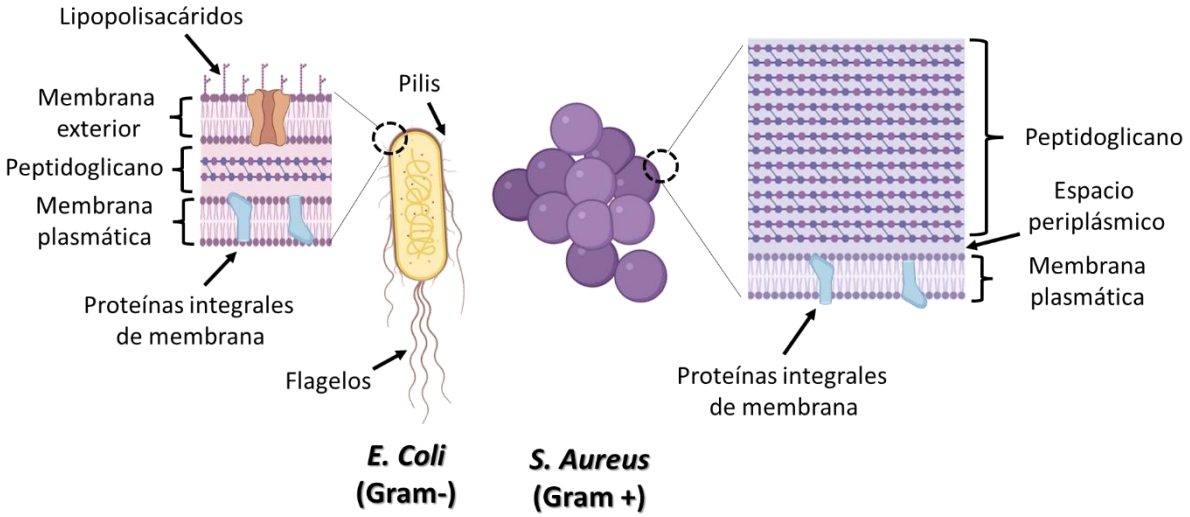


Figura 10. Diferencias entre bacterias Gram- y Gram+.

C) Mecanismos bacterianos implicados en la infección ósea

Los microorganismos patógenos han desarrollado todo un armamento biológico para obtener recursos del huésped a la par que evade su respuesta inmune. Se conoce con el nombre de **factores de virulencia** a todos aquellos factores que están asociados con su patogenicidad y que ayudan a superar las defensas del huésped. Los factores de virulencia intervienen en una o varios de las fases generales de un proceso de infección: anclaje al huésped, penetración dentro del huésped, establecimiento de una población inicial, invasión del tejido diana, crecimiento y multiplicación, daño en el tejido u órgano diana y salida del huésped [101].

Entre las estrategias más comunes para el anclaje, destacamos las siguientes:

- **Glicocálix**: Es una envuelta de glicoproteínas y proteoglicanos de elevado peso molecular que recubre la pared celular. Si el glicocálix es rígido y está organizado en una comprimida matriz, se le conoce como cápsula y sirve para resistir condiciones de desecación, condiciones hostiles para las bacterias, ayudar en la adhesión y evitar la fagocitosis. Cuando el glicocálix es difuso y desorganizado, recibe el nombre de *slime* y su función parece que está más enfocada a evitar la fagocitosis que aumentar la adherencia [102].

- **Fimbrias**: Apéndices filamentosos que permiten el anclaje a diversas superficies y median un tipo de fagocitosis dependiente de fimbrias para introducirse dentro de las células del huésped para evadir la respuesta inmune [103].

- **Lectinas**: Pequeñas proteínas que sirven para unirse a carbohidratos que se encuentran en la superficie de la membrana de las células del huésped. Estas proteínas son imprescindibles para la posterior formación del biofilm [104].

- **Ácido teicoico y lipoteicoico**: son componentes de la pared celular de las Gram +, con propiedades adherentes a diversos epitelios. También se ha visto que juegan un papel importante en la homeostasis, tráfico de iones nutrientes y expulsión de antibióticos [105]

Por lo general, los microorganismos patógenos siempre se introducen en el huésped a través de la piel, la membrana mucosa o la sangre. Una vez los microorganismos patógenos superan las barreras físicas del huésped, emplean unos factores de virulencia conocidos como factores de propagación que les sirven para encontrar su tejido diana o introducirse en el riego sanguíneo para hallarlo. Estos factores son enzimas como las colagenasas [106], hialuronidasas [107], neuraminidasas [108]. o receptores y quinasas específicas de plasminógeno [109] que se encargan de degradar el principal soporte que sustenta un tejido a la par que burlan el reconocimiento inmune.

Tras el anclaje e invasión del huésped, el microorganismo tratará de evadir la respuesta inmune por distintas vías como la destrucción de anticuerpos [110], bloquear el sistema del complemento[111], leucidinas [112], introducirse dentro de células del huésped [113], revestirse de antígenos del huésped [109], secretar superantígenos, etc.[114].

Probablemente el factor más importante en el desarrollo de una osteomielitis crónica es la formación de un biofilm. Un biofilm es una comunidad de microorganismos que crecen embebidos en el interior de una matriz de exopolisacáridos y adheridos a un tejido vivo o a una superficie inerte [115]. Se considera hoy en día, que todos los microorganismos bajo las condiciones adecuadas son capaces de formar un biofilm.

Aunque la composición difiere entre las especies bacterianas, el principal componente es el agua suponiendo hasta el 97% del contenido total. El porcentaje restante lo constituye un complejo principalmente formado por exopolisacáridos [116], proteínas, DNA, desechos y productos resultantes de la lisis de las bacterias [117].

Los biofilms se forman una vez los microorganismos se han adherido. En el caso de las Gram - , juegan un papel crucial los flagelos, las fimbrias tipo I, IV y los curli [118], aunque no son imprescindibles, pues muchas bacterias Gram + carentes de estos mecanismos, como el género *Staphylococcus* son capaces de formar biofilms. Diversos autores han señalado que el ácido teicoico juega un papel crucial en la adhesión y formación del biofilm en el caso de las Gram + [87]. Una vez adheridas a la superficie, las bacterias proliferan y forman colonias de una forma similar a lo que ocurre en una placa de agar. Cuando se alcanza una población de bacterias suficientemente elevada, las señales célula-célula entre las bacterias activan genes codificantes de factores de virulencia. La expresión de determinados factores de virulencia, dan lugar a que las bacterias comiencen a secretar los exopolisacáridos que constituyen la matriz del biofilm formando estructuras semejantes a “columnas” [115], con una arquitectura interna de canales para permitir el intercambio de agua, nutrientes y oxígeno. Sin embargo, la existencia de estos canales no evita que dentro del biofilm las condiciones de nutrientes, pH y oxígeno varíen [119].Una vez se ha alcanzado una población elevada dentro de las columnas de biofilm, las bacterias se liberan para adherirse a nuevas superficies, iniciando de nuevo el proceso de colonización y formación de biofilm. La protección que otorga a las bacterias, permite que sean capaces de desarrollar resistencia a los fármacos con los que son tratados [120–122] y supone un mecanismo eficaz para burlar la respuesta adaptativa del sistema inmune [123,124] (**Figura 11**).

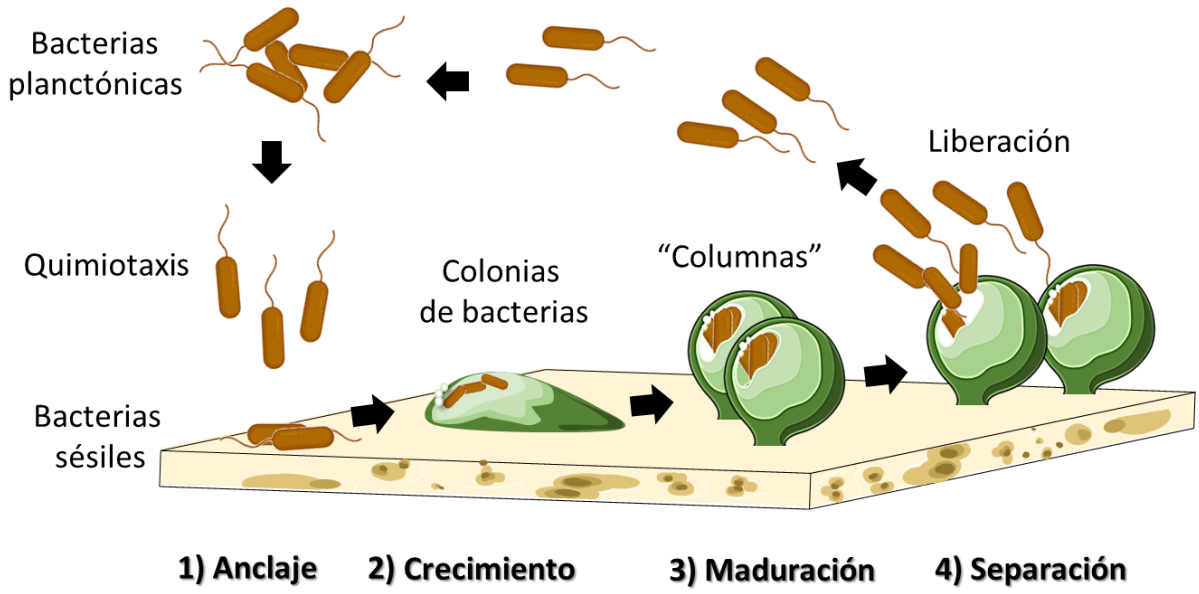


Figura 11. Proceso de formación de un biofilm.

Uno de los mecanismos que recientemente han llamado más la atención son la formación de variantes de colonias pequeñas (SCV). Las SCV son subpoblaciones de bacterias que se caracterizan por tener un crecimiento lento y auxótrofo, es decir, requieren de un nutriente específico para proliferar adecuadamente, y unos rasgos fenotípicos y patogénicos distintivos [125]. Estas SCV suelen aparecer en infecciones crónicas que están sujetas a condiciones de presión selectiva por el medio ambiente, ya sea en el interior de un huésped o por la presión de los antibióticos, que dan lugar a mutaciones espontáneas en determinados genes [126].

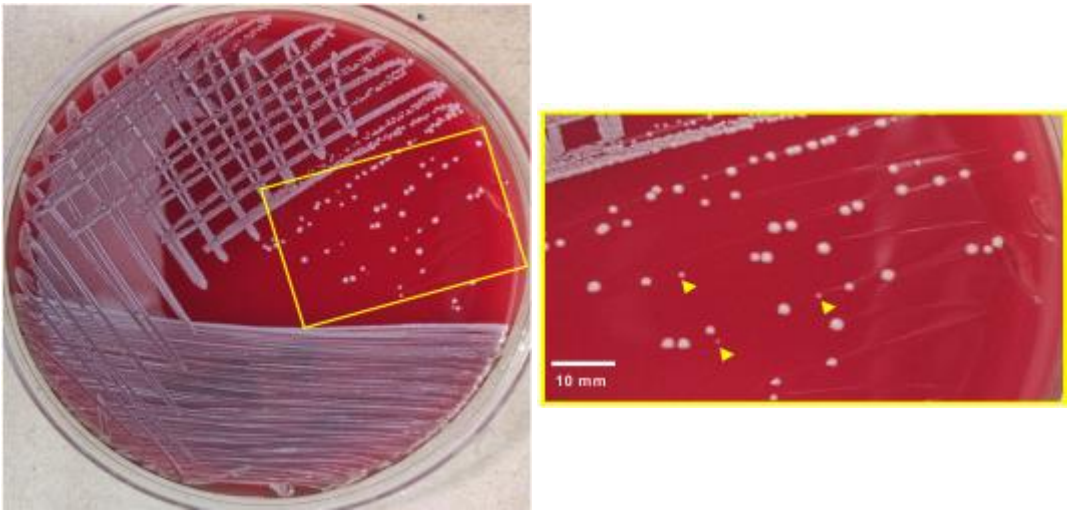


Figura 12. Placa de agar sangre después de 24 h a 37 °C que muestra el fenotipo SCV (flechas amarillas) y sus contrapartes WT. Las cepas de SCV aparecen como colonias puntiformes blancas, aproximadamente 10 veces más pequeñas que el fenotipo WT S. epidermidis. Reproducido de la referencia [127] con permiso de *Microbes Infect*.

Las SCV de *S. aureus* reprimen la ruta de los ácidos tricarboxílicos, produciendo un aumento de la glicólisis y a su vez en un aumento en la producción de polisacáridos de la cápsula, aumento de la producción de adhesinas [128,129], reducción en la producción proteínas de unión a inmunoglobulinas

G [129], elevada producción de biofilms [130–132] y una disminución de proteínas α-hemolisina [128–130]. Además, en diversos estudios, se han detectado resistencias frente a vancomicina, linezolid, rifampicina y a ciprofloxacino [133], e incluso fluoroquinolonas [134]. Estas características conducen a la formación de colonias muy reducidas, con menos patogenicidad y una optimizada capacidad para mantener la infección de forma persistente. Estas variantes se han observado en diferentes especies como *Burkholderia pseudomallei* [135], *Pseudomonas aeruginosa* [136], *Enterococcus faecalis* [137], *E. coli* [138] y *S. aureus* [139], entre otras. Las SCV se han encontrado como uno de los causantes de la osteomielitis hematógena, osteomielitis secundaria a una infección contigua [140], osteomielitis crónica [141–143] e infecciones asociadas a prótesis [144].

I.4 Protocolos de actuación frente a una infección ósea

A) <u>Actual medida estandarizada</u>

El tratamiento de la osteomielitis requiere un abordaje multidisciplinar y la colaboración de diferentes especialistas. Si el paciente sufre de una osteomielitis aguda, todos los esfuerzos deben dedicarse a establecer cuanto antes un tratamiento con antibióticos efectivo. Para saber que antibiótico emplear, se ha de identificar la especie del microorganismo patógeno, así como los datos epidemiológicos locales sobre las resistencias del microorganismo responsable de la infección. Dado que la cepa *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) es uno de los patógenos que da lugar a una mayor gravedad de la enfermedad y tiene el peor pronóstico clínico [145], en función de la prevalencia local de esta cepa, se ha propuesto un régimen diferente de tratamiento con antibióticos (**Tabla 2)** [146]**.**

La administración habitual de los antibióticos ha sido siempre por vía intravenosa durante 4-6 semanas, sin embargo, los últimos estudios apuntan a que el tratamiento intravenoso de 2-4 días seguido de 20 días de tratamiento oral tiene los mismos resultados. En casos de ostemielitis aguda se desaconseja recurrir a procedimientos quirúrgicos, dado que en el 90% de los casos el tratamiento exclusivo con antibióticos es efectivo, sin embargo, si el paciente no responde al tratamiento en pocos días, si es aconsejable realizar pequeñas perfusiones o drenajes para acelerar el proceso [146]**.**

Si el paciente sufre una osteomielitis crónica, no se puede erradicar la infección sin un tratamiento de antibióticos acompañado de un proceso quirúrgico de drenaje y eliminación del tejido óseo muerto denominado desbridamiento. Si no se realiza un desbridamiento agresivo y completo, los microorganismos que residen en el hueso muerto, pueden causar brotes muchos años después. Durante la operación es necesario eliminar todas las capas de biofilm e incluso eliminar parte del tejido sano, a fin de garantizar la eliminación completa de los microorganismos [147]. Si el defecto óseo supera el tamaño crítico, es decir, el tamaño máximo de un defecto óseo que puede regenerarse de forma natural [148], es necesario rellenar el tejido muerto con implantes de tejido local vascularizado duradero, como injertos autólogos de hueso esponjoso procedentes de la cresta iliaca, fémur distal o tibia proximal, siendo actualmente el método estándar [149]. Tras la operación, la pauta general consiste en realizar un cultivo microbiológico a partir de muestras del paciente para identificar el patógeno causante, así como su susceptibilidad a antibióticos, para dirigir un tratamiento

personalizado y eficaz [150]. Por último, muchos autores recomiendan un tratamiento, similar al empleado para osteomielitis aguda, de 4-6 semanas con antibióticos por vía parenteral, basándose en que la revascularización del hueso tarda entre 3 y 4 semanas, permitiendo que los antibióticos lleguen a la zona afectada. En cuanto a la vía de administración de antibióticos frente a osteomielitis crónica y la duración del tratamiento siguen siendo temas controvertidos, ya que no están apoyadas en estudios sólidos y se basan más en costumbres que en evidencias. Algunos autores recomiendan ampliar el tratamiento intravenoso a 6-8 semanas de dosis altas seguido de 3 meses o más de tratamiento oral [151]. Pero esta medida aún está en tela de juicio ya que diversos estudios indican que el tratamiento prolongado con antibióticos, lejos de ser beneficioso, se ha asociado con efectos adversos de los fármacos, elevados costes sanitarios, desarrollo de cepas resistentes [152] y la aparición de fenotipos SCV [141–143].

Tabla 2. Tratamiento con antibióticos frente a Osteomielitis aguda en niños. Adaptada de la referencia [146] con permiso de Massachusetts Medical Society.

Antibiótico	Dosis mg/Kg/Día	Dosis diaria Máxima	Penetración en el hueso
Cefalosporinas de primera generación, si la prevalencia del MRSA en la localidad es <10%	150 dividido en 4 dosis iguales	2-4 g	6-7
O			
Cloxacilina, flucloxacilina, dicloxacilina, nafcillina, o oxacilina.	200 dividido en 4 dosis iguales	8-12 g	15-17
Clindamincina , si la prevalencia del MRSA en la localidad es >10% y la prevalencia de *S. aureus* resistente a clindamincina es <10%.	40 dividido en 4 dosis iguales	3 g	65-78
Vancomicina, si la prevalencia del MRSA en la localidad es >10% y la prevalencia de *S. aureus* resistente a clindamincina es >10%.	40 dividido en 4 dosis iguales o 45 dividido en 3 dosis iguales	La dosis se ajusta según los niveles sanguíneos con un objetivo de 15-20µg/mL de nivel mínimo	5-67
O			
Linezolid si la vancomicina no es efectiva.	30 dividido en 3 dosis iguales	1,2 g durante un periodo no superior a 28 días	40-51
Ampicilina o amoxicilina frente estreptococos beta-hemoliticos grupo A, *Haemophilus influenzae* tipo B y *S. pneumoniae.*	150-200 dividido en 4 dosis iguales	8-12 g	3-31
Cloranfenicol si no hay disponible otro antibiótico.	75 dividido en 3 dosis iguales	2- 4 g	39

A pesar de los avances logrados en la industria farmacológica y en las técnicas quirúrgicas, se siguen presentando casos de osteomielitis crónica recurrente [153]. Muchos expertos indican que una vez el hueso contrae una infección crónica, este tejido puede estar infectado durante toda la vida, a menos que se realice una amputación de la zona afectada. De hecho, sugieren que el termino más adecuado para la obtención de resultados positivos, sea el de "detención", o "remisión", en lugar que el de cura [154]. La tasa de remisión de la osteomielitis crónica está en entredicho, oscilando desde un 40% [155,156] hasta alcanzar un máximo de 80% [147,157], pero hay que destacar que el alto porcentaje de remisión se debe a que se estudia en periodos muy cortos de tiempo [158], o en estudios de osteomielitis hematógena en niños [159].

B) Tipos materiales destinados a la reconstrucción ósea

En determinadas circunstancias a causa de un proceso de infección, una fractura u otro proceso patológico pueden formarse defectos óseos, lo suficientemente grande como para superar la capacidad regenerativa del tejido, esto es lo que se conoce como tamaño crítico [148]. En numerosos casos, los defectos óseos pueden desencadenar fracturas que dificultan en gran medida dicha regeneración. En este sentido, la gestión del defecto óseo adquiere la misma o mayor relevancia que el tratamiento de la patología que la ha originado.

Independientemente del origen causal, si el defecto óseo supera el tamaño crítico, es necesario implantar un material que permita continuar la funcionalidad del tejido y a la vez promueva la regeneración del defecto. Para ello hay que tener en cuenta una serie de característica debe cumplir el material [160]:

- **Osteoconducción**: Es la propiedad de un material que permite el crecimiento de hueso nuevo en su superficie. Este proceso involucra un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimales, desde el tejido óseo sano al injerto. Este crecimiento debe ser previsible y estar determinado por la biología del injerto y la arquitectura del hueso.

- **Osteoinducción**: La capacidad de un material de estimular, por medio de sus productos de degradación, el reclutamiento de las células del linaje osteogénico y favorecer su diferenciación a osteoblastos, de forma que a su vez se favorezca la formación de tejido óseo nuevo.

- **Osteointegración**: Es el proceso por el cual se forman enlaces fuertes entre el injerto y el tejido óseo recién formado, produciéndose un puente estructural y funcional entre el implante y el hueso.

Además de estas 3 características indispensables se requiere que el sustituto óseo no desencadene una respuesta inflamatoria, debe poder encapsularse e integrarse en el hospedador, ser biocompatible, reabsorbible, estructuralmente similar al hueso, fácil de usar y rentable.

De modo que esta problemática ha conducido a diversos autores a proponer alternativas al procedimiento convencional. A continuación, se comparan las diversas alternativas propuestas para solucionar esta problemática:

Implantes Óseos

1. **Autoinjerto**: Es el procedimiento estándar y el más exitoso, ya que contiene matriz ósea, factores de crecimiento, osteoblastos y células osteoprogenitoras [161,162]. El problema de este procedimiento es que la cantidad de tejido óseo del donante es limitado y la morbilidad elevada que se causa en la región donante. Además, este procedimiento no aborda la posibilidad de que queden bacterias remanentes en la región receptora del donante.
2. **Aloinjerto:** Se trata de implantes óseos procedentes de otra persona. Estos implantes son osteoconductores y osteoinductivos. Para evitar una respuesta inmune se procesan para eliminar su componente celular, limitando su capacidad osteogénica. Estos implantes pueden transmitir ciertas enfermedades presentes en el huésped que no son abordadas durante su procesamiento [163].
3. **Xenoinjerto:** El tejido óseo proviene de otra especie, generalmente de vaca o cerdo. Estos implantes son osteoconductores y parcialmente osteoinductores. Al igual que los aloinjertos, se procesan para evitar una respuesta inmune. El procesamiento es más agresivo que en los aloinjertos, pues existe un mayor riesgo de contraer zoonosis [163].

Implantes Sintéticos

1. **Implantes Metálicos**: En la actualidad, las aleaciones de cobalto y cromo, o titanio son las más utilizadas debido a que se consideran inertes y de entre todos los materiales, son los que tienen mejor resistencia mecánica. Sin embargo, en ambientes fisiológicos con el paso del tiempo comienzan a corroerse y a presentar toxicidad [164].
2. **Polímeros**: Este grupo de materiales presenta la capacidad de regular la tasa de liberación de fármacos cargadas en su interior, mediante el grado de polimerización del mismo [165]. Se han desarrollado diversos polímeros sintéticos como el ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólido o la policaprolactona (PCL), sin embargo, solamente el polimetilmetacrilato (PMMA), ha llegado a aplicarse en la clínica. Este material se obtiene de la polimerización del monómero metilmetacrilato y habitualmente se emplea para formar cuentas impregnadas de fármacos, de forma que funciona como soporte y sistema de liberación de fármacos local [166–169]. Su utilización en la clínica ha reportado un éxito del 91.4% de 128 casos de osteomielitis crónica [170]. Sin embargo, el material no es biodegradable y su manufacturación a 100ºC limita el tipo de fármaco con el que se puede impregnar. Además, numerosos estudios señalan que este procedimiento genera con el tiempo resistencias a antibióticos [165,171] y fenotipos SCV [143].
3. **Cerámicos**, se pueden destacar:
    a. **Fosfatos de calcio:** Son materiales osteoconductores y bioactivos. Un ejemplo, son los materiales basados compuestos de HA estequiométrica, semejante al componente

mineral del hueso, difieren en que la HA del hueso es deficiente en calcio y presenta fases hexagonales. Otro ejemplo son los fosfatos de calcio bifásicos (BCP) estos materiales combinan HA y fosfatos tricálcicos β. Estos materiales en condiciones fisiológicas promueven la formación de HA carbonatada, similar a la producida naturalmente en el hueso. Además, dichos materiales son osteoinductores y reabsorbibles a diferencia de los materiales basados en HA [172,173]

b. **Vidrios bioactivos**: Son materiales basados en sílice con una composición originaria de SiO_2—CaO—Na_2O—P_2O_5. Cumplen todas las propiedades necesarias que debe presentar un injerto óseo. Forman enlaces fuertes con el hueso, de modo que se osteointegran, son osteoconductores, oesteoinductores y angiogénicos [174,175]. Cuando estos materiales se exponen a líquidos que simulan soluciones fisiológicas acuosas, se forma una capa de gel rica en sílica en la que los iones Ca^{2+}y PO_4^{2-} se combinan para formar hidroxiapatita, muy similar a la base mineral al hueso [176]. Estos materiales no tienen la suficiente porosidad como para emplearlos como vehículos de antibióticos, pero se demostró que tenían propiedades antibacterianas [177]. Algunos autores han realizado estudios clínicos con estas biocerámicas frente osteomielitis obteniendo una eficacia del 88.9% [178] o del 100% tras un seguimiento de 17.3 meses [179].

4. **Materiales compuestos**: Son materiales compuestos de materiales y fases sintéticos mezclados heterogéneamente. Esta clasificación abarca un sinfín de materiales que son compuestos normalmente entre polímeros y compuestos orgánicos. Dentro de esta categoría hay diversos productos que han pasado la fase clínica y han llegado a comercializarse como por ejemplo Cerament™[180], discos formados de sulfato de calcio e hidroxiapatita. Dicho material presenta propiedades minerales que imitan la composición mineral del hueso, es biocompatible, reabsorbible y no desencadena una respuesta citotóxica. Además, ha mostrado ser efectivos como transportador de antibióticos al alcanzar concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus* de 93 y 200 % superior a las establecidas por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. El inconveniente de este material es que la liberación de antibiótico solamente es eficaz durante 10 días.

I.5 Vidrios mesoporosos bioactivos (MBG)

A) Antecedentes y evolución de los biomateriales en base sílice

En los años 60 comenzaron a desarrollarse los primeros biomateriales, más adelante conocidos como biocerámicas de primera generación, enfocados en la idea de rellenar defectos óseos con un sustituto inerte con el que formara enlaces sólidos [181]. Estos materiales de ZrO_2 y α-AlO_3 [182], se caracterizaban por ser inertes, aportar resistencia mecánica y elevada estabilidad química, lo que ha hecho que ganen su posición en la actualidad en determinadas prótesis [173]. El enfoque posterior de la década de los 70, consistió en que los materiales debían mejorar su bioactividad, mientras que intentaban alcanzar las propiedades mecánicas propias del tejido óseo. A estos materiales se les

conoció como biocerámicas de segunda generación [181]. Estos materiales se caracterizaron por permitir la osteointegración, sin desarrollar la capsula fibrosa, inflamación o toxicidad a consecuencia de sus productos de degradación [183]. Dentro de las biocerámicas de segunda generación podemos clasificar los materiales en dos grupos: Los pertenecientes a la clase A, caracterizados por favorecer la osteointegración, la osteoconducción y eran biodegradables [184]; y agrupados dentro de la clase B, que consistían en materiales únicamente osteoconductores [185]. Los pertenecientes a la clase A fueron los que sentaron las bases para el desarrollo de los siguientes materiales a sustituir el implante. Estos materiales presentaban una superficie bioactiva, es decir, reactiva a fluidos fisiológicos que les permitía formar fases de hidroxiapatita en su superficie, de una composición y estructura muy semejante a las del hueso [186,187]. Estas características presentaban dos grandes ventajas: la formación de una fase de hidroxiapatita en la unión entre el hueso y el implante permitía la formación de enlaces robustos entre el tejido óseo y el material, manteniendo sujeto el implante, y por otra parte, la degradación gradual del material permitía asentar la base mineral del hueso a medida que el tejido óseo comienza a sustituir el implante [188]. En este sentido, el control de la solubilidad del material era un aspecto crucial en la regeneración ósea, pues si el material era demasiado soluble, se degradaría antes de que el hueso tuviese tiempo de regenerar el defecto óseo, y un material, por el contrario, más insoluble sería menos biodegradable y estaría entorpeciendo la remodelación y regeneración del defecto.

La biocerámicas de tercera generación fueron los materiales que además de las características precedentes de la primera y segunda generación, incluían la osteoinducción, el reclutamiento, proliferación y diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos [183,189]. Dentro de las biocerámicas de tercera generación destacan los vidrios bioactivos. Estos vidrios, descubiertos por L. Hench en 1971, tenían una composición inicial de SiO_2–CaO–Na_2O–P_2O_5 y se obtenían mediante el método de fusión y enfriamiento rápido [182,190]. Cada elemento de la composición juega un papel importante en la función del material: El SiO_2 y el P_2O_5 funcionan como formadores de red vítrea, mientras que el CaO y el Na_2O reducen la temperatura de fusión de los componentes, además de que actúan como modificadores de red aumentando de esta forma la reactividad del material en fluidos fisiológicos [191]. Además el intercambio de cationes con el medio circundante es necesario para que se desarrolle el proceso de bioactividad *in vivo* [192]. Dicho proceso puede resumirse en el siguiente esquema [193]:

1. Rápido intercambio entre los cationes Na^+/Ca^{2+} con H^+ entre el material y el medio.
2. Incremento del pH, que a su vez da lugar a la rotura de los enlaces Si-O-Si formando más grupos silanoles en la superficie del material.
3. Condensación de los grupos silanoles cerca de la superficie del material, dando lugar a una repolimerización de la capa más expuesta al medio.
4. Formación y nucleación de una capa superficial de fosfato de calcio amorfo

5. Incorporación de grupos hidroxilos y carbonatos presentes en el medio circundante a la capa rica en fosfato de calcio amorfo, formando HA.

Seguido de estas reacciones químicas el material, per se, irá adsorbiendo diferentes proteínas en su superficie. El tejido óseo por su parte, ira produciendo una respuesta biológica acorde a los cambios que se producen en la fase entre el hueso y el implante [194]:

6. Adsorción de moléculas orgánicas en la capa de HA
7. Activación y acción de los macrófagos en la superficie del material
8. Reclutamiento y unión de las células mesenquimales a la superficie del material.
9. Diferenciación de las células hacia líneas osteogénicas.
10. Generación de la nueva matriz extracelular del tejido óseo.
11. Cristalización de la matriz.

El proceso de bioactividad se pudo estudiar a fondo gracias al desarrollo del fluido corporal simulado (SBF) por Kokubo en 1990 [195]. La formación de una fase de apatita en la superficie de los materiales al entrar en contacto con el SBF suponía un claro indicio de que los biomateriales presentarían una respuesta bioactiva en condiciones *In vivo.* Hoy en día, es una de las técnicas más utilizadas para la evaluación de la bioactividad de los nuevos biomateriales y su empleo es en este campo resulta imprescindible [196].

En la misma década, se realizaron numerosos progresos en el área de los biomateriales permitiendo la transición de los materiales obtenidos por fusión a los obtenidos mediante la técnica sol-gel. Los nuevos materiales incrementaron todavía más sus características texturales como la porosidad y superficie específica lo que permitía establecer un intercambio de iones más rápido con el medio circundante y por tanto incrementar la respuesta bioactiva de los materiales en medios fisiológicos [197]. En 1990, se sintetizaron los primeros materiales de silice mesoporosa gracias a la incorporación de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) como agente director de estructura al proceso de síntesis de SiO_2 a partir de alcoxilanos, obteniéndose así el Mobil Composition of Matter (MCM-41) [198]. En 2001, la profesora Vallet-Regí propuso el uso de este material como soporte y vehículo para la liberación sostenida de fármacos, primero con ibuprofeno como fármaco modelo [199] y años más tarde con un antiosteoporótico, el alendronato [200]. Sin embargo, a pesar de su elevada superficie específica (1000 m^2/g), volumen de poro de 0.5 cm^3/g y su estructura mesoporosa ordenada, no daban lugar a una respuesta bioactiva debido a su bajo contenido en grupos silanol [201]. Más adelante surgieron materiales bioactivos como el Santa Barbara Amorphous-15 (SBA-15) que poseía poros interconectados y de mayor tamaño que los materiales MCM-41 y su variante MCM-48. El material 1%P-MCM-41, fue una alternativa que se basó en el dopaje con fósforo al 1% sobre el material MCM-41 clásico, lo que permitió obtener una respuesta bioactiva, así como la formación de fases de apatita en tan solo 15 días, lejos de los 60 días necesarios para su obtención en la composición de MCM-48.

Otra estrategia que se llevó a cabo consistió en la adición de porcentajes reducidos (10%) de vidrios bioactivos a la composición MCM-41, lo que permitió acelerar la respuesta bioactiva a 1 día.

En este sentido, el reto supuso obtener materiales que combinasen las propiedades sobresalientes de las matrices mesoporosas ordenadas con el comportamiento bioactivo de los vidrios bioactivos sol-gel convencionales. Mediante el método de autoensamblaje inducido por evaporación (EISA) se obtuvo la combinación de dichas características [202]. La culminación de estos avances llegó de la mano del grupo del profesor Zhao en 2004, cuando se planteó la combinación de los últimos avances logrados en el campo de la química sol-gel junto con los obtenidos en la química supramolecular de los surfactantes [203]. De esta forma se obtuvieron biocerámicas de composición SiO_2─P_2O_5─CaO con propiedades texturales y una respuesta bioactiva sin precedentes. Además, la estructura altamente ordenada abrió la posibilidad de su aplicación dual como soporte óseo y plataforma de liberación de biomoléculas como ya propuso la profesora Vallet-Regí con la composición MCM-41 [204]. De este modo se descubrieron los vidrios mesoporosos bioactivos.

B) <u>Proceso de síntesis de los MBG</u>

El proceso de síntesis de los vidrios mesoporosos bioactivo se basa en la metodología descrita por Brinker en 1999, conocida como Autoensamblaje inducido por evaporación [205]. Este proceso permitía desarrollar estructuras mesoporosas en presencia de cationes que más adelante serían conocidos como modificadores de red, mientras que en los procesos de síntesis hidrotermales convencionales interferían en la interacción SiO_2-surfactante, impidiendo desarrollar estructuras ordenadas.

La síntesis se basa en el empleo de surfactantes que actúan como agentes directores de estructura, acompañada de los precursores correspondientes de SiO_2, P_2O_5 y CaO, diluidos abundantemente en disolventes volátiles. El proceso se lleva a cabo en tres etapas:

- **Química supramolecular:** Dado el carácter anfifílico del surfactante, dichas plantillas supramoleculares pueden agruparse mediante interacciones no covalentes como enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y fuerzas electrostáticas entre sus cadenas apolares y extremos polares, dando lugar a diferentes conformaciones de micelas dependiendo de la naturaleza del surfactante. Sin embargo, al comienzo del proceso de síntesis, el elevado porcentaje de disolventes orgánicos impide que dichas molécula se organicen en micelas y se encuentren desorganizadas [206].

- **Autoensamblaje inducido por evaporación:** A medida que la temperatura de la mezcla comienza a subir hasta alcanzar la temperatura óptima de síntesis (40 ºC), se produce una evaporación gradual del disolvente orgánico. La disminución del volumen del disolvente orgánico da lugar a que la concentración de precursores y surfactante aumente alcanzando un punto crítico denominado concentración micelar crítica, en la que se produce un reordenamiento y organización de las plantillas supramoleculares, dando lugar a la formación de micelas, de forma que la región hidrófoba del surfactante queda escondida en el interior,

mientras que la hidrofílica queda expuesta a la disolución. Obteniéndose de esta forma mesofases ordenadas [207], en nuestro caso con una disposición de tubo hexagonal. Los precursores por su parte irán hidrolizándose e interaccionando con la región hidrofílica del surfactante y entre ellos para formar la red vítrea (**Figura 13**).

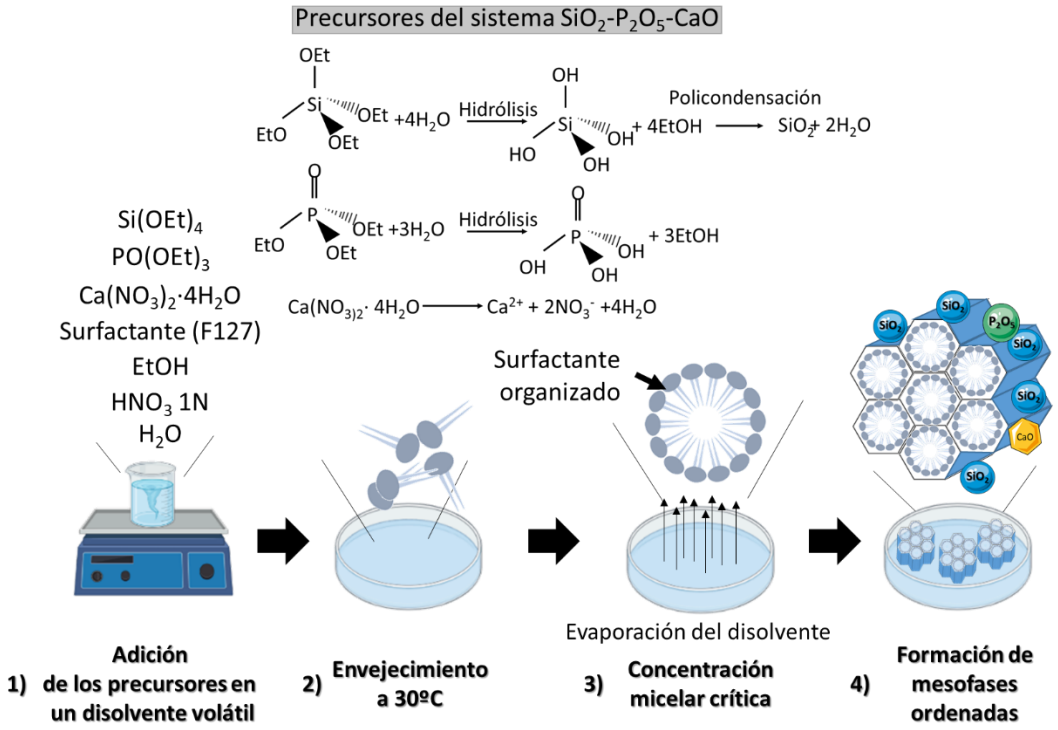


Figura 13. Autoensamblaje inducido por evaporación.

- **Eliminación del surfactante**: Una vez ha terminado el periodo de síntesis, se obtiene una oblea flexible del material, del que es necesario retirar el surfactante por medio de una extracción o calcinación, para la obtención del vidrio mesoporoso ordenado (**Figura 14**).

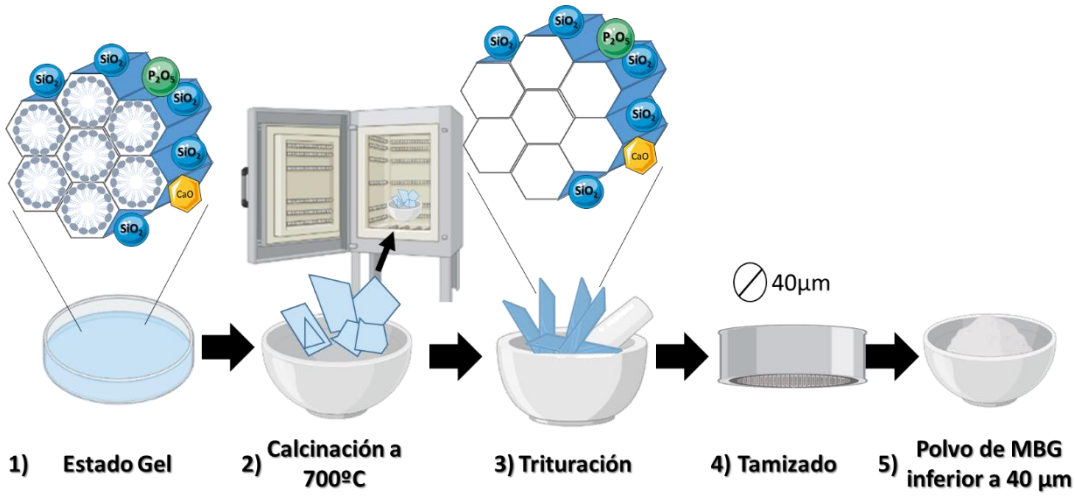


Figura 14. Proceso de extracción y obtención del producto final.

Dado que la estructura mesoporosa que se obtiene de la extracción es debido a la posición tridimensional que ocupaba el surfactante, la naturaleza química del surfactante, las condiciones de

pH, temperatura y concentración de los precursores son responsables de la obtención de diferentes estructuras porosas, como por ejemplo laminares, cúbicas o hexagonales [208,209].

Para la obtención de los vidrios mesoporosos bioactivos, suelen emplearse tetraetil ortosilicato (TEOS), $Ca(NO_3)\cdot 4H_2O$ y trietil fosfato (TEP) como precursores de SiO_2, CaO y P_2O_5, respectivamente. Para que el proceso de síntesis se lleve a cabo con éxito, es crucial que los precursores se hidrolicen completamente para que puedan interaccionar con el surfactante y con el resto de los precursores a fin de tener un producto final satisfactorio, por ello, la adición de los precursores suele espaciarse en el tiempo, empezando por los precursores formadores de red, TEOS y TEP, y dejando en última posición los precursores de los deformadores de red, como el $Ca(NO_3)\cdot 4H_2O$.

C) <u>Regeneración de defectos óseos mediante andamios meso-macroporosos 3D</u>

Una vez obtenido el producto final es necesario conformarlo en una estructura robusta que se pueda injertar en el defecto óseo a fin de que el hueso recupere la morfología y evite procesos de infección [202]. El material implantado, solo o en combinación con otros componentes debe ser capaz de cumplir una serie de requisitos a fin de promover la osteointegración, osteoconducción y osteogénesis. La fabricación de andamios tridimensionales macroporosos permite simular la estructura y función que desarrolla la matriz extracelular del hueso, con el fin crear un microambiente que favorezca el crecimiento y la vascularización propia del hueso [210,211]. Los andamios tridimensionales funcionan como soporte tanto a nivel macroscópico, soportando la carga mecánica del hueso y a nivel microscópico, funcionando como plantilla sobre la que las células osteoprogenitoras puedan adherirse, proliferar, diferenciarse y formar hueso de nuevo [212]. Por esta razón, en este tipo de estructuras la fijación al defecto y la colonización del implante desde el tejido óseo por células osteoprogenitoras supone un aspecto crucial a la hora de determinar el éxito del injerto[213].

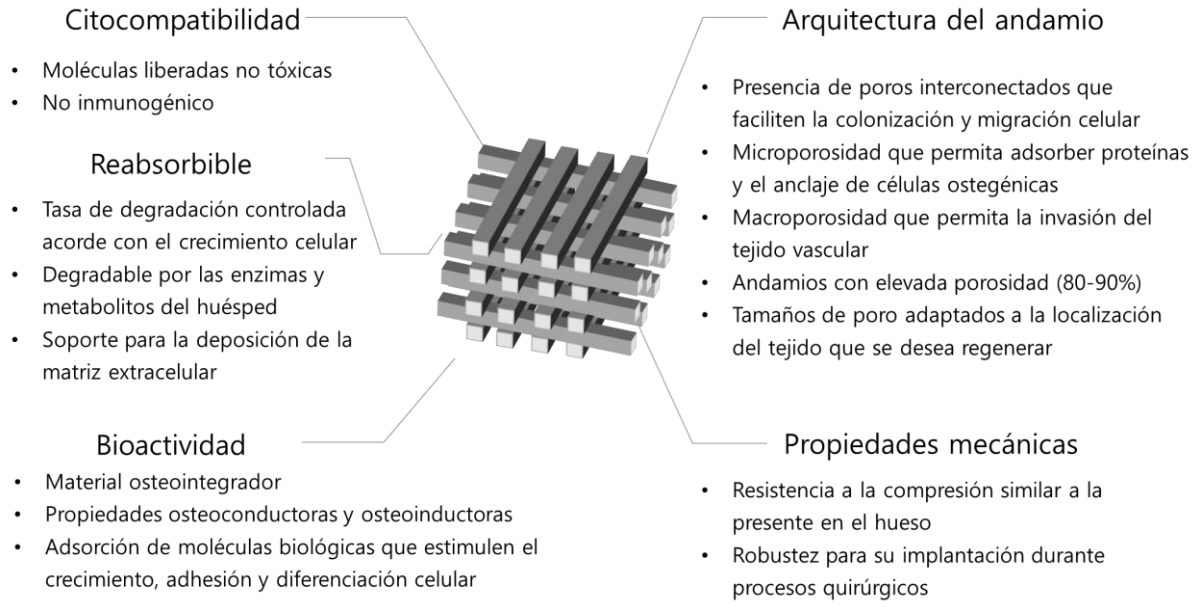


Figura 15. Requisitos básicos que debe de presentar un andamio para la regeneración de defectos óseos.

El andamio debe de presentar otros factores que permitan imitar el tejido óseo como estructura interconectada por micro y macroporos, propiedades texturales, propiedades mecánicas y composición química [187]. Las características más importantes que debe presentar un andamio que sirva para regenerar rápidamente defectos óseos son (**Figura 15**) [214]:

1. Porosidad 3D interconectada y jerarquizada.
2. Una superficie y topografía que garantice el anclaje, proliferación y diferenciación celular.
3. Composición citocompatible y reabsorbible con una tasa de degradación que permita su reemplazamiento progresivo por la formación de tejido óseo nuevo.
4. Los productos de degradación deben liberarse de forma controlada y contribuir a la integración del andamio en el tejido implantado.
5. Debe presentar las propiedades mecánicas que imiten a las propiedades presentes en el tejido donde se desea implantar el andamio, así como su manipulación en las prácticas clínicas.
6. Debe de ser económico, reproducible a gran escala y conservarse fácilmente de cara a tenerlos disponibles a la hora de realizar una cirugía.

Dado que el tejido óseo se considera un tejido homogéneo, poroso y anisotrópico, se necesita que los andamios que se diseñen presenten una arquitectura anisotrópica y porosidad similar que permita soportar la carga mecánica y la invasión de células osteogénicas y tejido vascular. En este sentido la porosidad juega un papel crucial, puesto que los diferentes tamaños de poro atienden a un objetivo diferente [191]. Los andamios deben presentar entre un 80 y 90% de porosidad [215], siendo al menos el 60% de ellos de entre 150 y 400 µm y al menos el 20% inferior a 20 µm [172]. Los andamios deben presentar poros de 1-20 µm necesarios para el intercambio de nutrientes, desechos metabólicos e imprescindibles para la adsorción de macromoléculas implicadas en el anclaje celular [172,216]. Por otra parte, los poros de entre 150- 400 favorecen el crecimiento óseo y la vascularización del andamio, mientras que los poros superiores a 400 nm tienen un papel determinante en la funcionalidad del implante y permiten el asentamiento de una población celular osteoprogenitora homogénea [172,217].

La topografía del material juega un importante papel pues es responsable del anclaje y colonización de las células osteogénicas. De hecho, se ha hipotetizado que la interacción entre el implante y las proteínas recae principalmente sobre la nanotopografía del andamio, en lugar de la composición química, pues mediante estudios de adhesión celular se observó cómo se modulada la adhesión celular de osteoblastos variando la topografía de materiales cerámicos [218].

La rugosidad, dureza o incluso la hidrofobicidad suponen rasgos decisivos a la hora de obtener un andamio, pues pueden afectar a la capacidad de las células para colonizar el andamio y si estás son capaces de anclarse liberar especies quimiotácticas para la colonización de las ubicaciones menos accesibles.

En cuanto a la carga mecánica, los valores de resistencia deben estar comprendidos en torno a 70 y 280 MPa para cargas de tensión y compresión respectivamente, así como un módulo de elasticidad longitudinal de en torno a 20 GPa [219].

D) <u>Conformado de los andamios meso-macroporosos de MBG</u>

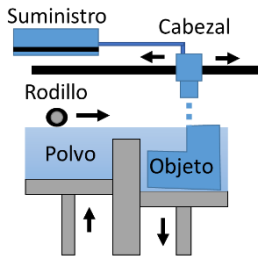
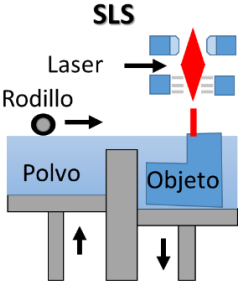
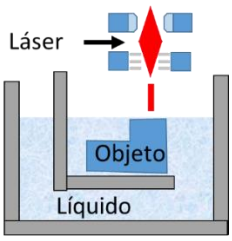
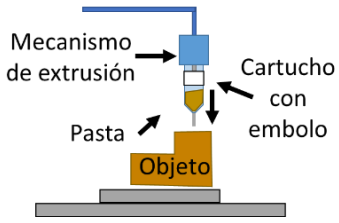
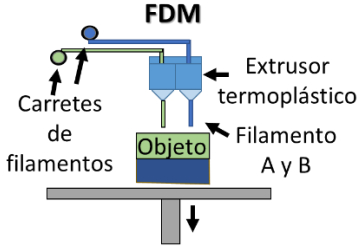
Para elaborar andamios tridimensionales existen multitud de técnicas [172,220–224]. Cada metodología aporta al andamio final una serie de características distintas, por lo tanto, es crucial la técnica que se elige en función del objetivo que se persigue. Existen desde técnicas en las que no se tiene control de la arquitectura final del andamio, hasta técnicas más sofisticadas que permiten reproducir fielmente un diseño elaborado previamente [225]. Los métodos más convencionales incluyen las técnicas de evaporación de disolventes[226], la liofilización[227], la réplica de moldes de gel [228], la lixiviación [229], etc [230]. Estas técnicas se caracterizan por no disponer un control de la arquitectura de los andamios, tienen una reproducibilidad limitada y bajo control de la porosidad interna del material. La ventaja de estas técnicas reside en su bajo coste y la velocidad con la que se obtiene andamios [231].

Las técnicas más recientes y prometedoras se clasifican en dos grandes grupos: el electrospinning, que dan lugar a arquitecturas de entramado o bien alineadas, y las técnicas de proptotipado rápido que permiten diseñar la estructura macroporosa de cada capa del andamio [232]. Ambas técnicas sirven para producir andamios reproducibles, sin embargo, la técnica de electrospinning no es capaz de desarrollar arquitecturas complejas y el tamaño de poro depende del grosor de las fibras [233]. La ventaja que supone las técnicas de prototipado rápido frente al resto de técnicas radica en la capacidad de elaborar andamios que se ajusten al defecto óseo, esto significa que se pueden desarrollar andamios personalizados para cada paciente. Además, mediante los archivos tipo diseño asistido por computadora (CAD) se pueden elegir multitud de parámetros como el grosor de cada capa, el tamaño de poro entre cada línea del dibujo, el número de capas totales que se desea para el andamio, el dibujo interno de cada capa, e incluso el tipo de pasta que queremos emplear para cada capa [234]. Dentro de las técnicas de prototipado rápido destacan las técnicas de impresión 3D directa (3DP), la bioimpresión asistida por láser (SLS), la estereolitografía (SLA), modelado por deposición fundida (FDM) y el robocasting (RC) [235] (**Tabla 3**).

El RC es la técnica más versátil de impresión 3D, pues cualquier material que se pueda formular como una pasta puede emplearse para elaborar andamios con esta técnica, siempre y cuando las propiedades reológicas de la pasta permitan su extrusión [236]. Otra ventaja de esta técnica es el empleo de diferentes pastas mediante múltiples unidades de extrusión, permitiendo la formación de andamios compuestos por capas de diferentes materiales [237], o incluso mezclar dos pastas [238]. Actualmente, es el método más empleado para la conformación de andamios tridimensionales macroporosos de MBG [215,239–244].

Esta técnica consiste en la deposición capa a capa de la pasta inyectable que contiene la mezcla de biocerámica y polímero [245]. Dicha pasta se introduce en un cartucho y se extruye mediante un embolo a través de una boquilla similar a una aguja que pueden ser de distintos tamaños, según la precisión que se desee obtener o se requiera en función de las propiedades reológicas de la pasta.

Tabla 3. Técnicas de fabricación de andamios. Adaptado de la referencia [225].

Método	Precisión	Ventajas	Desventajas
3DP 	Grosor de capa: 20-100 µm Precisión: 350-500 µm	Amplio abanico de materiales (metales cerámicas o polímeros), bajo coste, rápida formación de andamios	Partes frágiles, se necesita de un post procesado, puede quedar polvo atrapado dentro del poro
SLS 	Grosor de capa: ≈50 µm Precisión: ≈100 µm	Elevadas propiedades mecánicas y precisión al formar andamios	Solo puede trabajar con metales y a altas temperaturas
SLA 	Grosor de capa: 100 nm	Elevada precisión, formación de andamios rápida	Solo trabaja con resinas, andamios generalmente tóxicos, costosa
RC 	Grosor de capa: 40-1000 µm Precisión: 100 µm	Amplia variedad de materiales, posibilidad de formación de andamios bajo condiciones estériles	Las dificultades se deben a las propiedades reológicas de la pasta, proceso lento
FDM 	Grosor de capa: 250-370 µm Precisión: 260-700 µm	Materiales baratos, elevada resistencia verde	Restringido a materiales poliméricos termoplásticos, formación de rebabas

La mezcla se irá expulsando del cartucho en forma de filamento continuo, mientras el equipo lo va depositando, siguiendo un patrón previamente diseñado en el archivo CAD. Cada capa se ira

depositando sobre la anterior de forma que se irá construyendo una macroestructura tridimensional que se necesita para rellenar el defecto.

Para poder conformar un andamio es necesario conformar una pasta que cumpla con unas propiedades reológicas adecuadas [246] las propiedades viscoelásticas de la pasta deben permitir que fluya a través de una punta metálica de un tamaño dado y sea flexible durante el dibujo del andamio, y que pueda adquirir consistencia como para resistir la tensión capilar, para formar la estructura tridimensional capa sobre capa [247]. Muchos de los polímeros no son biocompatibles y requieren de un proceso de calcinación para eliminarlos [246]. Por esta razón se propone el empleo de una composición a base de un polímero biocompatible que no sea necesario retirar y la cerámica del vidrio mesoporoso bioactivo, lo que aporta grandes ventajas:

- Aporta las propiedades reológicas que se necesita para su manipulación por un equipo de impresión 3D.
- No es necesario realizar un post procesamiento del andamio, evitando el proceso de calcinación y facilitando la incorporación de biomoléculas en el andamio final.
- El polímero puede aportar las características que el material con el que se combina no tiene como, por ejemplo, aumentar la capacidad de retener humedad en el medio biologico, aportar robustez al funcionar como aglutinante, o bien aportar la flexibilidad de la que carece el material.

Entre los distintos polímeros que se pueden emplear destacamos los siguientes:

- **Ácido poliláctico (PLA)**: Este material consiste en la polimerización de monómeros de ácido láctico. Es uno de los polímeros más versátiles. Es un polímero hidrofílico, biodegradable y biocompatible. Se puede trabajar con PLA tanto en filamentos solidos a una temperatura de 150-162ºC, o bien disolviéndolo en compuestos orgánicos [248,249]. Los principales inconvenientes de trabajar con este material son su hidrofobicidad, lo que dificulta su degradación en medios fisiológicos y su reducida biocompatibilidad.
- **Policaprolactona (PCL)**: Es uno de los biopolímeros más empleados en combinación con biocerámicas. Al igual que el ácido poliláctico es biocompatible y biodegradable, además, permite modular su tasa de degradación y sus propiedades mecánicas. Su principal ventaja es su baja temperatura de fusión (58-65 ºC) y su solubilidad en disolventes orgánicos, facilitando su empleo para conformar andamios de MBG mediante prototipado rápido [250]. No obstante, aún se sigue estudiando cual es el porcentaje óptimo de PCL y MBG para obtener andamios lo suficientemente robustos. Sus inconvenientes son su carácter hidrófobo, la ligera toxicidad de sus productos de degradación [251].
- **Colágeno**: Es un componente natural del hueso, razón por la que es completamente biocompatible, la respuesta inmune frente a esta proteína es minina o si no nula, facilita la adhesión celular, la osteointegración y osteoconducción. No obstante, su gran inconveniente

es que no incrementa las propiedades mecánicas del andamio, por lo tanto su uso es muy reducido para la regeneración del tejido óseo [252].

- **Quitosano**: Es un polímero de origen natural. Entre distintas ventajas destacamos su bajo coste, reducida inmunogenicidad y la capacidad de funcionalizar su superficie. Además, al ser un material hidrofílico favorece la adhesión y proliferación celular. Los principales problemas que presenta este polímero son la dificultad de extruir una pasta tan viscosa con base de este polímero y la extremada rigidez y fragilidad de los andamios que forma [253].

- **Gelatina**: Es uno de los polímeros que en primer lugar se utilizó para la fabricación de andamios, debido a su carácter biocompatible y biodegradabilidad. Además, es un polímero que no desencadena una respuesta inmunológica y retiene con facilidad la humedad. Pero su principal ventaja también es su desventaja ya que su tasa de biodegradación es muy acelerada debido a su solubilidad y a la digestión enzimática en fluidos fisiológicos [254].

- **Polivinil alcohol**: Es un polímero sintético poroso, biocompatible, biodegradable, hidrofílico y que sus productos de degradación no dan lugar a la formación de una respuesta citotóxica. Este polímero presenta buena estabilidad ante la tracción como a la elongación, así como flexibilidad. Este material puede procesarse de diferentes formas para dar lugar a un producto con mayor o menor tasa de degradación, lo que lo convierte en un polímero eficaz en la adsorción y liberación de biomoléculas, y un candidato óptimo para la formación de pastas con base cerámica [255]. El inconveniente de este polímero es su dificultad para dibujar patrones mediante una impresora 3D.

En función de las propiedades reológicas de la pasta, así como en qué tipo de compuesto esta dispersada, se necesitará un equipo que extruya la pasta mediante presión mecánica o aire comprimido, un tamaño de aguja determinado, condiciones de temperatura concretas, velocidad de impresión, grosor de capa, tamaño del macroporo, etc. [256,257]. Es esencial llevar a cabo un proceso de optimización tanto de la pasta como del propio equipo. Así mismo, debe ponerse a punto la velocidad de dibujo, el tamaño del andamio, el tamaño de los canales internos, la altura de capas y la velocidad de extrusión de la pasta, pues son parámetros que deben responder a las propiedades reológicas de la pasta [258,259]. Si el disolvente tarda en secarse se recomienda una velocidad de dibujo y extrusión lenta, para que tenga el tiempo suficiente para evaporarse y sea posible pintar capa sobre capa. En el caso de que la mezcla del polímero y la biocerámica da lugar a un andamio que tras su secado encoge, es necesario valorar cuanto es necesario incrementar el tamaño del andamio o del tamaño de los canales internos. Por otro lado, si la pasta es muy viscosa se recomienda incrementar la velocidad de dibujo a fin de obtener un patrón definido[236,260]. Una vez se logra optimizar todos los parámetros, esta técnica permite obtener estructuras macroporosas tridimensionales altamente reproducibles.

A) Nanopartículas como nanoplataformas para aplicaciones biomédicas

Desde la primera aparición de los vidrios bioactivos el campo de los biomateriales ha experimentado numerosos avances hasta la obtención de un amplio abanico de materiales. Con los años los materiales han pasado de ser sustitutos inertes del tejido óseo a ser plataformas de liberación de biomoléculas que estimular la producción de hueso nuevo además de servir de soporte mecánico. Los últimos avances vienen de mano de la nanomedicina que desde la aparición de las primeras nanopartículas de sílice (MCM-41) [198], ha experimentado un avance igual o incluso superior al producido en el área de los biomateriales.

Un material puede considerarse un nanomaterial si al menos una de sus dimensiones pertenece a la escala nanométrica, es decir, se encuentra en el rango de entre 1 y 100 nm [261], sin embargo, los limites no están claros ya que una enorme mayoría de trabajos presentan partículas de entre 150 y 400 nm lo que significa que realmente se habla de una escala submicrométrica [262].

La naturaleza de las nanopartículas puede ser igual de diversa que la de las aplicaciones que se le pueden dar a las nanopartículas. La función más extendida que se les ha dado a las nanopartículas es la plataforma para la administración controlada de biomoléculas, siendo las más frecuentes los fármacos, aunque también desempeñan funciones en como catalizadores, material de revestimiento de superficies, agentes de contraste o imagen médica [204].

El tratamiento convencional ha consistido generalmente en la administración de un fármaco por vía oral, de forma que, tras su absorción el fármaco se aplica de forma sistémica. El fármaco viaja por el torrente sanguíneo a todas las partes del cuerpo hasta llegar al tejido diana. Esto supone que la concentración a emplear debe ser superior a la necesaria para que cuando se distribuya por la sangre, alcance una concentración efectiva en el tejido diana [263]. Esta concentración debe ser aún mayor cuando se trata del tejido óseo, debido a que es un tejido con menos irrigación que el resto [264], por lo que el tratamiento sistémico pierde efectividad. Esta problemática es aún mayor cuando se quiere tratar una infección ósea pues en los casos de osteomielitis crónica se produce una pérdida de irrigación que impide la respuesta inmune y el tratamiento sistémico [73,75].

El empleo de nanopartículas presenta numerosas ventajas respecto a la administración libre de las biomoléculas, en primer lugar, porque permiten cargar altas dosis y en combinación con diferentes tipos de biomoléculas, habilitan la posibilidad de cargar moléculas hidrófobas que de otro modo no serían solubles en el torrente sanguíneo, pueden modificarse para que se transporten a un tejido diana específico y proporcionan protección frente a la degradación por distintos factores, permitiendo la liberación de las moléculas que transportan al tejido que se desee, sin tener que exponer al paciente a elevadas cantidades de fármaco de forma sistémica, evitando de esta forma el desarrollo de efectos secundarios y aumentando la efectividad del tratamiento [265].

Normalmente se clasifican dentro de dos grandes grupos: nanopartículas orgánicas: y nanopartículas inorgánicas. Dentro de las nanopartículas orgánicas encontramos un amplio abanico de nanopartículas de diferentes materiales, entre los que destacan:

- **Nanopartículas poliméricas**: Dependiendo del procedimiento de síntesis pueden obtenerse nanocápsulas compuestas de un núcleo de aceite que suele emplearse para transportar fármacos disueltos en su interior, o bien nanoesferas que consisten en la polimerización de un monómero hasta formar una intrincada matriz donde se retiene o adsorben pequeñas biomoléculas con diversas funciones. Los polímeros más utilizados en la elaboración de estas nanopartículas son el ácido poli-(láctico-co-glicólico), la polietilenimina, polietilenglicol (PEG) o el N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, entre otros [266,267].

- **Liposomas**: son estructuras coloidales autoensambladas compuestas por lípidos anfifílicos que se organizan en forma de vesículas esféricas rodeando un espacio acuoso central. Dado el carácter anfifílico de los fosfolípidos pueden portar biomoléculas hidrofílicas en el interior de la vesícula o hidrofóbicas en la capa lipídica Al ser de la misma naturaleza que la membrana celular, presenta una excelente biocompatibilidad y la capacidad de fusionarse con la membrana celular para liberar las biomoléculas de su interior [268].

Por otra parte, las nanopartículas inorgánicas se dividen en tres grandes grupos

- **Nanopartículas metálicas**: Suelen obtenerse tanto por métodos físicos como químicos [269]. Su capacidad de transportar biomoléculas es más reducida debido a la necesidad de anclarlos a la superficie, sin embargo, presentan otras aplicaciones como tratamientos antitumorales hipertermia magnética o fototérmica, propiedades bactericidas o bien como sensores debido a sus propiedades superparamagnéticas [270].

- **Nanopartículas de carbono**: Este tipo de material ha llamado mucho la atención debido a sus excelentes propiedades entre las que destacamos buenas propiedades texturales, facilitad para modificar su superficie con grupos funcionalizantes, capacidad de carga de compuestos hidrofílicos e hidrófobos, así como su conversión fototérmica [271].

- **Nanopartículas de sílice mesoporosa**: Desarrollados a principios de los 90 [272], se caracterizaban por dar lugar a nanopartículas con un tamaño de poro homogénea y controlable (2-20 nm), elevada superficie específica , volumen de poro y una superficie densamente poblada de grupos silanol que facilitaba su modificación y anclaje de grupos funcionales. Es en el campo de la nanomedicina donde han atraído mayor interés, con su referente más conocido, el material MCM-41 como sistema de liberación de fármacos [198]. En la década de los años 2000 se comenzó a modificar el método Stöber [273] para incluir Ca^{2+} y PO_4^{3-} que derivaría más tarde en la obtención de las primeras nanopartículas de vidrio bioactivo pertenecientes al sistema ternario SiO_2-P_2O_5-CaO [262]. La ventaja que presenta este material es su plasticidad, pues manipulando sus condiciones de síntesis, el empleo de diversos agentes directores de síntesis y la adición de modificadores de la red de sílice, pueden obtenerse nanopartículas de diferente tamaño, morfología y composición. A día de hoy, se han desarrollado multitud de nanopartículas de vidrio bioactivo como esferas elípticas, con forma de bastón, huecas, etc, pudiendo ser sólidas o porosas. En la **Tabla 4** se ofrece una

comparación de sus propiedades. De entre los distintos tipos de nanopartículas, las nanopartículas huecas de vidrio bioactivas (HBGN) presentan propiedades tanto químicas como texturales sobresalientes, razón por la que uno de los objetivos de la presente tesis consiste en desarrollar un nanosistema basado en estas nanopartículas.

Tabla 4. Estrategias para la obtención de nanopartículas de vidrio bioactivas. Adaptado de las referencias [262,285].

Protocolo de síntesis	Surfactante	Composición (Si/Ca/P)	Morfología	Tamaño	Superficie específica (m^2/g)	Tamaño de poro (nm)	Referencia
EISA+ aglutinación con alginato	P123	80:15:5	Microesfera Hexagonal	1 mm	336	5	[274]
Catálisis por base	CTAB/ (Ps-b-PAA)	80:15:5	Esfera hueca con poro radial	250 nm	949	2,6	[275]
EISA+aerosol	CTAB	82:0,9:0,9	Esfera polidispersa	400 nm	484	1,1+3,7	[276]
	P123				380	3,9	
	F127				275	3,5	
Catálisis por base	CTAB	77:15:08	Esfera hueca	294 nm	444	8,8	[277]
			Esfera hueca	264 nm	600	5,6	
			Esfera sólida	187 nm	972	4,6	
Catálisis por base	CTAB	77:15:0,8	Esfera desorganizada	150 nm	318	3,7	[278]
			Bastón desorganizado	150 x 380 nm	388	3,7	
			Bastón hexagonal	150 x 550 nm	455	3,7	
Catálisis por base	CTAB	79:17:0,8	Esfera desorganizada	30 nm	1040	2,2	[279]
Catálisis por ácido base	Sin surfactante	70:30:0	Esferas sólidas	200-350 nm	-	-	[280]
Micro-emulsión	P123	80:15:5	Esfera mesoporosa	500 nm	554.4	3,86+5,40	[281]
Micro-emulsión	CPBr	80:20	Esféricas radiales	180 nm	483,98	10,77	[282]
Aspersión de aerosol	P123	80:20	Esfera mesoporosa	100nm-1 µm	195	5-8	[283]
Electro-pulverización	Sin surfactante	80:20	Esfera sólida	0,6-1,6 µm	-	-	[284]

B) **<u>Nanopartículas de vidrio mesoporoso HBGN</u>**

Las HBGN constituyen uno de los sistemas inorgánicos más prometedores de la actualidad en el suministro controlado de biomoléculas terapéuticas en la actualidad. Estas nanopartículas no solo mantienen las propiedades de sus homólogos vidrios bioactivos, si no que se encuentran aumentadas como es el caso de la superficie específica llegando a duplicar la superficie obtenida por vidrios bioactivos mesoporosos[286]. La bioactividad está estrechamente relacionado con una serie de parámetros, como la tasa de degradación de las nanopartículas, la velocidad con la que se intercambian los iones del material con el medio, la morfología del material y la relación de superficie/volumen [262]. Dichos parámetros alcanzan valores óptimos en las HBGN y además se ven favorecidos por su escala nanométrica, por lo que muestran una bioactividad muchísimo más elevada que la obtenida por los MBG. Otra ventaja debido a su escala nanométrica es que la interacción con las células se produce de forma más efectiva. En diversos estudios en los que se comparaba la respuesta celular frente al mismo material, se obtuvo una mayor inducción en la diferenciación celular y en la proliferación para las partículas de la escala nanométrica [287,288]. Por otra parte, las propiedades mecánicas de los andamios dependen en gran medida de las propiedades del material que lo compone, por lo tanto, es de esperar que los andamios compuestos de nanopartículas vean incrementadas sus propiedades mecánicas. De hecho, los andamios con base de nanopartículas imitan de una forma más precisa, la estructura natural del hueso [287,289].

Las HBGN tienen una particularidad respecto al resto de nanopartículas, pues tienen una estructura organizada que consta de la coraza y el núcleo hueco. La coraza tiene un poro radial de 2.6 nm aproximadamente que conectan con el interior del núcleo hueco. La cavidad interna tiene un tamaño de aproximadamente 150 nm, con poros de unos 20 nm. Estudios de carga y liberación con doxorrubicina mostraron que el perfil de liberación de fármacos de estas HBGN consta de dos fases: una fase de liberación rápida y abrupta desde el poro radial que dura alrededor de 4h, y otra lenta y sostenida que se atribuye a la liberación desde el interior del núcleo. Dado que tiene dos fases, cumple con dos objetivos críticos en la liberación de antibióticos: en primer lugar, una liberación que sobrepase la MIC en tiempos cortos evitando el desarrollo de resistencia a antibióticos y fenotipos SCV, y en segundo lugar una liberación sostenida en el tiempo que acabe con la población de bacterias remanentes. El que las nanopartículas tengan diferente tamaño de poro, permite la carga con diferentes biomoléculas utilizando un solo nano vehículo [290] (**Figura 16**).

Estas nanopartículas se sintetizan de forma sencilla mediante el método de Stöber [273] modificado. Este método está basado en la química sol-gel catalizado por una base. La presencia de grupos OH^- resulta imprescindible a la hora de obtener nanopartículas dispersas, pues la repulsión de los grupos cargados negativamente Si-OH facilita la obtención de una morfología esférica [291]. La forma esférica es de gran interés, pues favorece el transporte a través del torrente sanguíneo y diversos autores señalan que habilita que las nanopartículas se internalicen en las células con mayor facilidad [292].

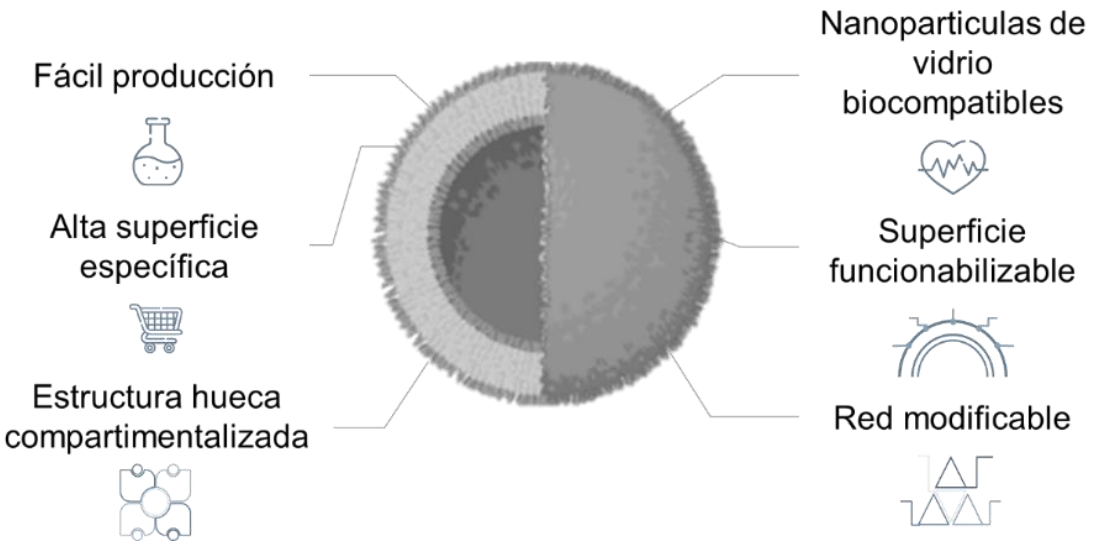


Figura 16. Esquema de una HBGN, propiedades y ventajas.

Es crucial mantener controladas las interacciones entre los precursores de calcio y las nanopartículas nacientes de SiO_2, de otra forma se obtendrían nanopartículas de morfología irregular [293], de tamaños heterogéneos [294] o agregadas [295]. Para la obtención de la composición propia de las HBGN es necesaria la adición del precursor del pentóxido de fósforo (P_2O_5) que suele incorporarse en forma de ortofosfato (PO^{-3}_4). Su adición compensa la carga positiva del precursor del óxido de calcio, que se añade en forma de nitratos, y además funcionan como formadores de red [262].

En el método Stöber tradicional, suele emplearse CTAB como agente director de estructura [262] , sin embargo para obtener las HBGN se emplean dos agentes directores de estructura: CTAB y Co-polímero aniónico di-bloque de poli(estireno-b-ácido) (PS-b-PAA) [275]. Los agentes directores de síntesis son los responsables de la estructura porosa de los biomateriales una vez se eliminan, normalmente por calcinación [262]. En el caso de las HBGN, CTAB es el responsable de la obtención de la coraza y el poro radial, mientras que el PS-b-PAA, da lugar a núcleo y el poro interior. Durante el proceso de síntesis los precursores de sílice y de calcio se añaden a una solución compuesta de agua, alcohol e hidróxido de amonio bajo condiciones de temperatura estable y agitación. El TEOS en dicha solución se hidroliza, mientras que los precursores de los iones metálicos se disuelven. Ambos precursores interaccionan con las micelas de los surfactantes para ensamblarse a su alrededor, formando así las nanopartículas. El problema que surge de emplear dos agentes directores de estructura es que los precursores de los iones metálicos suelen ser sales de nitrato que interactúan con los surfactantes de naturaleza catiónica de tal forma que dan lugar a pérdidas del orden mesoporoso [278,279], por esta razón es crítica la cantidad de iones metálicos que se pueden añadir a la composición química. La optimización de estos parámetros y el desarrollo de HBGN mejoradas ha sido uno de los pilares del trabajo en este ejercicio (**Figura 17**).

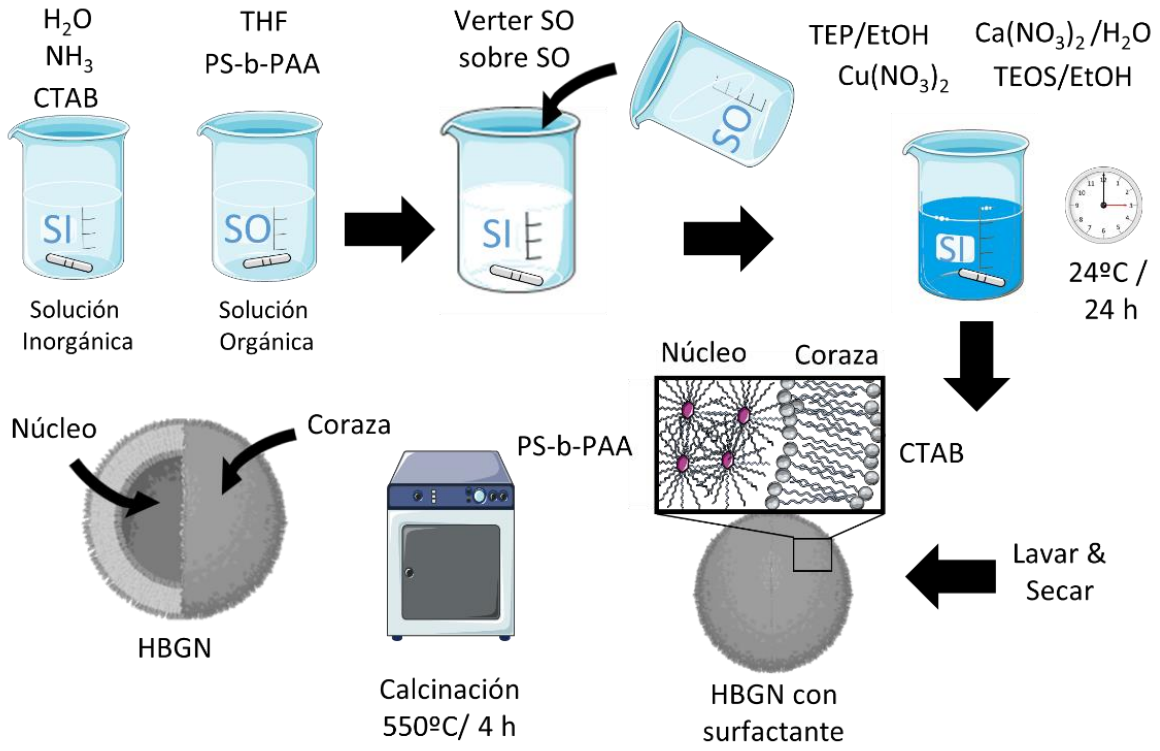


Figura 17. Proceso de síntesis de nanopartículas huecas de vidrio bioactivo (**HBGN**). Amonio concentrado (**NH_3**), tetrahidrofurano (**THF**), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (**CTAB**), co-polímero aniónico di-bloque de poli(estireno-b-ácido) (**PS-b-PAA**), etanol (**Et–OH**); tetraethil ortosilicato (**TEOS**), trietil fosfato (**TEP**).

I.6 Estrategias para incrementar las aplicaciones terapéuticas de los MBG

En las últimas décadas se ha producido un desarrollo tecnológico para aumentar las aplicaciones terapéuticas de los materiales destinados a resolver patologías del sistema esquelético. En este trabajo se van a presentar aquellas de mayor interés para la resolución de defectos óseos o escenarios de osteomielitis crónica con pérdida de tejido óseo.

A la hora de mejorar las propiedades de los biomateriales, se han abordado distintas estrategias en el ámbito de la ingeniería de tejidos para la regeneración ósea, sin que se pierdan las cualidades principales y necesarias que debe de incluir un biomaterial protésico como son la osteoconducción, osteointegración y osteoinducción.

A) <u>Dopaje con Iones Metálicos</u>

Una de las estrategias que permiten el aumento de las aplicaciones biomédicas es la alteración de la composición química de los biomateriales, por medio de la incorporación de iones metálicos con propiedades terapéuticas. Esta estrategia destaca por su practicidad, pues la incorporación del ion terapéutico se irá liberando al medio a medida que el material comience a biodegradarse. Esto provoca que aumente la concentración de dicho ion en el medio hasta activar ciertas vías metabólicas que desencadenen a su vez una respuesta biológica, como por ejemplo, inducir la proliferación de las células osteogénicas [203]. Pero es importante mencionar que este objetivo se logra cuando se alcanza un rango de liberación óptimo para desencadenar un efecto beneficioso en la recuperación del tejido

óseo y no uno perjudicial. Esta descrito en la bibliografía que la liberación de algunos iones metálicos es potencialmente tóxica si la concentración que se alcanza es elevada, y alcanzar la concentración terapéutica sin sobrepasar el umbral citotóxico representa uno de los retos más desafiantes en la actualidad [296].

Iones metálicos de bajo radio iónico permiten que los materiales tengan una red de vítrea más compacta, por lo que se degradan menos y son más robustos. Por el contrario, los iones con una red iónica elevada, dan lugar a la expansión de la red vítrea, favoreciendo el intercambio iónico entre el material y el medio, lo que produce una reactividad mayor del material [297]. Por otra parte, diversos autores apuntan a que diversos iones metálicos divalentes como el Sr, Zn, Mg y Cu han mostrado la capacidad de estimular la diferenciación de las células estromales de la medula ósea humana. Los iones trivalentes como el Ce, Ga, B y el Fe, han mostrado la capacidad de inducir la proliferación en osteoblastos [298]. Las aplicaciones terapéuticas de los distintos iones metálicos aparecen recogidas en la **Figura 18** [299] **.**

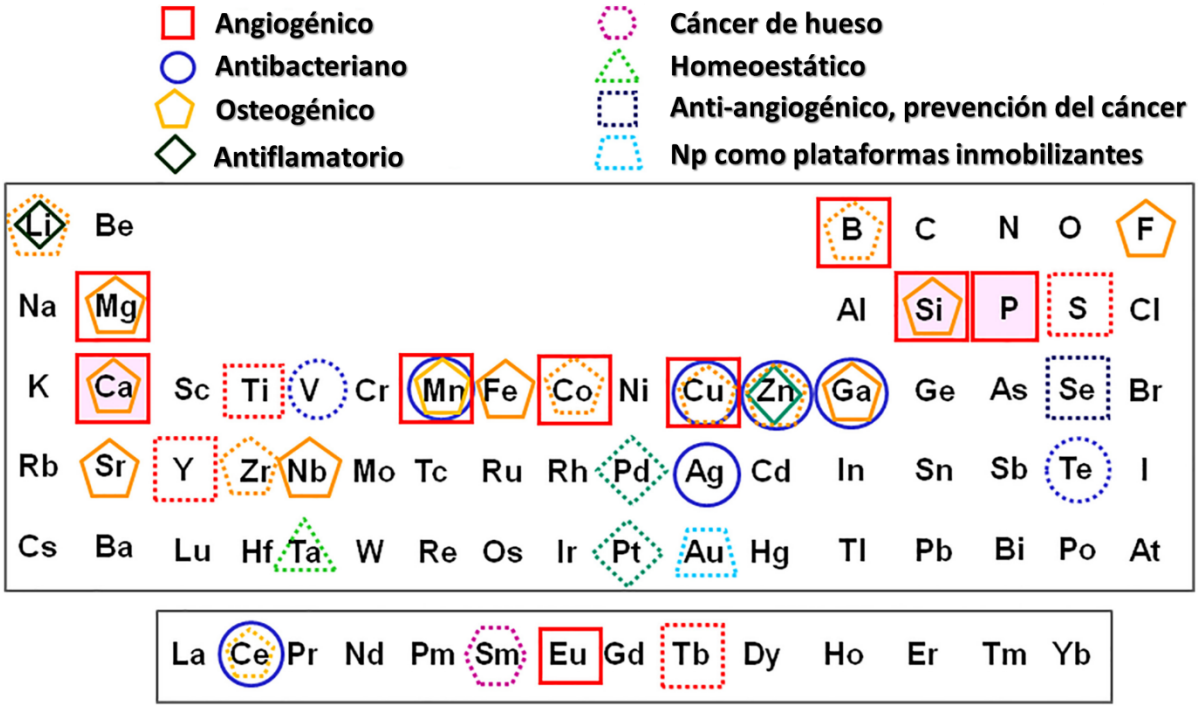


Figura 18. Aplicaciones terapéuticas de los distintos elementos de la tabla periódica que se han llegado a integrar dentro de la red de sílice de los MBG. Las líneas solidas representan propiedades bien descritas, mientras que las líneas discontinuas representan propiedades propuestas. Adaptada de la referencia [299] con permiso de *Mater Today Bio*.

En el ser humano, el 98% del Sr se encuentra ubicado en el tejido óseo y es uno de los elementos que contribuye a las propiedades mecánicas del hueso [300]. Debido a que el Sr comparte muchas propiedades químicas con el calcio, puede llegar a ocupar el mismo lugar que el calcio en la estructura química del tejido óseo [301]. Históricamente se ha empleado el ranelato de estroncio en el tratamiento de la osteoporosis, debido a la capacidad de influir en la dinámica de la remodelación ósea [302]. Los iones Sr han mostrado ser potentes inductores de la osteogénesis, mediante la activación

de diversas rutas metabólicas, como la involucrada en el receptor sensor del calcio (CaSR), la proteína quinasa Akt, o la ruta de señalización de Wnt/β-catenina, propias de células mesenquimales y osteoblastos [303,304]. También se ha demostrado que el estroncio tiene actividad antiosteoclastogénica al regular el ratio de OPG/RANK/RANKL [305]. El Sr ha sido un elemento que se ha empleado en numerosas ocasiones en la síntesis de biomateriales con el objetivo de explotar sus propiedades osteogénicas. Esto ha conducido al descubrimiento de un efecto sinérgico entre el efecto osteogénico de los iones Si y los Sr, aumentando la expresión de marcadores de diferenciación de células osteogénica, como son la ALP, la expresión de colágeno tipo I, osteocalcina, Runx2 entre otros [306].

Además de las propiedades osteogénicas que posee el Sr, también se ha visto que es capaz de regular la respuesta inmune. Se ha demostrado que la adición de Sr inhibe la osteoclastogénesis al bloquear la activación de la ruta NF-κβ inducida por RANKL, pero otro efecto a consecuencia de este bloqueo es la reducción de la secreción de citoquinas proinflamatorias y la estimulación de citoquinas antiinflamatorias en los linfocitos B [307,308]. Diversos autores han aprovechado las propiedades osteoinmuladoras de estos materiales ya que resultan ventajosos de cara a evitar que se produzca una respuesta inflamatoria y por lo tanto un rechazo del material. De estos trabajos se ha averiguado que la liberación de Sr puede disminuir la capacidad de los monocitos de desencadenar un proceso de inflamación [309,310]. Sin embargo, no existe aún consenso en cuanto a la concentración que debe emplearse, dado que concentraciones superiores 500 µmol/L e inferiores a 10 µmol/L reducen la liberación de factores proinflamatorios (TNF-α), mientras que a las mismas concentraciones se produce un aumento e inhibición de la expresión de otro proinflamatorio, la interleuquina-6 (IL-6), respectivamente [309,310].

El Zn representa un elemento esencial que juega un papel crucial durante el crecimiento y el desarrollo del sistema esquelético e inmunológico [311,312]. La deficiencia en Zn conduce a la reducción de hasta un 45% de la masa del hueso esponjoso, de lo que se deduce su implicación en la capacidad de acumular masa ósea [313]. Los iones Zn^{2+} tienen la capacidad de promover la osteoblastogénesis a través de la estimulación de la actividad de los osteoblastos. Dicha estimulación se realiza mediante la regulación de la ruta de señalización TGF-β y los receptores Smad [314]. El zinc incrementa la deposición de las fibras de colágeno y aumenta la mineralización que en último lugar conlleva a la formación de nuevo hueso por medio del aumento de la expresión de ALP y osteopontina [315]. Debido a sus excelentes propiedades osteogénicas se ha empleado para recubrir la superficie de implantes óseos. Esto ha servido para demostrar su participación como inductor osteogénico en células del estromal de la médula ósea humana, así como condrocitos y células mesenquimales de ratones [316,317].

Además de su capacidad para regular la osificación del sistema esquelético, el zinc tiene cierta implicación en la regulación de la respuesta inmune. De hecho, la deficiencia de zinc causa el desequilibrio de la producción y señalización de citoquinas inflamatorias, y por lo tanto, alterando la especificidad de la respuesta inmune [312]. Se ha observado que la liberación de iones Zn^{2+}de

materiales de fosfato tricálcico dopados con Zn, regula la formación de la actividad de los macrófagos y las células gigantes multinucleares [316]. Además se ha señalado su influencia en la regulación de determinados perfiles inflamatorios, por medio de la regulación de los receptores TLR-4, potencia la liberación de citoquinas antiinflamatorias IL-10, mientras que inhibe la producción de las citoquinas inflamatorias TNF-α y IL-β [318,319].

Otra de las aplicaciones del Zn es la de agente antibacteriano [320], pues el óxido de zinc actúa de tres formas distintas reduciendo la viabilidad bacteriana [321]. Por un lado, el óxido de zinc forma especies reactivas de oxígeno como aniones superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y grupos hidróxido (OH^-) (**Ecuación 1, 2 y 3**).

$$ZnO + H_2O \rightarrow {}^{\cdot}OH + H^+ + Zn^{2+} \quad (1)$$

$${}^{\cdot}OH + {}^{\cdot}OH \rightarrow H_2O_2 \quad (2)$$

$$O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH + O_2 \quad (3)$$

El ZnO es capaz de desestabilizar y aumentar la permeabilidad de la membrana produciendo la fuga de iones y solutos esenciales para la viabilidad bacteriana, produciendo de esta forma la muerte de la bacteria [99]. Por último, el óxido de zinc posee unas propiedades intrínsecas que le permiten actuar como un agente antibacteriano. Una vez que el óxido de zinc entra en contacto con una disolución acuosa, se liberan iones Zn^{2+}. Dichos iones son capaces de interaccionar con el DNA, RNA, proteínas y lípidos [322] perturbar el transporte interno de moléculas, el metabolismo de los aminoácidos, lo que conduce en último término a la muerte bacteriana [99,323].

El Cu es un elemento esencial en el cuerpo humano debido a que se encuentra presente en proteínas enzimáticas de gran relevancia [324,325]. Su carencia da lugar a diversas enfermedades como la anemia, neutropenia, osteopenia, fracturas patológicas del hueso [326], por lo que la homeostasis del cobre es crítica para mantener un estado de salud. Está ampliamente reconocido que los iones de Cu simulan una situación de hipoxia mediante la estabilización del factor 1 α inducible por hipoxia (HIF-1α) y desencadenando la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y aumentando significativamente la formación y crecimiento de vasos sanguíneos [327–329]. Entre sus efectos beneficiosos, se ha observado que el Cu tiene la capacidad de activar rutas de diferenciación de las células madres mesenquimales de la medula ósea e inhibir la osteoclastogénesis [330,331]. El Cu tiene un papel crucial en la actividad de diversas enzimas como la superóxido dismutasa con propiedades antioxidantes y la lisil oxidasa, responsable del entrecruzamiento del entrecruzamiento de las fibras de colágeno del hueso [332,333]. También se ha señalado que tiene cierta capacidad de estimular la respuesta inmune mediante la estimulación de la expresión de interlequina 1-β (IL-1β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α), además de activar a los macrófagos por medio de la ruta de los receptores tipo toll (TLR) [334,335]. Paradójicamente, se ha observado que la inflamación mediada por los iones Cu^{2+} da lugar a una inducción drástica en la diferenciación de las células mesenquimales de la medula ósea líneas celulares ostegénicas [334].

Otra propiedad que convierte al Cu en un candidato atractivo es su actividad antibacteriana y antiviral. Está reconocido como un elemento capaz de reducir de forma considerable la viabilidad bacteriana en especies bacterianas como *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus* [336–338]. Así mismo, se ha demostrado su aplicación como recubrimiento sobre determinadas superficies, resulta una estrategia eficaz en la inactivación y desinfección de virus como el Norovirus [339], el virus Influenza A [340] e incluso el SARS-CoV [341].

Se han sugerido diferentes mecanismos por los que el cobre resulta tan citotóxico para las bacterias. El más aceptado, postula que los cationes Cu^{2+} se unen a la pared celular bacteriana por atracción electroestática, debido a que la pared bacteriana se encuentra densamente poblada por moléculas de peptidoglicanos cargados negativamente, siendo mayor la atracción sufrida por las bacterias Gram-negativas [342]. Esto conduce a la solidificación de las proteínas estructurales que la componen, dañándola de forma irreversible [343,344]. El daño puede estar mediado por la producción de radicales hidroxilos reactivos de los que se tiene constancia que participan en numerosas reacciones perjudiciales para el correcto desarrollo celular, como la oxidación de proteínas y lípidos [345] . Estos radicales se generan por una reacción tipo Fenton (**Ecuación 4**):

$$Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + OH^{\cdot} \ (4)$$

Los iones cobre también pueden dar lugar al agotamiento de los sulfhidrilos, como en las cisteínas o el glutatión, a consecuencia de un ciclo entre las siguientes reacciones (**Ecuaciones 5 y 6)**:

$$2Cu^{2+} + 2\ RSH \rightarrow 2\ Cu^{2+} + RSSR + 2H^{+} \ (5)$$

$$2\ Cu^{+} + 2\ H^{+} + O_2 \rightarrow 2\ Cu^{2+} + H_2O_2 \ (6)$$

El peróxido de hidrógeno generado por la **Ecuación 6** puede participar a su vez en la **Ecuación 4** favoreciendo la formación de más radicales hidroxilos [346].

Los iones de cobre, por lo tanto, destruyen la pared bacteriana debido su actividad como reductor fuerte, extrayendo electrones de la bacteria y causando que el citoplasma se escape de la bacteria. Por otra parte, los cationes Cu^{2+} se combinan con la membrana plasmática por atracción electroestática y de esta forma penetran dicha membrana abriendo o cerrando los canales iónicos. Esto altera la permeabilidad de las membranas celular, lo que provoca la fuga de iones intracelulares y metabolitos de bajo peso molecular. Al mismo tiempo, los iones Cu^{2+} se unen fuertemente a los aminoácidos y proteasas lo que resulta en una degeneración progresiva que conduce a la desnaturalización de las proteínas [347]. Esta situación es incompatible con la replicación bacteriana de forma que se produce la muerte celular [348].

Además, estudios recientes indican otra aplicación más del cobre, pues se ha señalado que el cobre potencia la eficacia de ciertos antibióticos, como los presentes en la familia de las fluoroquinolonas, [349] y favorece que en los materiales se adsorba mayor cantidad de antibiótico [350]. Teniendo en cuenta que la osteomielitis crónica está causada en gran medida por *S. aureus* [67,79,87] entre otras especies bacterianas como *E.coli* [89], y que la principal causa del fracaso de su tratamiento se debe a

la falta de vascularización [73], resulta muy ventajoso un elemento metálico que reúna tantas propiedades. Esta es la razón por la que ha resultado tan prolífica línea de investigación de la ingeniería de tejidos empleando el cobre en materiales [351–356].

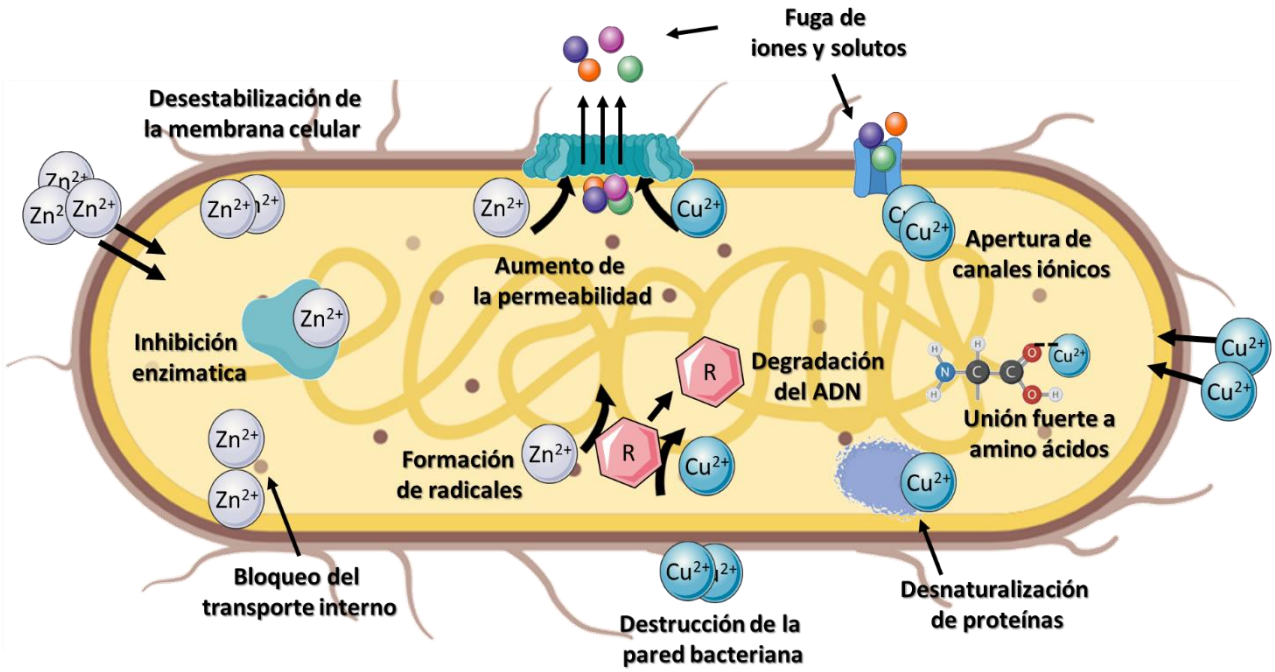


Figura 19. Rutas citotóxicas de los iones metálicos Zn^{2+} y Cu^{2+}. Especies reactivas de oxígeno (R).

B) Funcionalización de los MBG

Todos los MBG se caracterizan por presentar una superficie reactiva densamente poblada por grupos hidrofílicos Si-OH, o grupos silanol [202]. Esta característica permite que se puedan anclar grupos funcionalmente activos como aminas primarias y secundarias, grupos carboxil, hidroxil, halógenos alcalinos, azidas, etc, tanto en el proceso de síntesis como tras la obtención del material [357]. La mayoría de las reaccisansanch@ucm.es ones de funcionalización post síntesis parten de la reacción de condensación de organosilanos del tipo $(R'O)_3SiR$, con los grupos silanol libres de la superficie de los poros. Normalmente, este proceso se lleva a cabo post-síntesis, para evitar comprometer la estructura mesoporosa del material. Con este abordaje se consigue añadir grupos orgánicos de interior a la superficie y al interior del poro. Sin embargo, hay que tener en cuenta la longitud del residuo orgánico, así como su concentración, pues es muy probable que una longitud extensa del residuo o emplear concentraciones muy elevadas puede perjudicar el tamaño de poro disponible, en incluso el cierre por completo del poro [358,359]. Una de las reacciones más empleadas para anclar grupos funcionales es la llevada a cabo mediante la condensación de 3-mercaptopropiltrietoxisilano o sus análogos como el 3-aminopropil trietoxisilano (APTS). Esta reacción sirve para añadir un grupo tiol, alquilo o una amina primaria a la superficie del material, lo que habilita su conjugación con diversas moléculas orgánicas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, o isotiocianatos de rodamina o fluoresceína [360].

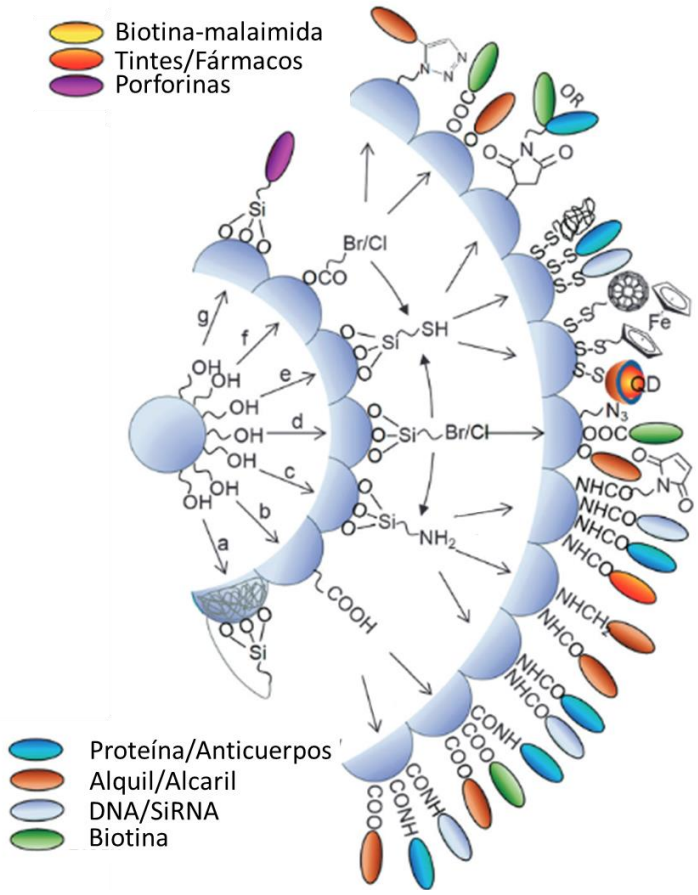


Figura 20. Esquema de las posibles funcionalizaciones a realizar sobre una superficie densamente poblada por grupos silanoles. Adaptado de la referencia [361] con permiso de *Chem. Soc. Rev*.

Las aplicaciones que pueden obtenerse de la funcionalización pueden agruparse en tres bloques: liberación de las moléculas cargadas en el interior, bioimagen y aplicaciones terapéuticas.

- **Liberación de moléculas**: Los MBG son excelentes plataformas de liberación de moléculas, sin embargo, en medios líquidos se produce de forma descontrolada. Determinados péptidos, polímeros u oligosacáridos suelen emplearse a modo de compuerta para controlar la tasa de liberación, en respuesta a distintos estímulos como el pH, temperatura, cambios en la conformación y su procesamiento por diversas enzimas [362,363].

- **Bioimagen**: Su aplicación como bioimagen, se encuentra más ligado al empleo de nanopartículas. En el caso de las nanopartículas de sílice, se logra mediante el anclaje a su superficie sondas fluorescente como isocianato de fluoresceína (FTIC), rodamina, cianina, tintes alexafluor, etc [364] y moléculas que vectoricen las nanopartículas al tejido diana, como péptidos o anticuerpos [365]. De esta forma se pueden introducir nanopartículas por vía parenteral, viajen por el torrente sanguíneo e iluminen un tejido diana con diversos fines [366].

- **Aplicaciones terapéuticas**: Dentro de esta clasificación se agrupa un abanico extenso de aplicaciones, las principales son aumentar la citocompatibilidad y las propiedades antimicrobianas. Para aumentar su biocompatibilidad, se han investigado la funcionalización con diversas moléculas como el PEG, dextrosano, quitosano [367] y secuencias de aminoácidos como la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), o derivadas de está como la Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSP) [368] que promueven la adhesión, diferenciación de líneas celulares así como la reparación de heridas y homeostasis, lo que resulta muy atractivo para el campo de los biomateriales [369]. Por otra parte, para mejorar sus propiedades antimicrobianas se suelen conjugar agentes bactericidas o agentes vectorizantes (en caso de tratarse de nanopartículas) como lectinas [370], anticuerpos [371] o moléculas cargadas positivamente [372]. Otra estrategia empleada en andamios, consiste en anclar moléculas que impidan la colonización bacteriana del material, como sucede con el 2-metacriloiloxietilfosforilcolina (MPC), un polímero zwitteriónico que contiene una amina cargada positivamente y un fosfato cargado negativamente, formando un entorno de carga neutra que evita la adhesión bacteriana [373].

C) <u>Carga de fármacos en MBG</u>

Como ya se ha mencionado, la aplicación de los vidrios bioactivos como plataformas de liberación de biomoléculas se remonta al año 2000 cuando el grupo liderado por Vallet-Regí propuso el empleo del material MCM41 como sistema de liberación local de biomoléculas [200]. Desde entonces, se han propuesto una infinidad de moléculas con las que cargar los vidrios bioactivos, ya sea formando andamios o en nanopartículas. Las biomoléculas cargadas en su interior se pueden agrupar principalmente dentro de cinco categorías según su aplicación: Osteogénicas, angiogénicas, antiinflamatorio, antimicrobianos y antitumorales. Por lo general, los vidrios bioactivos que tienen como objetivo conformarse en andamios suelen cargarse con moléculas más relacionadas con la regeneración del tejido óseo y los procesos relacionados, como la osteogénesis, angiogénesis, procesos de inflamación e infección bacteriana [298], mientras que las moléculas cargadas en el interior de las nanopartículas están más relacionadas con el tratamientos dirigidos como antitumorales, bactericidas, de silenciamiento genético, entre otras [374].

Aunque los vidrios bioactivos son excelentes materiales candidatos para la ingeniería de tejidos debido a sus características osteogénicas y angiogénicas [174,175], no presentan propiedades antimicrobianas *per se*. En situaciones en las que se deba resolver una infección de osteomielitis crónica cuyo defecto óseo supere el tamaño crítico [148], será necesario aplicar un sustituto óseo acompañado de un tratamiento farmacológico [150]. Es por esta razón que la biomolécula más atractiva para cargar dentro de estos materiales sea un antibiótico.

Existen distintas familias de antibióticos entre las que destacamos las siguientes:

- **Fluoroquinolonas**: Son antibióticos derivados de las quinolonas. Su estructura consta de dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un carbonilo en la 4 y un carboxilo en la 3. Su diferencian principalmente respecto a las quinolonas radica en la adición de un átomo de flúor

en la sexta posición. Las fluoroquinolonas se caracterizan por su amplia penetración en los tejidos y rápida distribución. Esta familia de antibióticos tiene actividad de amplio espectro frente a bacterias aeróbica y debido su mecanismo de acción les permite tener cierta actividad frente a bacterias anaeróbicas. Estos fármacos inhiben la DNA girasa y la topoisomerasa IV bacteriana, ambas topoisomerasas tipo II, impidiendo los procesos de transcripción y replicación del DNA [375–378]. A esta familia pertenecen antibióticos como el levofloxacino (L) y el danofloxacino.

- **Glucopéptidos**: Son antibióticos de origen natural, producidos por diferentes microorganismos como *Actinoplanes* y *Streptomyces*. Se componen de un hepta-péptido unidos a 5-7 aminoácidos. Normalmente, las diferencias entre los glucopéptidos se deben a cambios en la posición 1 y 3. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis del peptidoglicano necesario para formar la pared celular bacteriana. Se unen a los residuos D-alanil-D-alanina de los precursores de la pared bacteriana impidiendo que las glicosiltransferasas puedan polimerizar la pared. Este mecanismo de acción presenta alta efectividad frente a las bacterias Gram + debido a que su pared bacteriana esta principalmente compuesta de peptidoglicano, sin embargo, no es eficaz para las bacterias Gram-, debido a su gran tamaño e incapacidad de atravesar la doble membrana lipídica [379]. Uno de los antibióticos representantes de esta familia es la vancomicina (V).

- **Aminoglucósidos**: Son antibióticos naturales o semisintéticos compuestos por un anillo aminociclitol al cual se unen dos o más azucares con o sin grupos aminos por medio de enlaces glucosídicos u oxídicos. En función de los distintos aminoazúcares el fármaco tendrá diferencias en la actividad, toxicidad y farmacocinéticas. Esta familia de antibiótico se caracteriza por tener un rápido efecto bactericida y un efecto post antibiótico prolongado. Su mecanismo de acción consiste en bloquear la posición A de en el RNA ribosómico 16S del ribosoma 30S. Esto da lugar a la producción de proteínas aberrantes que en último lugar causan daño en la membrana celular y en otros orgánulos bacterianos. Esta familia de antibióticos tiene una eficacia de amplio espectro, pero preferentemente frente a bacterias Gram - [380]. Uno de los representantes de esta familia es la gentamicina (G).

- **Rifamicinas**: Son antibióticos sintetizados de forma natural o artificial. Las rifamicinas pertenecen a una clase mayor de antibióticos conocidos como ansamicinas. Su estructura química está compuesta por un grupo naftohidroquinona cromóforo separado por un puente alifático con un grupo acetilo en el carbono 25. Su mecanismo de acción consiste en unirse a la subnidad β de la polimerasa de RNA dependiente de DNA, formando un complejo que inutiliza la enzima e impide la síntesis de RNA. Debido a este mecanismo de acción, tiene efecto de amplio espectro, pero principalmente en las Gram + [381]. Un ejemplo de esta familia de antibióticos es la rifampicina (R).

Debido a la presión medioambiental los microorganismos han ido desarrollando mecanismos de resistencia de fármacos. Esto ha supuesto un reto para la medicina actual lo que ha conducido que se

incentive el desarrollo de nuevos fármacos, terapias y formas de administración de los fármacos que actualmente disponemos con el fin de maximizar su eficacia. Motivados con este objetivo en la presente tesis se describen alternativas para el tratamiento de defectos óseos e infecciones en el tejido óseo.

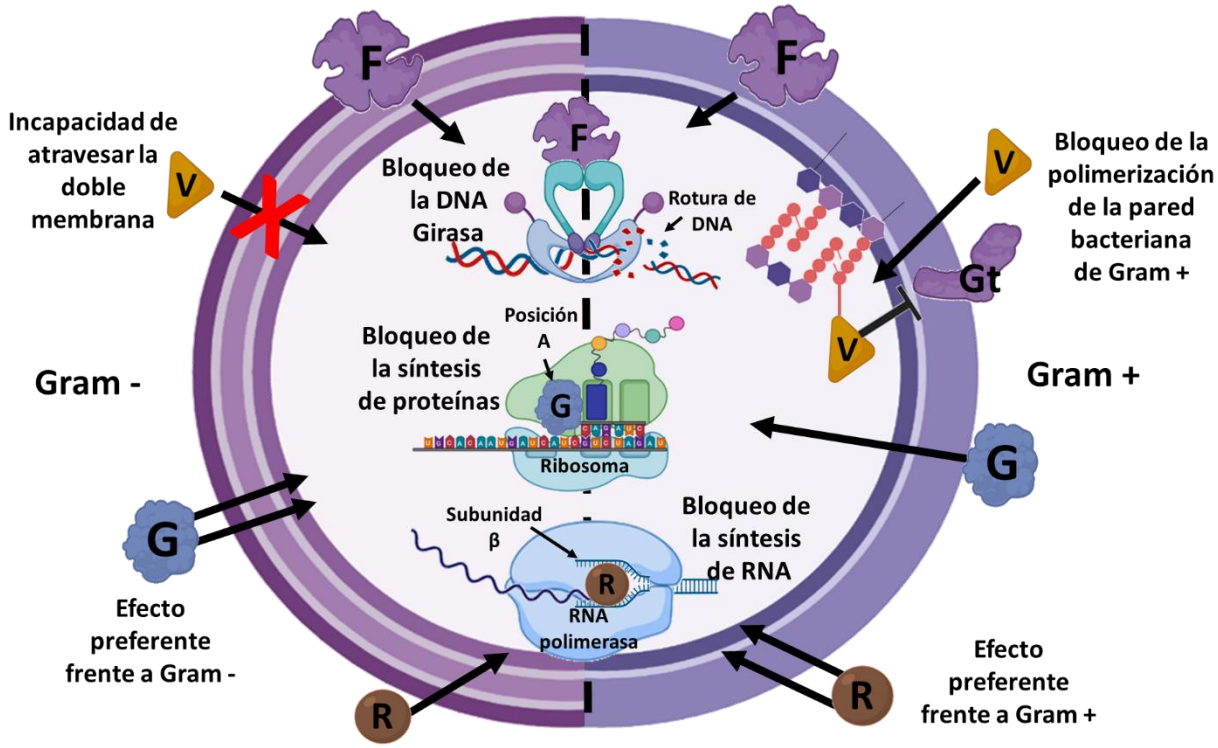


Figura 21. Bacteria modelo, mitad izquierda Gram-, mitad derecha Gram +. Mecanismo de acción de los antibióticos. Glucosiltransferasa (Gt), gentamicina (G), rifampicina (R), vancomicina (V), fluoroquinolonas (F). La colocación de los mecanismos de acción en el centro de la separación significa que el antibiótico presenta efecto de amplio espectro.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El principal objetivo de la presente tesis doctoral consistió en la síntesis, desarrollo, caracterización, así como el estudio de su comportamiento en ensayos *in vitro* de distintos biomateriales pertenecientes al sistema SiO_2–P_2O_5–CaO que tienen en común la propiedad de estimular la regeneración del tejido óseo y servir como plataforma de liberación de fármacos en el caso de que se trate de un escenario de osteomielitis.

Los objetivos concretos se desglosan a continuación en cinco puntos:

1. Síntesis y caracterización de vidrios mesoporosos bioactivos enriquecidos con hasta 5% de SrO, para la obtención de andamios 3D de vidrios mesoporosos bioactivos/Polivinil alcohol citocompatibles, mediante moldes de PLA sacrificables, así como la determinación de SrO óptima.

2. Estudio del potencial antibacteriano de un andamio de vidrio mesoporoso bioactivo/Policaprolactona/Gelatina enriquecido con iones Zn^{2+} y cargado con levofloxacino rifampicina, vancomicina y gentamicina frente a cepas bacterianas *E. coli* y *S. aureus*.

3. Optimización de las condiciones de síntesis y caracterización fisicoquímica de un vidrio mesoporoso bioactivo enriquecido hasta con 5% de CuO para estudiar la influencia de los catalizadores HNO_3 y HCl en su nanoestructura.

4. Evaluación del porcentaje atómico de CuO óptimo para el desarrollo de andamios de vidrio mesoporoso bioactivo/Polivinil alcohol enriquecidos con CuO citocompatibles y funcionalizados con grupos zwiteriónicos.

5. Desarrollo de nanopartículas huecas de vidrio bioactivas enriquecidas hasta con 5% de CuO para evaluar su citocompatibilidad en células pre-osteoblásticas, así como su potencial antibacteriano al cargar y liberar danofloxacino en presencia de iones CuO.

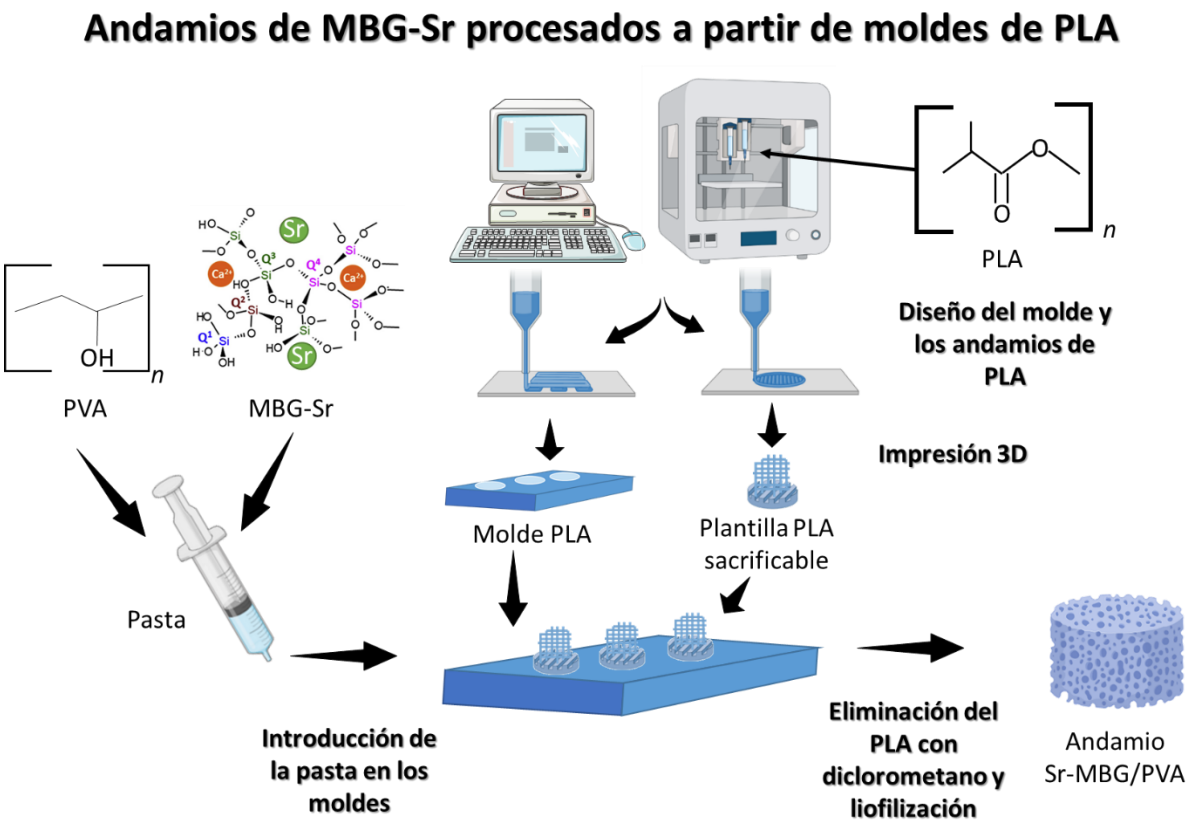
RESULTADOS

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Andamios 3D de MBG dopados con iones terapéuticos para aplicaciones clínicas

III.1.1 Sr-modified scaffolds based on MBG/Polyvinyl alcohol system for bone regeneration

III.1.1.1 Introducción



Esquema 1. Resumen gráfico de la conformación de andamios del trabajo titulado "Sr-modified scaffolds based on MBG/Polyvinyl alcohol system for bone regeneration". Polivinil alcohol (PVA), ácido poliláctico (PLA), vidrio mesoporoso bioactivo (MBG).

El gold standard para el tratamiento de defectos óseos es el injerto autólogo. Actualmente, no existe un material alternativo que cumpla todas las características que cumplen los injertos autólogos, pues contiene fragmentos de matriz ósea, factores de crecimiento, y células osteoprogenitoras del mismo paciente [161,162]. Sin embargo, la alta morbilidad que causa en la región donante y la escasez de tejido donante acrecientan la necesidad de un material sustitutivo del tejido óseo perdido.

Una de las alternativas más prometedoras es el empleo de vidrios mesoporosos bioactivos. Sus excelentes propiedades texturales como su elevada superficie específica y su composición química dentro del sistema ternario SiO_2—P_2O_5—CaO permiten desencadenar una respuesta bioactiva en menor tiempo en comparación con otras biocerámicas [203] en condiciones *in vitro* e *in vivo*. En estos sistemas, cada componente tiene una función durante el proceso de regeneración ósea [193]. Los

iones de silicio participa en diversos procesos clave como la formación y calcificación del hueso, induce a la precipitación del HCA en el tejido óseo y estimula la producción del colágeno tipo I [382–384]. Concentraciones de calcio apropiadas favorecen la proliferación osteoblástica, la diferenciación y la mineralización de la matriz extracelular [385]. Además se ha demostrado en experimentos *in vivo* que el calcio incrementa la formación de hueso, su densidad y la osteointegración de la pieza implantada [386]. Por otra parte, el fósforo forma junto con el calcio, fosfatos de calcio que permiten la nucleación de la hidroxiapatita y favorecen la diferenciación celular hacia fenotipos osteoblásticos [387].

La elevada porosidad de estos materiales permite que se dé lugar a un intercambio de iones de una forma nunca antes vista en otra biocerámica. Esto abre la puerta a la posibilidad de incorporar determinados iones con efecto terapéutico dentro del sistema ternario SiO_2–P_2O_5–CaO, con el objetivo de introducir o mejorar las propiedades del material, tales como la osteogénesis y cementogénesis [385,387,388].

Los MBG presentados en este trabajo se enriquecieron con iones Sr debido a sus propiedades terapéuticas. Entre las más notorias podemos destacar su capacidad de bloquear la osteoclastogénesis por medio del bloqueo de la ruta NF-κβ inducida por RANKL [307] y estimulación de la osteogénesis por medio de diversas rutas como la involucrada por el receptor sensor de calcio, la proteína quinasa Akt, la vía de Wnt/β-catenina y la señalización por medio de Ras/MAPK [303,304].

Para conformar este material en un andamio tridimensional se propuso el empleo de PVA como aglutinante, pues es un polímero biocompatible y biodegradable que sus productos de degradación no resultan citotóxicos para las células. El PVA una vez se entrecruza aumenta las propiedades físicas del andamio al aportar rigidez y flexibilidad [255]. Dada su complejidad para elaborar andamios meso-macroporosos mediante robocasting se propuso elaborar andamios tridimensionales por medio de una plantilla sacrificable y un molde de PLA, obtenidos por FDM [389,390], fácilmente eliminable mediante su disolución en diclorometano.

III.1.1.2 Resumen

Se llevó a cabo la síntesis, mediante el método EISA [202] de tres composiciones de MBG dentro del sistema SiO_2–P_2O_5–CaO incorporando dos cantidades de SrO con la finalidad de elaborar andamios meo-macroporosos tridimensionales.

Con este fin, se elaboraron tres composiciones de MBG en las que se fueron incorporando cantidades crecientes de SrO, hasta lograr incorporar un 5% molar, a partir de sus precursores (**Tabla 5**). Para ello se siguió la metodología modificada descrita por Cicuendez *et al*. [391].

Tabla 5. Nomenclatura y composición (%mol) de los MBGs enriquecidos con iones Sr.

Nomenclatura	Composición (% mol)
0Sr-MBG	$85SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO
2.5Sr-MBG	$82.5SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**2.5SrO**
5Sr-MBG	$80SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**5SrO**

Las tres composiciones exhibieron elevados valores de superficie específica, diámetro de poro y volumen de poro, incluso tras la adición del dopante. Sin embargo, si pudo observarse un ligero descenso de las propiedades texturales como consecuencia de la incorporación de un ion que actúe como modificador de red, como se ha observado previamente en otros trabajos [215,240,352]. Estos materiales presentaron ciclos de histéresis tipo H1 para las muestras sin estroncio y H2 para aquellas con dopante, indicando un tipo de poro cilíndrico y poro con forma de tintero, respectivamente.

Los resultados obtenidos por resonancia magnética nuclear (RMN) ^{29}Si mostraron que la incorporación de los iones Sr, producía un descenso considerable de la conectividad de la red de sílice, pues dichos iones de un mayor tamaño atómico que el Ca, sustituyen la posición que ocupa el Ca dentro de la red de sílice actuando como modificadores de red e impidiendo la condensación de los silanoles. Esta reducción de la conectividad da lugar a que las paredes de los materiales sean menos densas, se favorezca su degradación en fluidos fisiológicos. Por otra parte, los resultados obtenidos por RMN ^{31}P confirmaron los resultados obtenidos por el RMN ^{29}Si, al obtener un aumento de su participación en la formación de cluster de fosfato de estroncio.

La respuesta bioactiva de los MBG sintetizados fue estudiada al sumergir discos densos de 10 mm de los materiales en SBF. Los tres materiales mostraron una respuesta bioactiva en menos de 24 h, al observarse en los análisis por FTIR la aparición de un máximo entre los 600 y 570 cm^{-1}, y entre 1420 y 1450 cm^{-1}. La inclusión de los iones Sr, mostró una ralentización en la respuesta bioactiva.

En cuanto a la liberación de iones, las Sr-MBG prensadas en discos densos liberaron concentraciones crecientes de iones Ca^{2+}en la misma medida que aumentaba la cantidad de Sr en la red de sílice, pudiendo correlacionarse estos datos con aquellos obtenidos por RMN ^{29}Si en los que se mostraba una mayor despolimerización en la red. Sin embargo, esté aumento no se vio correspondido en la liberación de fósforo. Las muestras enriquecidas con Sr liberaron suficiente concentración de iones Sr como para ejercer un efecto biológico, pero sin llegar a resultar citotóxico, pues las cantidades liberadas son fácilmente excretadas a través de la orina [392].

Para la conformación del andamio tridimensional se elaboró una plantilla sacrificable y un molde de PLA, previamente por FDM. Seguidamente se elaboró una pasta mezclando MBG y PVA en una proporción (76/24 % en peso). Una vez el negativo del andamio se introdujo en el molde de PLA, se extruyó la pasta con una jeringa para introducirlo en el interior del negativo de PLA. Tras su secado, se extrajo el negativo mediante la inmersión del andamio en diclorometano y su posterior secado por liofilización.

Los ensayos *in vitro* de colonización celular mostraron la capacidad de los andamios de hospedar células pre-osteoblásticas con un fenotipo favorable. Además, los estudios de citocompatibilidad mostraron una inducción significativamente superior de la proliferación obtenida por los andamios 2.5Sr-MBG respecto al resto de composiciones. Por otra parte, los análisis realizados mediante PCR cuantitativa indicaron que además para esta composición se producía un aumento significativo de la expresión de marcadores tempranos de diferenciación celular a líneas osteogénicas como son ALP y RunX2.

Estos resultados indican que la muestra de composición $82.5SiO_2$–$5P_2O_5$–10CaO–**2.5SrO** no solo representa una plataforma idónea para la colonización de una población de células pre-osteoblásticas, sino que, además, induce activamente su proliferación y diferenciación. Este trabajo presenta novedosos avances en el diseño de plataformas que permitan recuperar la funcionalidad de tejidos óseos dañados, sin embargo, se necesita de más investigación que profundice en su potencial como plataforma de liberación de biomoléculas cargadas en el interior de sus poros.

materials

MDPI

Article

Strontium-Modified Scaffolds Based on Mesoporous Bioactive Glasses/Polyvinyl Alcohol Composites for Bone Regeneration

Javier Jiménez-Holguín [1,†], Alvaro López-Hidalgo [1,†], Sandra Sánchez-Salcedo [1,2,*], Juan Peña [1,2], María Vallet-Regí [1,2] and Antonio J. Salinas [1,2,*]

1 Department of Química en Ciencias Farmacéuticas, Faculty of Farmacia, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, imas12, Universidad Complutense, UCM, 28040 Madrid, Spain; javiej03@ucm.es (J.J.-H.); alvlop06@ucm.es (A.L.-H.); juanpena@ima.ucm.es (J.P.); vallet@ucm.es (M.V.-R.)

2 Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: sansanch@ucm.es (S.S.-S.); salinas@ucm.es (A.J.S.)

† Authors had equal contribution.

Received: 17 October 2020; Accepted: 29 November 2020; Published: 3 December 2020

Abstract: In the search of a new biomaterial for the treatment of bone defects resulting from traumatic events, an osteoporosis scenario with bone fractures, tumor removal, congenital pathologies or implant revisions for infection, we developed 3D scaffolds based on mesoporous bioactive glasses (MBGs) $(85 - x)SiO_2–5P_2O_5–10CaO–xSrO$ (x = 0, 2.5 and 5 mol.%). The scaffolds with meso-macroporosity were fabricated by pouring a suspension of MBG powders in polyvinyl alcohol (PVA) into a negative template of polylactic acid (PLA), followed by removal of the template by extraction at low temperature. SrO-containing MBGs exhibited excellent properties for bone substitution including ordered mesoporous structure, high textural properties, quick in vitro bioactive response in simulated body fluid (SBF) and the ability of releasing concentrations of strontium ions able to stimulate expression of early markers of osteoblastic differentiation. Moreover, the direct contact of MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells with the scaffolds confirmed the cytocompatibility of the three compositions investigated. Nevertheless, the scaffold containing 2.5% of SrO induced the best cellular proliferation showing the potential of this scaffold as a candidate to be further investigated in vitro and in vivo, aiming to be clinically used for bone regeneration applications in non-load bearing sites.

Keywords: mesoporous glass scaffolds; SrO; cytocompatibility; pre-osteoblastic cells

1. Introduction

In the case of serious injury, bone tissue is not able to regenerate such damage, and a bone graft is required. The gold standard is bone autograft since it gathers all properties needed in all bone-grafting materials such as osteoinduction, osteogenesis and osteoconduction [1,2]. The problems related to autografts are the limited availability of tissues for this purpose and that the harvest of these materials are associated with severe pain in the operated region and are prone to bacterial adhesion as a result of surgery and prosthetic rejection [3,4].

Due to the economic cost and poor availability of tissues for bone grafting, several artificial biomaterials have been developed to replace autografts, many of them being bioceramics [5]. In this family of compounds, mesoporous bioactive glasses (MBG) of the $SiO_2–CaO–P_2O_5$ system represent a group widely proposed as optimum candidates for bone substitution because the inductive effect of Si(IV), P(V) and Ca^{2+} ions released to the surrounding medium [5,6]. MBGs exhibit high surface area and pore volume that enhance the in vitro bioactive response [7,8] and enable promoting the proliferation

and differentiation of osteogenic related cells [9], as well as hosting different molecules with biological activity [10,11]. Furthermore, silanol groups (Si−OH) on the surface of these materials allow the functionalization with diverse groups like amines and carboxylic acids, among others, to modulate their response in the biological medium [12,13]. An additional property of these glasses is that they allow the incorporation in their structure of therapeutic ions such as copper, gallium, cerium, zinc, strontium etc. [14–22], to be progressively released, acting as ion control-delivery systems. Although strontium is not considered to be an essential element, it has been demonstrated that strontium also promotes both osteogenic proliferation and differentiation through several pathways such as Wnt/β-Catening signaling [23], Ras/MAPK signaling [24] and the Ca sensing receptor (CasR) [25]. On the other hand, it is well known that strontium has the ability to inhibit osteoclastogenesis, blocking the interaction between Rank ligand and its receptor [26]; Strontium also inhibits osteoclasts differentiation [27] and promotes osteoclasts apoptosis mediated by CasR [28].

A recent approach for the release of therapeutic ions and molecules is the use of three-dimensional scaffolds obtained by 3D printing [29]. For this purpose, a paste based on MBG and a binding agent such as polyvinyl alcohol (PVA) is commonly used due to its variety of applications within the field of tissue engineering [30]. However, in many cases the preparation of a suitable paste for extrusion thereof is difficult and laborious to optimize.

Taking these points into account, the application of this system as a three-dimensional scaffold has been proposed using a slurry based on MBG/PVA and a negative mould obtained by 3D printing [31,32], employing polylactic acid (PLA) that was removed by extraction to obtain a macroporous scaffold.

Several biomaterials were developed for the treatment of bone defects resulting from traumatic events, an osteoporosis scenario with bone fractures, tumor removal, congenital pathologies, and implant revisions of infection. With this aim, this paper describes the synthesis, characterization and in vitro cytocompatibility in pre-osteoblasts cultures of the SrO-containing meso-macroporous MBG scaffolds. With this purpose, three MBGs with composition (in mol.%) $(85 - x)SiO_2–5P_2O_5–10CaO–xSrO$ (x = 0, 2.5 and 5) were investigated. After the microstructural characterization, MBG powders were compacted into disks to evaluate, in vitro, their bioactive response and ions release capability. Finally, the cytocompatibility of MBG/PVA 3D scaffolds was assessed in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cell cultures.

Therefore, the final goal of this study was twofold, on the one hand to check whether this less common processing method would allow us to obtain useful meso-macroporous scaffolds for bone tissue engineering applications in non-load bearing sites and, above all, to check whether the release of strontium ions contained in the scaffolds would produce advantages for this clinical application.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of the Mesoporous Bioactive Glasses

Three MBGs $(85 - x)SiO_2–10CaO–5P_2O_5–x$ SrO, (x = 0, 2.5 and 5 mol.%) were synthesized by the evaporation-induced self assembly (EISA) method. HNO_3 0.5 M was used as a catalyst and $Ca(NO_3)_2·4H_2O$, tetraethyl orthosilicate (TEOS), triethyl phosphate (TEP) and $Sr(NO_3)_2$ as calcium, silica, phosphate and strontium sources, respectively. (The reactants were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Briefly, the synthesis was performed following the procedure previously published [33,34], by mixing Pluronic® F127, ethanol (99.98%), distilled water and HNO_3 in a glass flask covered with Parafilm® and kept 1 h under stirring. The amounts of each reactant (Table 1) were added sequentially at 60 min intervals; the mixture was kept 14 h at 40 °C under stirring. Afterwards, in order to evaporate the ethanol, the mixture was poured into open Petri dishes and kept 4 d at 30 °C in a stove to evaporate the solvent. Throughout this process, the critical micellar concentration was reached, allowing the mesoporous phase to be obtained. The MBG powders were obtained after heating the so obtained laminar dry gels for 6 h at 700 °C (heating ramp of 1 °C/min) and crushing and sieving with a 40 μm mesh, giving rise to 0, 2.5 and 5Sr-MBG powders.

Table 1. Amounts of reactants used for the synthesis of the mesoporous bioactive glasses (MBGs).

Sample	F127 (g)	Et-OH (mL)	H_2O (mL)	HNO_3 0.5 M (mL)	TEOS (mL)	TEP (mL)	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (g)	$Sr(NO_3)_2$ (g)
0Sr-MBG	8.25	71.32	8.2	6.92	15.7	1.4	1.96	0
2.5Sr-MBG	8.25	71.32	8.2	6.92	15.4	1.4	1.96	0.44
5Sr-MBG	8.25	71.32	8.2	6.92	15	1.4	1.96	0.88

2.2. Characterization of MBGs

To evaluate the physicochemical characteristics of the materials and verify their suitability for the objective of our study, MBG powders were initially characterized by small-angle X-ray diffraction, SA-XRD, in a X'pert-MPD system (Eindhoven, The Netherlands) equipped with Cu Kα radiation in the 0.6° to 8° 2θ range; by thermogravimetric and differential thermal analysis (TG/DTA) from 30 °C to 900 °C with a ramp of 5 °C/min (air flow: 100 mL/min) in a Perkin Elmer Pyris Diamond system (Waltham, MA, USA); by Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) in a Thermo Scientific Nicolet iS10 apparatus (Waltham, MA, USA) equipped with a SMART Golden Gate attenuated total reflection (ATR) diffuse reflectance accessory and by scanning electron microscopy (SEM) in a JSM-7600F (JEOL) microscope (Tokyo, Japan), which operates between 5 and 15 kV, coupled with an energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) system (Oxford Instruments, Abingdom, UK). Moreover, MBG powders were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) in a JEM-2100 JEOL microscope operating at 200 kV (Tokyo, Japan). Furthermore, the composition of the sample was determined by energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) with an Oxford LINK EDS analyzer coupled to the TEM microscope.

On the other hand, the MBGs texture was characterized by nitrogen adsorption using a Micromeritics 3 Flex (Norcross, GA, USA) that allowed obtaining the surface area, SBET, by the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method [35], and pore size distributions by the Barret–Joyner–Halenda (BJH) method [36]. Finally, ^{29}Si and ^{31}P solid state single pulse magic angle spinning nuclear magnetic resonance (SP MAS-NMR) were performed in a Bruker Avance AV-400WB spectrometer (Karlsruhe, Germany) equipped with a 4 mm zirconia rotor. Frequencies used were 79.49 and 161.97 MHz for ^{29}Si and ^{31}P, respectively, and chemical shift values were referenced to tetramethylsilane for ^{29}Si, and H_3PO_4, for ^{31}P. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were assembled with the OriginLab 7.0 software (OriginLab Corporation, MA, USA). The quality of the adjustment of the spectra was verified by comparing the agreement of the experimental and calculated spectra.

2.3. In vitro Studies in Acellular Solutions

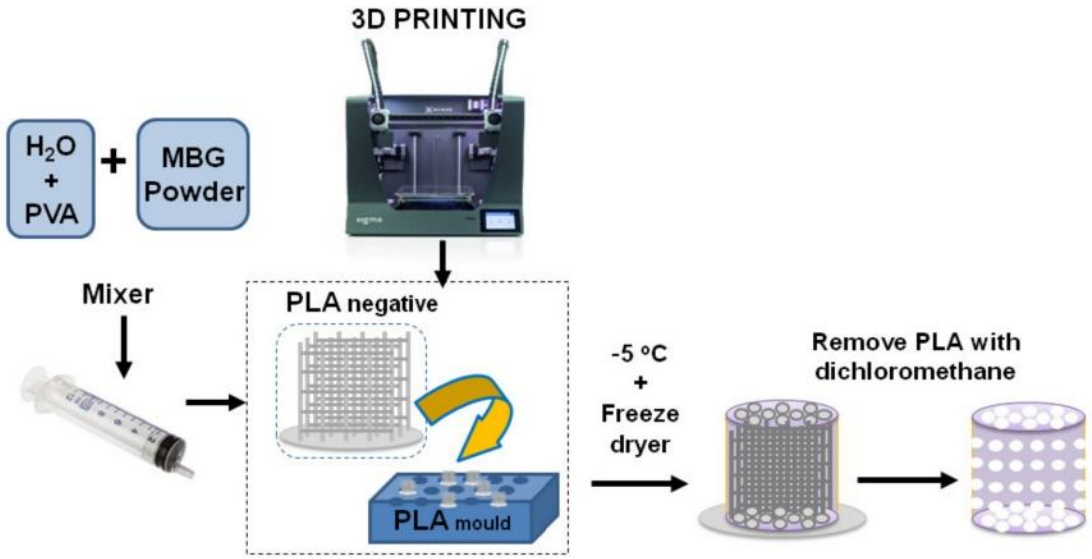
In vitro studies were performed on disks (10 mm diameter, 1 mm high) obtained by compacting 100 mg of powdered MBG with 5 MPa of uniaxial pressure for 1 min. Surface reactivity was assessed by monitoring the formation of an apatite-like layer on the surface of the MBG disks after immersion in simulated body fluid (SBF) [37]. In addition, the release of ions was investigated by soaking the disks in Eagle's minimal essential medium (MEM).

The MBG disks were previously sterilized for 20 min under UV radiation (10 min per side) in a laminar flow cabinet and the SBF solution was filtered through a 0.22 μm filter to avoid bacterial contamination. MBG disks were immersed for 8, 24 and 72 h in 30 mL of SBF at 37 °C, pH 7.4. The volume of SBF was chosen according to previous studies [38], to keep the ratio $V_S = D_S/0.075$ constant, where V_S is the volume of SBF (mL) and D_S is the external geometric area (cm^2) of the sample. MBG disks were immersed, hanging from the lid with a platinum wire, in the SBF medium within polypropylene flasks [16]. Tests were carried out with two replicates per material and a control of SBF without material. After the test finished, disks were removed and rinsed with acetone and ethanol (to stop the apatite formation reaction and to dry the disks). The disks were stored in an oven at 60 °C for further characterization [39]. The formation of an apatite-like phase was characterized by FTIR spectroscopy and SEM.

Ion release assay from MBG disks was performed by placing each disk on a plate with transwell immersed in 2 mL of MEM with 0.5% of streptomycin/penicillin (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA). This allowed obtaining aliquots of medium without MBG grains. An aliquot was extracted after 8 h and each day for one week. The cumulative concentrations of Ca(II), P(V) and Sr(II) in the culture medium were obtained by Inductively Coupled Plasma/Optical Spectrometry (ICP/OES) using an OPTIMA 3300 DV device (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Three measurements were made on each of the two replicates per composition examined.

2.4. Processing of MBG Scaffolds

To fabricate the scaffolds, a 15% of PVA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) suspension was prepared by mixing 1.25 g of PVA in 10 mL of miliQ H_2O at 90 °C under magnetic stirring [40]. The addition of the polymeric additive (PVA) was necessary to obtain a workable paste [30,41]. Then, 5 mL of the PVA solution was introduced in an Intertronics Think ARE-250 automatic mixer (Oxfordshire, England), together with six agate mixing balls (1 cm in diameter). After that, MBG component was sequentially added in four mixing cycles (1.38, 1.38, 0.69 and 0.69 g) to ensure an adequate viscosity and homogeneity of the paste. On the other hand, the negative templates and external moulds were fabricated with PLA by using a 3D printer (Sigma BCN3D printer, Barcelona, Spain). The PVA/MBG paste was introduced into the PLA negative template with a syringe that facilitated the penetration of such paste within the voids of the PLA negative template. This ensemble was left to dry for 4 h, removed from the external mould and lyophilized in a Telstar LyoQuest freeze dryer (Tarrasa, Spain). This technique ensured the complete drying of the resulting scaffold without a noticeable shrinkage. The final step of this procedure involved the elimination of the PLA negative mould by successive washes in dichloromethane (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The complete elimination of such solvent was carried out in a vacuum oven at 40 °C for 48 h (Scheme 1).



Scheme 1. Manufacturing process of Sr-modified PVA/MBG scaffolds obtained by combining polylactic acid (PLA) negative template and mould using a low temperature method.

2.5. In vitro Cytocompatibility Assays

All these assays were performed on the PVA/MBG scaffolds irradiated with UV light for 5 h on each side. Pre-osteoblastic mouse cells MC3T3-E1 (subclone 4, CRL-2593; ETCC, Mannassas, VA, USA) were cultured in supplemented medium, α-MEM with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), 1% penicillin-streptomycin and 5 mM of L-glutamine (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), in a 5% CO_2 atmosphere at 37 °C. Cells were

washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), 1% penicillin-streptomycin and 5 mM L-glutamine and collected using 5 mL of 0.25% trypsin-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), 1% penicillin-streptomycin and 5 mM L-glutamine. Cells suspensions were centrifuged 10 min at 1200 rpm. The resulting material was resuspended with fresh medium and $2.5 \cdot 10^5$ cells were seeded onto the scaffold top surface for the analysis of pre-osteoblastic cells viability, proliferation, cytotoxicity and expression of markers of osteoblastic differentiation. Three controls and three replicates per sample were carried out and incubated at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere.

2.5.1. Morphological Studies by Confocal Laser Scanning Microscopy

Cell morphology was studied using fluorescence microscopy with a confocal scanning microscope OLYMPUS FV1200 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) using a 60X FLUOR water dipping lens (NA = 1) after 24 h. Cells were incubated 24 h at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. After incubation, media were removed and washed twice with PBS. Then, cells were fixed with 75% ethanol and stained with Phalloidin-ATTO 565 (dilution 1:40, Molecular Probes) for 10 min. Next, enough volume to cover the scaffolds of Fluoroshield® with DAPI (1:1000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added for 10 min. Thereafter, each plate was washed twice and remained with PBS. DAPI and Atto 565-phalloidin staining were shown in blue and red, respectively. Micrographs were obtained using FV10-ASW (4.2 Version, Waltham, MA, USA) to construct a single 2D image, which was converted into a TIF image file using multiple images obtained from each section in the Z axis using an algorithm that shows the maximum value of pixels of each section in Z for each 1 µm.

2.5.2. Proliferation Assay and Cytocompatibility Assay

The pre-osteoblastic cell growth onto the scaffolds was determined by fluorescence intensity with a Synergy4 Multimode Plate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) at 1, 3, 7 and 10 d with excitation and emission wavelengths of 560 and 590 nm, respectively. Alamar Blue method (AbD Serotec, Oxford, UK) was used, by following the manufacturer's instructions. Scaffolds were exposed to 1:10 AlamarBlue® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) solution for 4 h in darkness before fluorescence measurements.

The medium used for culture cells at 7 d was used for the lactate dehydrogenase (LDH) test (Spinreact, Girona, Spain). The mixture of medium and reagent was measured after 7 d of cell seeding at 340 nm every 60 s for 4 min in a Synergy4 Multimode Plate Reader.

2.5.3. Real Time PCR

Total RNA was isolated from cells seeded onto the scaffolds after 10 d of cell culture (Trizol, Invitrogen, Groningen, The Netherlands). Gene expression of two osteoblastic differentiation markers, alkaline phosphatase (ALP) and runt related transcription factor-2 (RUNX2) were analyzed by real time PCR using QuantStudio5 equipment and a described protocol (Applied Biosystems-Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) [39]. TaqMan^{MGB} probes were obtained by Assay-by-Design^{SM} (Applied Biosystems). For each sample and using the cycle threshold (Ct) value, mRNA copy numbers were calculated and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) rRNA (a housekeeping gene) was amplified in parallel with the tested genes. The number of amplification steps required to reach an arbitrary Ct was computed. The relative gene expression was represented by $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{target gene}} - \Delta Ct_{GAPDH}$. The fold change for the treatment was defined as the relative expression compared with the control GAPDH expression, calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = \Delta C_{\text{treatment}} - \Delta C_{\text{control}}$.

2.6. Statistical Analysis

Results were expressed as the mean ± SEM (standard error of the mean) of 6 specimens split in two independent experiments (3 separate groups of samples in each one). Statistical analysis was

performed with the nonparametric Kruskal–Wallis test and post-hoc Dunn´s test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

3.1. Microstructural Characterization of MBGs

First, EDS and FTIR studies allowed confirming the complete elimination of the surfactant Pluronic® F127 used during the MBG powders synthesis, a critical determination before using these materials for the in vitro studies. Moreover, the powders that will be termed along the study as 0, 2.5 and 5Sr-MBG were characterized by TEM and SA-XRD to confirm the preservation of the mesoporous structure.

As shown in Figure 1, all samples exhibited high mesopore order, even those doped with the highest SrO content (5%). As it is observed, the three samples exhibited mesoporous order, including 5Sr-MBG where the image was taken in the perpendicular orientation, to check that in this case the order was also preserved. Moreover, the strontium content proportionally increased from 2.5Sr-MBG to 5Sr-MBG. as shown in the inset spectra of Figure 1 and in Table 2 that includes the atomic percentages of each element obtained by EDS. As it is observed, the nominal atomic compositions used in the synthesis process were close to those obtained experimentally, except for 5Sr-MBG that has an atomic composition that is 22% less than the nominal one, i.e., the SrO content was 3.7% instead of the intended 5%.

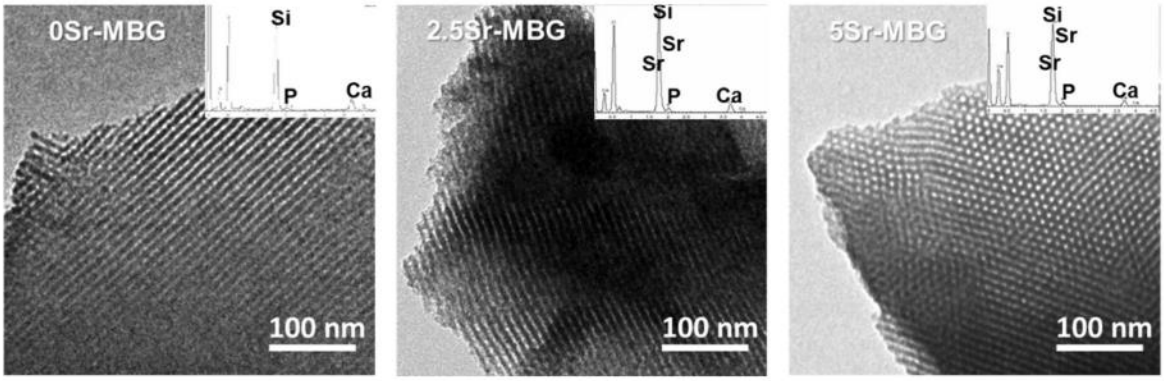


Figure 1. Transmission electron microscopy (TEM) micrographs and their corresponding energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) spectrum of 0, 2.5 and 5Sr-MBG samples.

Table 2. Textural properties of the powders (S_{BET}, V_P and D_P) obtained by N_2 adsorption. Interplanar d_{10} spacing, obtained by X-ray diffraction (XRD), and calculated unit cell parameters (a_o). Composition in oxides of each MBG was determined by EDS, including the intended nominal values in brackets. The error of mean values represents a coefficient of variation of <7% for each experimental value in the table.

Sample	Powders					Atomic Composition wt.% (EDS)			
	S_{BET} (m^2/g)	V_P (cm^3/g)	D_P (nm)	d_{10} (nm)	a_o	SiO_2	CaO	P_2O_5	SrO
0Sr-MBG	307	0.42	7.03	9.6	11.1	87.4 (85)	9.8 (10)	2.8 (5)	-
2.5Sr-MBG	185	0.24	6.16	9.2	10.6	82.7 (82.5)	6.1 (10)	8.3 (5)	2.9 (2.5)
5Sr-MBG	141	0.19	5.72	9.2	10.6	85.5 (80)	5.2 (10)	5.6 (5)	3.7 (5)

Well-defined XRD spectra in Figure 2A confirm the mesoporous order [37]. However, as can be observed, the mesoporous order decreased with the strontium additions, being the least ordered with

the highest SrO content, i.e., 5Sr-MBG sample. Table 2 shows the interplanar distances (d_{hk}) for the direction (10). The unit cell (a_0) was then calculated by the formula $a_o = 2d_{10}/\sqrt{3}$. The term a_0 is the distance between pore centers and can be obtained by crystallographic determinations according to a hexagonal unit cell of the P6m planar group [42,43]. Moreover, the wall thickness of the mesoporess (t_{wall}) can be calculated by comparing a_o with the pore size value (D_P) obtained by nitrogen adsorption analysis. For hexagonal p6mm structures $t_{wall} = a_o - D_P$.

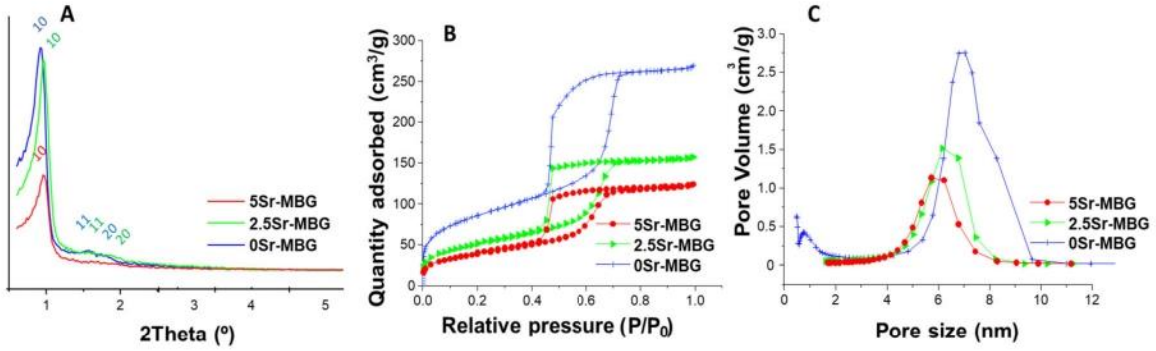


Figure 2. MBG powders characterization: (**A**) small-angle X-ray diffraction (SA-XRD) patterns. (**B**) Nitrogen adsorption–desorption isotherms and (**C**) pore size distributions of 0, 2.5 and 5Sr-MBG.

Figure 2B shows the N_2 adsorption isotherms for the MBG samples. 0Sr-MBG exhibits the characteristic type IV adsorption isotherm of a mesoporous material that varies due to the addition of Sr to the structure. The hysteresis cycle of Sr-free MBG shows the H1 type cycle, associated with porous materials with well-defined cylindrical pore channels. For strontium doped MBGs H2 type hysteresis cycles were obtained, indicative of porous materials that become disordered when the distribution and size of the pores is not well defined, and it is also distinctive of materials with pores in the form of an inkwell [44]. Considering pore diameter distribution (Figure 2C), the presence of mesopores was observed for all samples, but micropores were only detected for the Sr-free sample.

Table 2 also includes the textural properties of the powders, BET surface (S_{BET}), pore volume (V_P) and pore diameter (D_P). As is observed, the increase of Sr in the MBGs structure decreased and consequently increased t_{wall}, which finally induced a noticeable decrease on S_{BET} (from 307 to 141 m^2/g), V_p (from 0.42 to 0.19 cm^3/g) and D_P (from 7 and 5.7 nm). These results confirmed previously reported results indicating that the incorporation of Sr^{2+} ions in MBG causes a partial loss of textural properties [15,16,19,21,45]. This loss can be explained by the incorporation of strontium ions to the silica network as network modifiers, replacing calcium ions. Strontium ions are larger than calcium ones, making the silica lattice thicker and less dense, as can be deduced from Table 2. This could be the same reason why we found a decrease in the mesoporous order (Figure 2A).

To study the atomic environment of the silica matrix of samples, ^{29}Si and ^{31}P NMR measurements were performed. Figure 3 collects the ^{29}Si and ^{31}P solid state NMR spectra of the different samples; Q^2, Q^3 and Q^4 represent the silicon atoms (indicated by Si*) in $(NBO)_2Si^*–(OSi)_2$, $(NBO)Si^*–(OSi)_3$, and $Si^*(OSi)_4$ (NBO = non-binding oxygen), respectively. The signals at −111 to −112 ppm were assigned to Q^4, at −103 to −104 to Q^3 and at −95 to −98 to Q^2 [46].

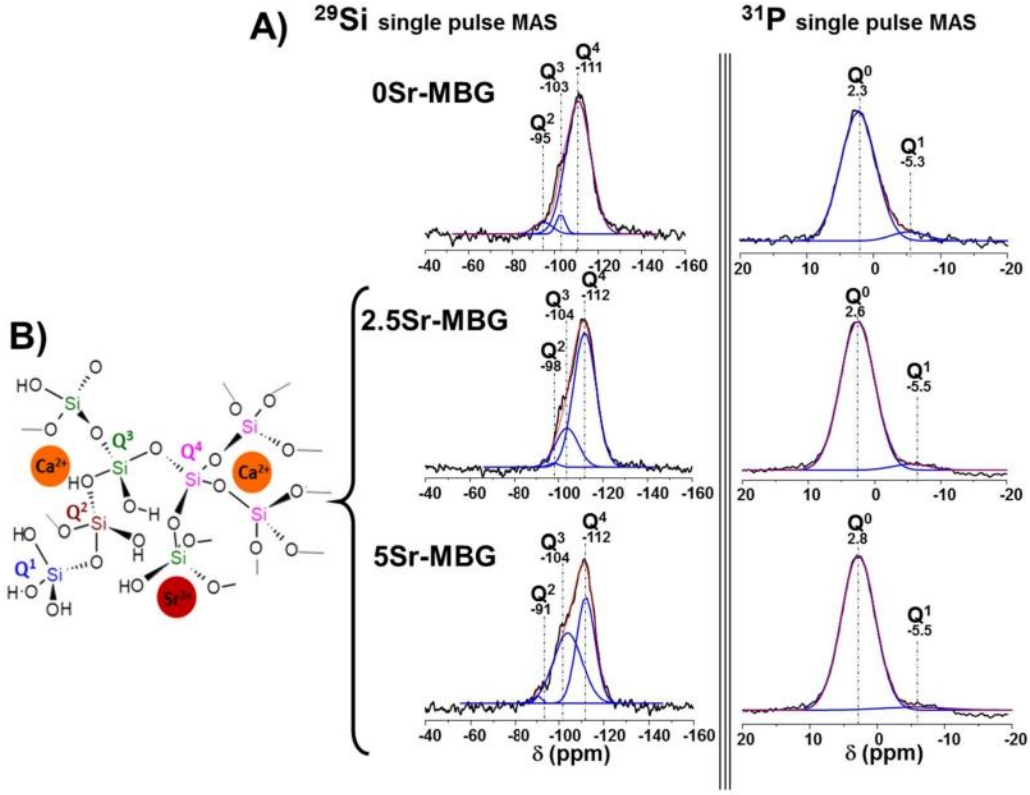


Figure 3. (**A**) Solid-state ^{29}Si and ^{31}P single-pulse magic angle spinning nuclear magnetic resonance (SP MAS-NMR) spectra of MBG samples. Q^n areas were calculated by Gaussian line–shape deconvolution and are displayed in green. (**B**) Graphical representation of the silica structure of 0, 2.5 and 5Sr-MBG. The error associated to the fitting was the difference between the black and red lines.

Table 3 includes the chemical shifts (CS), relative areas of the peaks corresponding to ^{29}Si and ^{31}P, respectively, and the silica network connectivity, $<Q^n>$. The NMR spectra in Figure 3 reveal that when the SrO content was increased, a huge Q^4 percentage decreased together with a parallel increase of Q^3. Meanwhile, the network connectivity $<Q^n>$ of samples decreased from 3.826 to 3.474. These results indicate that strontium incorporates to the MBG structure and acts as a network modifier since it inhibits silanol condensation, thus favoring network depolymerisation according to the proposed model for the modified silica network structure [47], as previously mentioned.

Table 3. Chemical shifts (CS) and the relative peak areas obtained by solid state ^{29}Si and ^{31}P single pulse MAS NMR spectroscopy. The peaks areas for the Q^n units were calculated by Gaussian line–shape deconvolution; their relative populations were expressed as percentages (%).

Sample	^{29}Si							^{31}P			
	Q^4		Q^3		Q^2		$<Q^n>$*	Q^0		Q^1	
	CS ppm	Area %	CS ppm	Area %	CS ppm	Area %		CS ppm	Area %	CS ppm	Area %
0Sr-MBG	−111	89.2	−103	4.6	−95	6.0	3.826	2.3	93.4	−5.3	6.5
2.5Sr-MBG	−112	76.8	−104	22.1	−98	1.0	3.755	2.6	95.6	−5.5	4.3
5Sr-MBG	−112	48.7	−104	50.2	−91	1.0	3.474	2.8	96.5	−5.5	3.4

* $<Q^n> = (4x\%Q^4)/100 + (3x\%Q^3)/100 + (2x\%Q^2)/100$.

Concerning ^{31}P solid state NMR spectra, Q^0 and Q^1 represent, respectively, the phosphorus atoms (indicated by P*) in $(NBO)_3P^*-(OP)$ and $(NBO)_2-P^*-(OP)_2$. The signals at 1.8 to 2.2 ppm were assigned

to Q^0, the typical environment of amorphous orthophosphate, while signals around −7 ppm were attributed to Q^1 tetrahedra [46]. Q^0 values increased up to 96.5 and, consequently, Q^1 decreased from 6.5 to 3.4 as a consequence of the strontium ions increment in the silica matrix that led to a decrease of P–O–Si units.

This characterization confirmed that strontium inclusion causes a less polymerized structure as can be deduced from the detected decrease of the silicon–oxygen and phosphorous–oxygen interpenetrating networks. Accordingly, bioactive glasses became more amorphous and, thus, they can be tailored as a function of strontium additions [38].

3.2. In Vitro Studies in Acellular Solutions

The bioactivity tests of the MBG disks consisted of monitoring the deposition of a nanometric carbonate hydroxyapatite (n-CHA) layer after being immersed 8, 24 and 72 h in SBF by FTIR and SEM. This process begins with the formation of silanol groups on the MBG surface due to the ionic interchange between the ions from the glass and protons in the SBF. Next, the silanol groups begin to condense and the surrounding environment becomes acidic. This decrease in pH guarantees nucleation so that amorphous calcium phosphate (a-CaP) begins to precipitate, and over time it matures to n-CHA [48].

FTIR spectra of MBGs before soaking displayed in Figure 4 are characterized by two strong absorption bands: one at 400–500 cm^{-1} and another one at 1100–1000 cm^{-1}, corresponding to the asymmetric bending vibration of the Si−O−Si bond and a third strong band at around 800 cm^{-1} of the symmetrical stretching vibration of the Si−O bond [48].

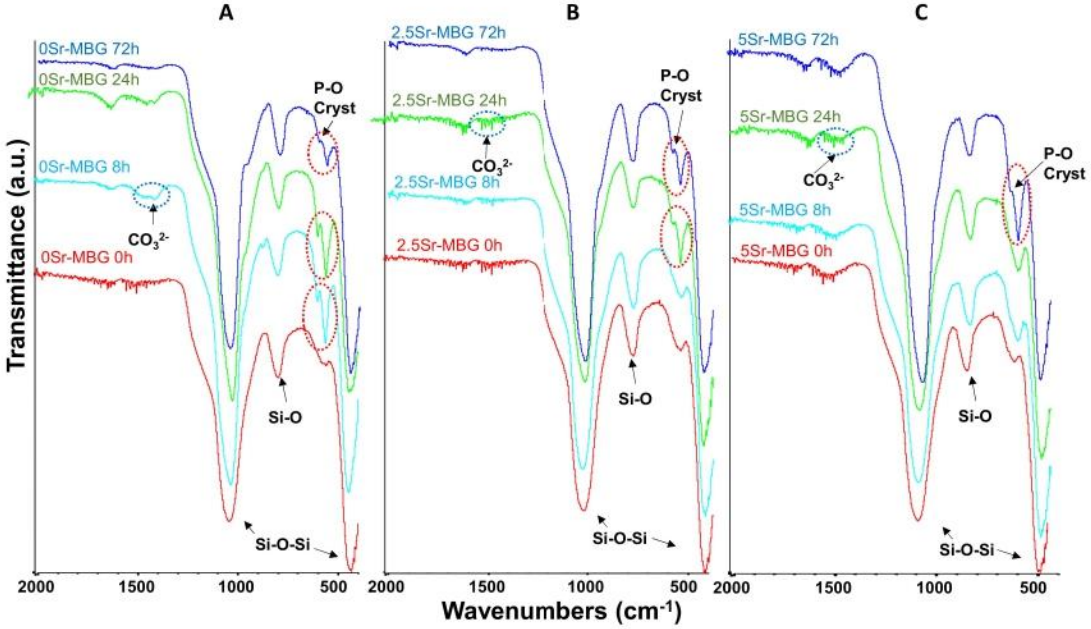


Figure 4. Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) spectra of (**A**) 0Sr-MBG, (**B**) 2.5Sr-MBG and (**C**) 5Sr-MBG disks soaked in simulated body fluid (SBF) between 0 and 72 h. The red circles highlight the bands of crystalline phosphate and the blue circles highlight the bands of carbonate groups, both indicative of the nanometric carbonate hydroxyapatite formation. (**A**–**C**).

The formation of the n-CHA layer can be detected by the presence of two bands at 600 and 570 cm^{-1}, indicative of the presence of the P−O vibration in a crystalline environment, and another two bands at 1420 and 1450 cm^{-1}, attributable to carbonate ions (CO_3^{2-}). In the case of 0Sr-MBG, both types of evidence can be clearly observed within the first 8 h of immersion. The Sr inclusion retards the mineralization process as can be deduced from the delayed observation of these bands: the double peak of crystalline P−O cannot be detected until 24 h for the 2.5Sr-MBG sample and 72 h

for the 5Sr-MBG sample. However, the first evidence of carbonate is observed only after one day in both samples.

The morphological modifications caused by the formation of the n-CHA layer can be observed in Figure 5, which collects the SEM micrographs as well as the EDS spectra at the different soaking times. As expected from the FTIR results, 0Sr.MBG shows at 8 h the presence of a newly formed layer composed by nanometric needle-like crystals of n-CHA. When the soaking time increases, the thickness of the coating increases, as can be deduced from the progressive diminution of the Si signal, compared to the Ca and P ones, in the EDS spectra. SEM and EDS analysis also confirmed the FTIR results, showing a delay in the formation of needle-like crystals layer for 2.5Sr-MBG and 5Sr-MBG samples that were detected at 24 and 72 h, respectively. This fact probably occurs due to the replacement of the Ca^{2+} ions in the silica network by Sr^{2+} ions, which do not form apatite nucleation canters, slowing down the formation of the n-CHA layer in the surface of the samples.

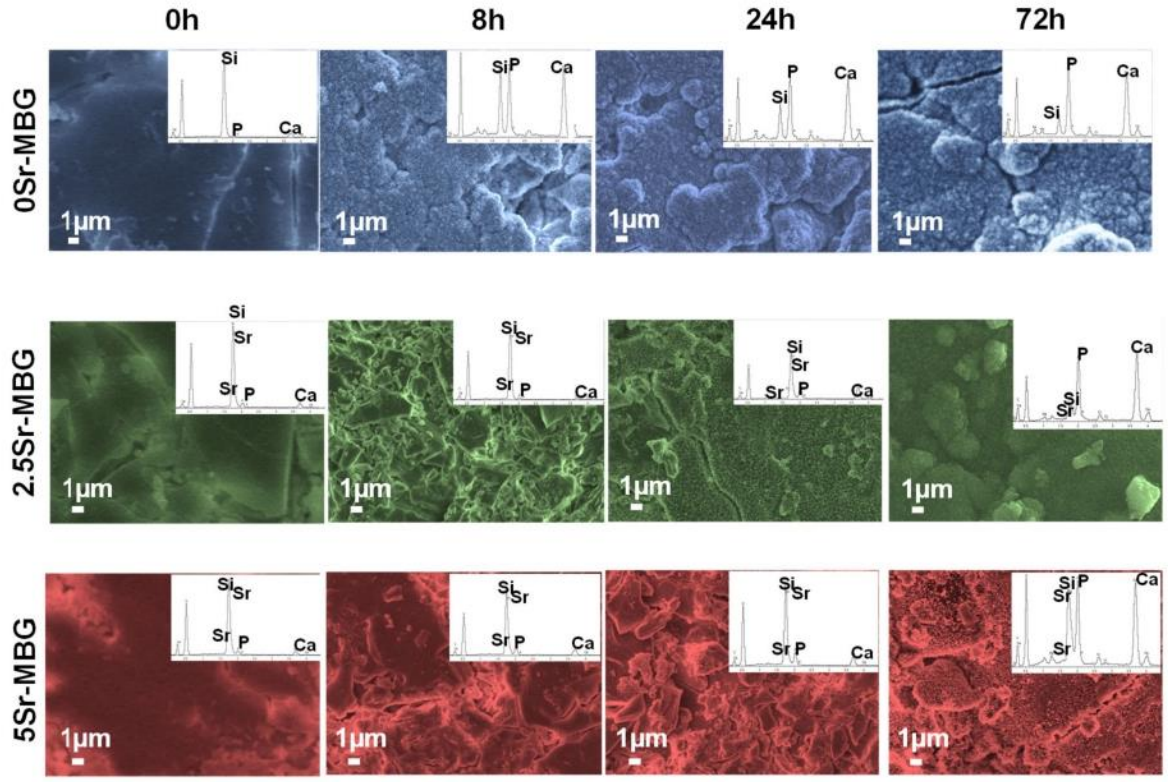


Figure 5. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs and EDS spectra of different MBG disks soaked in SBF between 0 and 72 h, and their corresponding EDS spectra.

Therefore, we can conclude that strontium retards but does not inhibit the formation of the n-CHA layer in SBF, the in vitro acellular test usually employed to characterize a bioactive response.

Since the ions concentration around the implanted material is critical for its adequate integration and to exert desired biological actions, the cumulative release of calcium, phosphorous and strontium ions after soaking the MBGs for 1, 3 and 7 d in MEM was studied (Figure 6). The three samples released similar amounts of Ca^{2+} ion that increased with the amount of strontium. This fact can be attributed to their more amorphous structure observed by NMR (Figure 3) and, consequently, higher reactivity, i.e., higher solubility. A similar tendency should be expected for the leaching of the phosphorous ions. However, the low values detected for these ions seem to contradict this increasing reactivity. The formation of strontium silicates or phosphate salts in 5Sr-MBG, as reported by Kaur et al. [49], could explain the apparent contradiction between the high values of Ca and the low values of P despite the more "open" structure, as a result of the strontium presence in the samples. Finally, 5Sr-MBG

samples released Sr^{2+} ions two-fold higher than 2.5Sr-MBG samples, as expected, up to 156 mg /L; sufficient quantities to exert biological activity but within the values that do not cause toxicity, since these quantities can be metabolized and expelled through the urine [50].

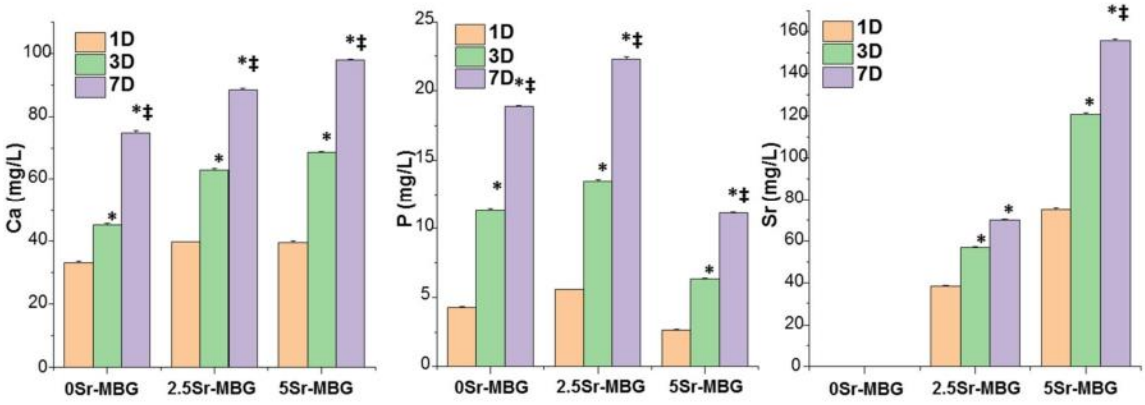


Figure 6. Cumulative release of (**A**) calcium, (**B**) phosphorous and (**C**) strontium, with the content of 0, 2.5, 5Sr-MBG disks, respectively, between 1 and 7 d in a complete medium. * Comparisons between each 0Sr-MBG and Sr-MBGs, ‡ comparisons between 2.5Sr-MBG and 5Sr-MBG. Statistical significance: *‡ $p < 0.05$.

3.3. MBG Scaffolds Characterization

The design and fabrication of meso-macroporous Sr-MBG/PVA scaffolds, with a 3D printed PLA negative template and an external mould, using a low temperature extraction method, were carried out with a modified method previously reported [40,51]. Briefly, 3D printing is a computer-controlled fabrication technique that uses fused filament fabrication for generating 3D objects by shaping successive cross-sectional laminae, one on top of other parts by deposition of molten PLA material. The optimized PVA/MBG paste was introduced into the PLA structure and freeze-dried to maintain their macroporosity inside PVA/MBG composite; finally, PLA negative template was removed by solution in dichloromethane avoiding any calcination and sintering process. This process leads to obtaining meso-macroporous scaffolds 0, 2.5 and 5Sr-MBG with a weight ratio of 77 ± 2/23 ± 2% of MBG/PVA respectively.

SEM micrographs of the MBG scaffolds with their respective EDS spectra are shown in Figure 7; a homogeneous integration of the MBG particles within the PVA polymeric matrix, both at the surface and within the bulk, was observed in the three MBG scaffolds. The sizes of the channels formed by the PLA negative template elimination are determined to be around 0.5 mm in diameter. Besides, an intergranular macroporosity (<10 μm) obtained by water removal by freeze-drying can be observed. This bimodal pore distribution (macropores and giant channels) is suitable for a rapid vascularization and osteoconduction essential for bone remodeling. The EDS spectra depicted below confirmed the homogeneous incorporation of strontium, deduced from the 10 analyses effectuated on each sample, confirming an increasing Sr doping into the MBG structure (Table 2).

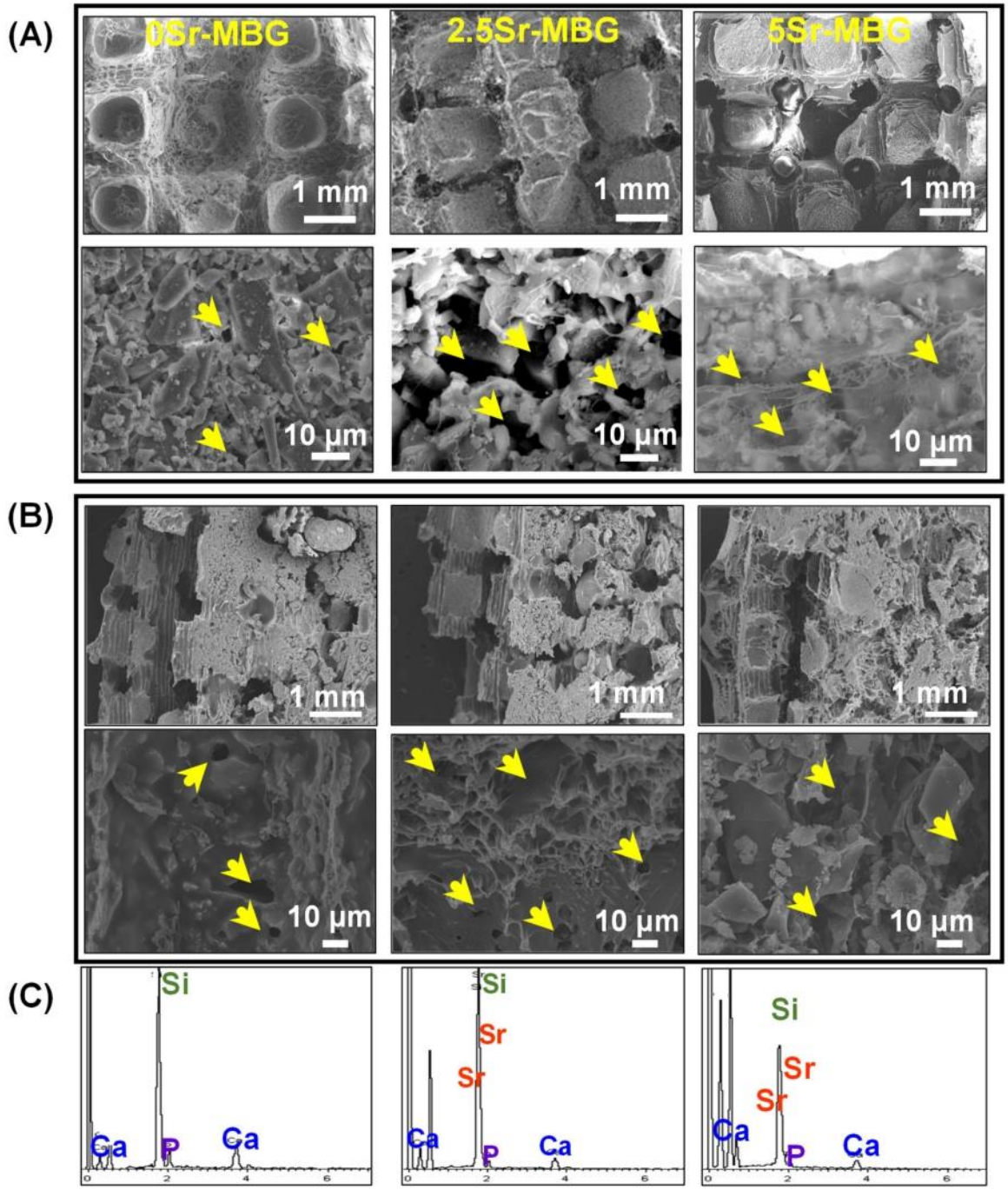


Figure 7. SEM images of (**A**) surface and (**B**) fracture of 0Sr-MBG, 2.5Sr-MBG and 5Sr-MBG scaffolds. Arrows indicate the macroporosity lower than 10 µm. (**C**) The corresponding EDS of MBG scaffolds spectra are shown.

3.4. Cytocompatibility Assays on MBG Scaffolds

Once the samples were characterized from the microstructural point of view, cytocompatibility tests were performed to study the capacity of these MBG materials to stimulate MC3T3-E1 proliferation and the expression of early markers of osteoblastic differentiation onto MBG scaffolds. This pre-osteoblastic cell line was, as well, used to evaluate the scaffolds toxicity.

3D confocal microscopy tests were carried out on the 2.5Sr-MBG scaffolds after 24 h of MC3T3-E1 seeding (Figure 8A). The geometrical center of each cylindrical scaffold was scanned to determine the

cell morphology. Atto 565-phalloidin was used as the fluorescence probe of F-actin microfilaments and DAPI fluorostaining for nuclei was used. Actin is the most important interconnected filament protein in the cytoskeleton, performing critical cell functions. Representative images of preosteoblasts attached onto 2.5Sr-MBG scaffolds, showing their typical spindle-shaped morphology [52]; they were adequately spread on the scaffold surface, indicating their cytocompatibility as observed in the figure.

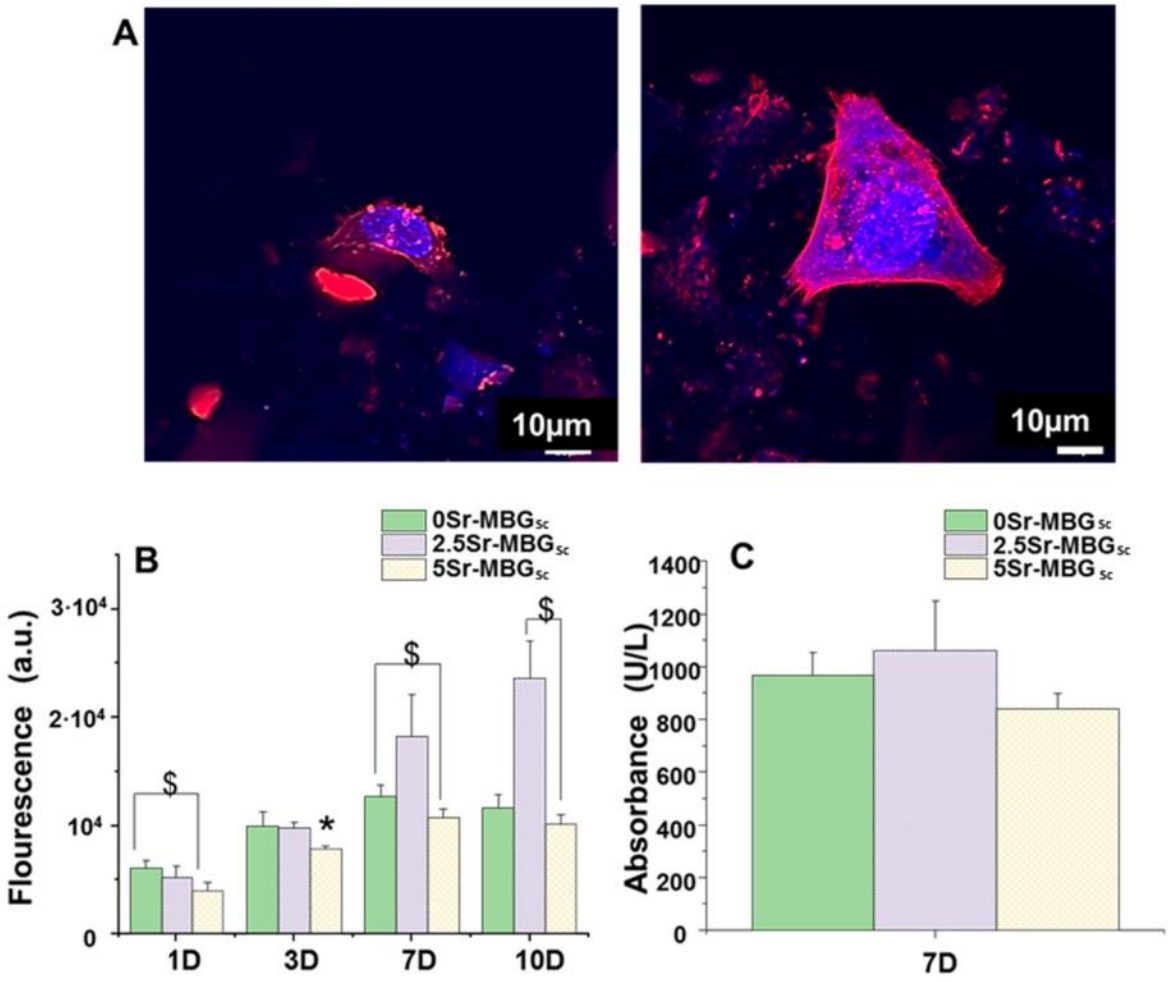


Figure 8. (**A**) MC3T3-E1 cells cultured inside the 2.5Sr-MBG scaffold after 24 h were observed with confocal microscopy. Atto 565–phalloidin staining the F-actin microfilaments was used to visualize the cell cytoskeleton (red) and DAPI cell nuclei (blue). (**B**) Proliferation of MC3T3-E1 cells as a function of culture time on the different MBGs scaffolds at 1, 3, 7 and 10 d. (**C**) Lactate dehydrogenase (LDH) of MC3T3-E1 cells in the presence of the MBG scaffolds after 7 d of cell culture. ($) Significant differences between designated samples ($p < 0.05$), and. (*) Significant differences are shown comparing the indicated sample with the others ($p < 0.05$).

The characterization of the influence of strontium on the cytocompatible behavior of the MBG scaffolds as well as on the proliferation and gene expression of early markers of osteoblastic differentiation is depicted in Figures 8 and 9. The proliferation assay performed for the MBG scaffolds shows a noticeable increment from 7 days in the 2.5Sr-MBG scaffolds, even exceeding the growth observed for cell control (Figure 8B). Regarding the LDH measurement (Figure 8C), the values obtained are not significantly different when compared to the control. Despite there being minor differences, the slightly higher values observed for 2.5Sr-MBG scaffolds were no significant. Therefore, we can conclude that none of the MBGs investigated were cytotoxic.

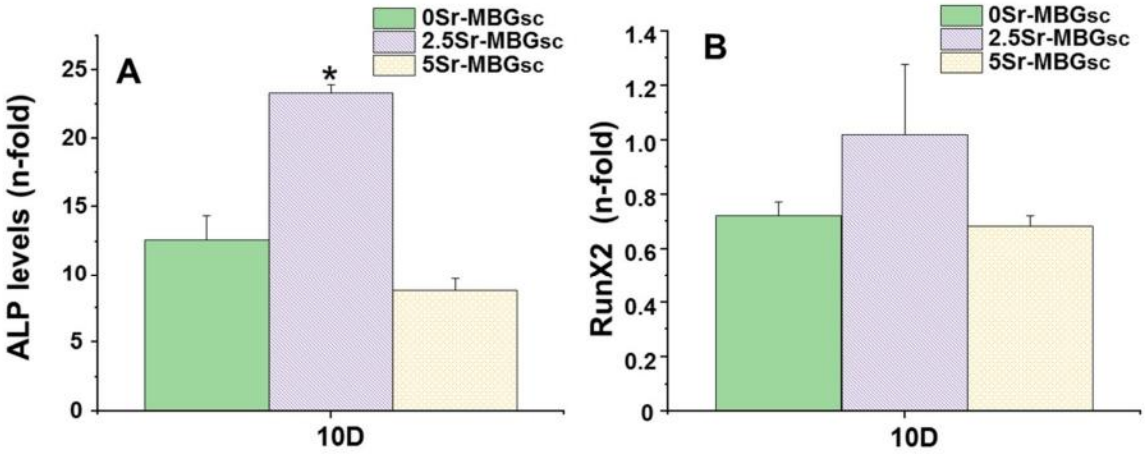


Figure 9. (**A**) ALP (**B**) RUNX2 mRNA levels in the presence of the different MBGs scaffolds at 10 d of cell culture. (*) Significant differences are shown comparing the indicated sample with the others ($p < 0.05$).

Figure 9A,B collect the gene expression characterization results of two markers involved in osteogenic of differentiation, measured by real-time PCR: ALP and RUNX2. 2.5Sr-MBG scaffolds did significantly increase the ALP gene expression markers; meanwhile, it can be observed that there is a slight decrease in the expression of the ALP gene for the 5Sr-MBG sample, but without being significant. Considering the results of ion release (Figure 6), it can be seen that the 2.5Sr-MBG disk sample releases a concentration close to 70 mg /mL after 7 d, while the 5Sr-MBG disk sample release is more than double that concentration. Although these samples, when forming scaffolds, will release a slightly lower amount than that obtained with the disks, we can approximate the optimal concentration range for proliferation, as we can deduce it from scaffold proliferation tests. Taking into account this point and the optimal therapeutic concentrations studied in the literature of around 30 mg /L [22], we can deduce that the optimal concentration is between 30 and 60 mg /L for this cell line. This may be the reason why cells have proliferated with the 2.5Sr-MBG scaffold sample almost twice as much as with the 5Sr-MBG scaffold sample, and we see the same difference in ALP gene expression for the same samples.

On the other hand, none of the materials studied significantly alters the gene expression of RUNX2, an early marker of osteoblastic differentiation ($p < 0.05$).

In 2010, Gentleman et al. [53] reported the putative benefits of strontium-substituted bioglasses. These materials stimulated an increase in the osteoblasts metabolism and inhibited osteoclast differentiation and resorption via the release of these ions, but also promoted osteoblast proliferation and ALP activity through a direct contact with the cells. For other bioceramics, such as calcium phosphate silicates, [54] it was observed that ALP osteogenic differentiation of rBMSCs increased after 7 d. An increase was also observed for RUNX2, after 4 d in strontium-substituted calcium phosphate silicate compared with calcium phosphate silicate, although with higher amounts of strontium than in our Sr-enriched MBGs. Moreover, Liu et al. [55] demonstrated that the expression levels of the osteogenic-related genes of bone marrow stromal cells (BMSCs) for the 3D printed poly(ε-caprolactone)/SrHA scaffolds were up-regulated compared to that of 3D printed poly(ε-caprolactone)/HA scaffold up to 14 d. Finally, Zhang et al. [22] showed that the osteogenic-related gene expression—RUNX2, osteocalcin (OCN) and bone sialoprotein (BSP) mRNA expression—of MC3T3-E1 cells onto Sr-substituted MBG scaffolds promoted osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells after 7 and 14 d. Recently, Kaur et al. [49] synthesized sol-gel SiO_2–CaO–MgO–P_2O_5 glasses doped with up to 5 mol.% SrO with no significant differences of proliferation, attachment and metabolic activity of osteosarcoma cells. This was attributed to the higher surface in Sr-containing samples that was fourfold lower than the MBGs investigated in the present paper. Compared with these materials, our Sr-doped MBGs exhibited a higher proliferation and early markers of osteoblastic differentiation

with lower strontium content. This effect could be attributed to a higher and faster release of Sr ions from the MBGs described in this work (75 mg /mL in 2.5Sr-MBG and 160 mg /mL in 5Sr-MBG) compared to others that reached ca. of 35 mg /mL for 20% of Sr-MBG substitution and 85 mg /mL for maximum SrO-substitution in bioglasses. This effective ion release can be explained considering that the strontium ions in the investigated MBG structures act as a network of modifiers and are readily bioavailable as rapid ions release to the local cell medium as it was indicated by the ICP and NMR studies.

Taking into account the in vitro results presented, we propose 2.5Sr-MBG scaffolds as the best candidate for future in vivo assays for osteoporosis diseases due to their promising result on pre-osteoblast proliferation and early markers of osteoblastic differentiation in direct contact with Sr-MBG scaffolds.

4. Conclusions

The three MBG powders investigated, containing 0, 2.5, and 5 mol.% of SrO, exhibited good mesopores order and high textural properties, only slightly impaired by the SrO inclusions. Moreover, MBGs exhibited in vitro bioactivity because they were coated by an apatite-like layer after 8 h (0Sr-MBG), 24 h (2.5Sr-MBG) and 72 h (5Sr-MBG) in SBF. Moreover, they underwent a progressive dissolution when soaked in MEM. Sr-containing MBGs released amounts of strontium ions able to induce early markers of osteoblastic differentiation, without reaching toxic concentrations. These features confirmed the potential of the MBGs for the production of scaffolds for bone regeneration.

A low temperature method using a PLA negative mould which was removed by extraction, allowed obtaining scaffolds based on MBG/PVA composites exhibiting interconnected giant channels, pores of around tens of microns and mesopores. Moreover, investigated scaffolds showed cytocompatibility with pre-osteoblastic cells, especially those based on 2.5Sr-MBG, in which the cytocompatibility was favored by the inductive capacity of strontium ions on proliferation and ALP gene expression of the cells. Therefore, it is concluded that 2.5Sr-MBG/PVA scaffold is an excellent candidate to be further developed to be used for bone defect treatment in non-load bearing sites.

Author Contributions: Conceptualization, S.S.-S. and J.P.; Resources, A.J.S. and M.V.-R.; Data curation, A.L.-H. and J.J.-H.; Writing—review and editing, J.J.-H., S.S.-S., J.P. and A.J.S.; Visualization, A.L.-H. and S.S.-S.; Supervision, S.S.-S. and A.J.S.; Project administration, A.J.S. and M.V.-R.; Funding acquisition, S.S.-S., M.V.-R. and A.J.S.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by research grants from an Instituto de Salud Carlos III (PI15/00978) project co-financed with European Union FEDER funds and the European Research Council (ERC-2015-AdG), Advanced Grant Verdi-Proposal No.694160, and the Youth Employment initiative (YEI) from Comunidad de Madrid (PEJ-2017-2017-AI/SALl-5825).

Conflicts of Interest: We declare that (1) the article is original and unpublished and has not or is not being considered for publication elsewhere, (2) all authors have seen and approved the manuscript, and (3) the authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Pape, H.-C.; Evans, A.; Kobbe, P. Autologous Bone Graft: Properties and Techniques. *J. Orthop. Trauma* **2010**, *24*, S36–S40. [CrossRef] [PubMed]
2. Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P.V. Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Med.* **2011**, *9*, 66. [CrossRef] [PubMed]
3. Roberts, T.T.; Rosenbaum, A.J. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis* **2012**, *8*, 114–124. [CrossRef] [PubMed]
4. Laurencin, C.; Khan, Y.; El-Amin, S.F. Bone graft substitutes. *Expert Rev. Med. Devices* **2006**, *3*, 49–57. [CrossRef]
5. Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2874–2888. [CrossRef]

6. Salinas, A.J.; Esbrit, P.; Vallet-Regí, M. A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair. *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 40–51. [CrossRef]
7. Yan, X.; Yu, C.; Zhou, X.; Tang, J.; Zhao, D. Highly Ordered Mesoporous Bioactive Glasses with Superior In Vitro Bone-Forming Bioactivities. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5980–5984. [CrossRef]
8. Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. Mesoporous bioactive glasses: Relevance of their porous structure compared to that of classical bioglasses. *Biomed. Glas.* **2015**, *1*, 1. [CrossRef]
9. Hoppe, A.; Güldal, N.S.; Boccaccini, A.R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2757–2774. [CrossRef]
10. Zhu, Y.; Kaskel, S. Microporous and Mesoporous Materials Comparison of the in vitro bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses (MBGs) and bioactive glasses (BGs) scaffolds. *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *118*, 176–182. [CrossRef]
11. Wu, C.; Chang, J. Mesoporous bioactive glasses: Structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. *Interface Focus* **2012**, *2*, 292–306. [CrossRef] [PubMed]
12. Zhang, Y.; Luan, J.; Jiang, S.; Zhou, X.; Li, M. The effect of amino-functionalized mesoporous bioactive glass on MC3T3-E1 cells in vitro stimulation. *Compos. Part B Eng.* **2019**, *172*, 397–405. [CrossRef]
13. Colilla, M.; Martínez-Carmona, M.; Sánchez-Salcedo, S.; Ruiz-González, M.L.; González-Calbet, J.M.; Vallet-Regí, M. A novel zwitterionic bioceramic with dual antibacterial capability. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 5639–5651. [CrossRef]
14. Borkow, G.; Gabbay, J. Copper as a Biocidal Tool. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2163–2175. [CrossRef] [PubMed]
15. Romero-Sánchez, L.B.; Marí-Beffa, M.; Carrillo, P.; Medina, M.A.; Díaz-Cuenca, A. Copper-containing mesoporous bioactive glass promotes angiogenesis in an in vivo zebrafish model. *Acta Biomater.* **2018**, *68*, 272–285. [CrossRef]
16. Shruti, S.; Salinas, A.J.; Lusvardi, G.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Vallet-Regi, M. Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium- and zinc-containing glasses. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 4836–4844. [CrossRef] [PubMed]
17. Xu, Z.; Chen, X.; Tan, R.; She, Z.; Chen, Z.-H.; Xia, Z. Preparation and characterization of a gallium-loaded antimicrobial artificial dermal scaffold. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *105*, 110063. [CrossRef]
18. Mnatsakanyan, H.; Serra, R.S.I.; Salmeron-Sanchez, M.; Rico, P. Zinc Maintains Embryonic Stem Cell Pluripotency and Multilineage Differentiation Potential via AKT Activation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 180. [CrossRef]
19. Heras, C.; Sanchez-Salcedo, S.; Lozano, D.; Peña, J.; Esbrit, P.; Vallet-Regi, M.; Salinas, A. Osteostatin potentiates the bioactivity of mesoporous glass scaffolds containing Zn2+ ions in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* **2019**, *89*, 359–371. [CrossRef]
20. Gargiulo, N.; Cusano, A.M.; Causa, F.; Caputo, D.; Netti, P.A. Silver-containing mesoporous bioactive glass with improved antibacterial properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 2129–2135. [CrossRef]
21. Wu, C.; Zhou, Y.; Lin, C.; Chang, J.; Xiao, Y. Strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with improved osteogenic / cementogenic differentiation of periodontal ligament cells for periodontal tissue engineering. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 3805–3815. [CrossRef] [PubMed]
22. Zhang, J.; Zhao, S.; Zhu, Y.-F.; Huang, Y.; Zhu, M.; Tao, C.; Zhang, C.-Q. Three-dimensional printing of strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2269–2281. [CrossRef] [PubMed]
23. Yang, F.; Yang, D.; Tu, J.; Zheng, Q.; Cai, L.; Wang, L. Strontium Enhances Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Bone Formation by Activating Wnt/Catenin Signaling. *Stem Cells* **2011**, *29*, 981–991. [CrossRef] [PubMed]
24. Peng, S.; Zhou, G.; Luk, K.D.K.; Cheung, K.M.C.; Li, Z.; Lam, W.M.; Zhou, Z.; Lu, W.W. Strontium Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through the Ras/MAPK Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **2009**, *23*, 165–174. [CrossRef] [PubMed]
25. Chattopadhyay, N.; Quinn, S.J.; Kifor, O.; Ye, C.; Brown, E.M. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 438–447. [CrossRef] [PubMed]
26. Peng, S.; Liu, X.S.; Huang, S.; Li, Z.; Pan, H.; Zhen, W.; Luk, K.; Guo, X.E.; Lu, W.W. The cross-talk between osteoclasts and osteoblasts in response to strontium treatment: Involvement of osteoprotegerin. *Bone* **2011**, *49*, 1290–1298. [CrossRef] [PubMed]

27. Bonnelye, E.; Chabadel, A.; Saltel, F.; Jurdic, P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone* **2008**, *42*, 129–138. [CrossRef] [PubMed]
28. Hurtel-Lemaire, A.S.; Mentaverri, R.; Caudrillier, A.; Cournarie, F.; Wattel, A.; Kamel, S.; Terwilliger, E.F.; Brown, E.M.; Brazier, M. The calcium-sensing receptor is involved in Strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis new insights into the associated signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 575–584. [CrossRef] [PubMed]
29. Zhu, Y.; Fu, S.; Zhu, Y. 3D printing of ceramic-based scaffolds for bone tissue engineering: An overview. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 4397–4412. [CrossRef]
30. Aslam, M.; Kalyar, M.A.; Raza, Z.A. Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites. *Polym. Eng. Sci.* **2018**, *58*, 2119–2132. [CrossRef]
31. Padilla, S.; Sánchez-Salcedo, S.; Vallet-Regí, M. Bioactive glass as precursor of designed-architecture scaffolds for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2007**, *81*, 224–232. [CrossRef] [PubMed]
32. Fiocco, L.; Michielsen, B.; Bernardo, E. Silica-bonded apatite scaffolds from calcite-filled preceramic polymers. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2016**, *36*, 3211–3218. [CrossRef]
33. Cicuéndez, M.; Portolés, M.; Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. New Nanocomposite System with Nanocrystalline Apatite Embedded into Mesoporous Bioactive Glass. *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 1100–1106. [CrossRef]
34. Jiménez-Holguín, J.; Sánchez-Salcedo, S.; Vallet-Regí, M.; Salinas, A. Development and evaluation of copper-containing mesoporous bioactive glasses for bone defects therapy. *Microporous Mesoporous Mater.* **2020**, *308*, 110454. [CrossRef] [PubMed]
35. Brunauer, S.; Emmett, P.H.; Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309–319. [CrossRef]
36. Barrett, E.P.; Joyner, L.G.; Halenda, P.P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373–380. [CrossRef]
37. Salinas, A.; Vallet-Regí, M. Glasses in bone regeneration: A multiscale issue. *J. Non Cryst. Solids* **2016**, *432*, 9–14. [CrossRef]
38. Serra, J.; González, P.; Liste, S.; Chiussi, S.; León, B.; Pérez-Amor, M.; Ylänen, H.O.; Hupa, M. Influence of the non-bridging oxygen groups on the bioactivity of silicate glasses. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2002**, *13*, 1221–1225. [CrossRef]
39. Izquierdo-Barba, I.; Salinas, A.J.; Vallet-Regí, M. In vitro calcium phosphate layer formation on sol-gel glasses of the CaO-SiO2 system. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *47*, 243–250. [CrossRef]
40. Wu, C.; Luo, Y.; Cuniberti, G.; Xiao, Y.; Gelinsky, M. Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2644–2650. [CrossRef]
41. Gudeman, L.F.; Peppas, N.A. pH-sensitive membranes from poly(vinylalcohol) /poly(acrylic acid) interpenetrating networks. *J. Memb. Sci.* **1995**, *107*, 239–248. [CrossRef]
42. López-Noriega, A.; Arcos, D.; Izquierdo-Barba, I.; Sakamoto, Y.; Terasaki, O.; Vallet-Regí, M. Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 3137–3144. [CrossRef]
43. García, A.; Cicuéndez, M.; Izquierdo-Barba, I.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Essential Role of Calcium Phosphate Heterogeneities in 2D-Hexagonal and 3D-Cubic SiO2−CaO−P2O5Mesoporous Bioactive Glasses. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 5474–5484. [CrossRef]
44. Alothman, Z.A. A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials. *Materials* **2012**, *5*, 2874–2902. [CrossRef]
45. Hott, M.; Deloffre, P.; Tsouderos, Y.; Marie, P.J. S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats. *Bone* **2003**, *33*, 115–123. [CrossRef]
46. Leonova, E.; Izquierdo-Barba, I.; Arcos, D.; López-Noriega, A.; Hedin, N.; Vallet-Regí, M.; Edén, M. Multinuclear Solid-State NMR Studies of Ordered Mesoporous Bioactive Glasses. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 5552–5562. [CrossRef]
47. Sánchez-Salcedo, S.; Shruti, S.; Salinas, A.J.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Vallet-Regí, M. In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO2-CaO-P2O5 meso-macroporous glass scaffolds enriched with ZnO. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 4836–4847. [CrossRef]

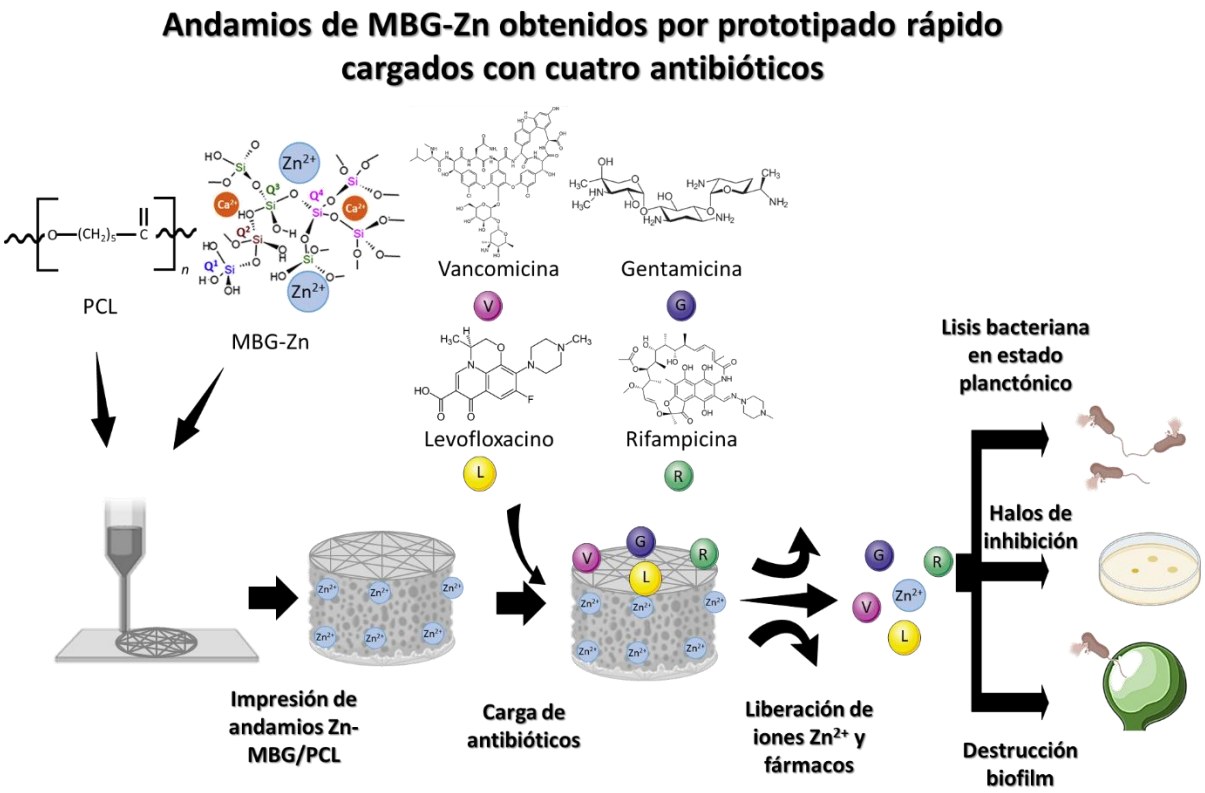
48. Shruti, S.; Salinas, A.; Ferrari, E.; Malavasi, G.; Lusvardi, G.; Doadrio, A.L.; Menabue, L.; Vallet-Regi, M. Curcumin release from cerium, gallium and zinc containing mesoporous bioactive glasses. *Microporous Mesoporous Mater.* **2013**, *180*, 92–101. [CrossRef]
49. Kaur, P.; Singh, K.; Kaur, S.; Kaur, S.; Singh, A.P. Sol-gel derived strontium-doped SiO2–CaO–MgO–P2O5 bioceramics for faster growth of bone like hydroxyapatite and their in vitro study for orthopedic applications. *Mater. Chem. Phys.* **2020**, *245*, 122763. [CrossRef]
50. Zhang, Y.; Wei, L.; Chang, J.; Miron, R.J.; Shi, B.; Yi, S.; Wu, C. Strontium-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds stimulating in vitro proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells and in vivo regeneration of osteoporotic bone defects. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 5711–5722. [CrossRef]
51. Gómez-Cerezo, M.N.; Lozano, D.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M.; Vaquette, C. The effect of biomimetic mineralization of 3D-printed mesoporous bioglass scaffolds on physical properties and in vitro osteogenicity. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *109*, 110572. [CrossRef] [PubMed]
52. Lavenus, S.; Pilet, P.; Guicheux, J.; Weiss, P.; Louarn, G.; Layrolle, P. Behaviour of mesenchymal stem cells, fibroblasts and osteoblasts on smooth surfaces. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1525–1534. [CrossRef] [PubMed]
53. Gentleman, E.; Fredholm, Y.C.; Jell, G.; Lotfibakhshaiesh, N.; O'Donnell, M.B.; Hill, R.G.; Stevens, M.M. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials* **2010**, *31*, 3949–3956. [CrossRef] [PubMed]
54. Geng, Z.; Ji, L.; Li, Z.; Wang, J.; He, H.; Cui, Z.; Yang, X.; Liu, C. Nano-needle strontium-substituted apatite coating enhances osteoporotic osseointegration through promoting osteogenesis and inhibiting osteoclastogenesis. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 905–915. [CrossRef] [PubMed]
55. Liu, D.; Nie, W.; Li, D.; Wang, W.; Zheng, L.; Zhang, J.; Zhang, J.; Peng, C.; Mo, X.; He, C. 3D printed PCL/SrHA scaffold for enhanced bone regeneration. *Chem. Eng. J.* **2019**, *362*, 269–279. [CrossRef]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

III.1.2 Multifunctional antibiotic- and Zn-containing MBG scaffolds to fight bone infection

III.1.2.1 Introducción



Esquema 2. Resumen gráfico del trabajo "Multifunctional antibiotic- and Zn-containing MBG scaffolds to fight bone infection". Policaprolactona (PCL), Vancomicina (V), Gentamicina (G), Levofloxacino (L), Rifampicina (R), vidrio mesoporoso bioactivo (MBG).

Aunque la osteomielitis se considera una enfermedad de baja incidencia [393,394], cada paciente supone una carga económica de más de 59.600 $ [139]. Este coste, se incrementa en los pacientes afectados por cepas resistentes a fármacos, o aquellos en los que el defecto óseo formado es tan grande que necesitan un implante para recuperar la funcionalidad del tejido dañado.

El abordaje estándar consiste en tratar al paciente con una mezcla de antibióticos a una elevada concentración con el objetivo de que se alcance la MIC en la región afectada del hueso. Sin embargo, esta estrategia contribuye al desarrollo de resistencias a fármacos [395] y al desarrollo de efectos secundarios [263]. El enfoque que recientemente se está abordando, consiste en el desarrollo de biomateriales que promuevan la regeneración del tejido óseo y sirvan como plataformas de liberación de fármacos que superen los mecanismos de evasión bacteriana [396].

En este contexto, Heras *et al* [240,397], desarrollaron vidrios bioactivos del sistema SiO_2–P_2O_5–CaO enriquecido con ZnO, ya que se ha descrito el potencial del zinc como promotor de la osteogénesis [314] [315], regulador de la respuesta inmune [318,319] y su capacidad de reducir significativamente la viabilidad bacteriana [322]. En este trabajo se observó que la composición enriquecida con 4% mol de ZnO (4ZN) mostró orden mesoporoso y valores óptimos de superficie específica, volumen y

diámetro de poro, ligeramente menores a la composición sin enriquecer con zinc. Resultados de RMN ^{29}Si revelaron la participación de los iones Zn^{2+} como formador de red al formar tetraedros de ZnO_4 exhibiendo carga negativa y atrayendo iones Ca^{2+} que actúan como compensadores de red, en lugar de modificadores de red. Esta fue una de las razones por las que se obtuvieron valores superiores de polimerización de la red respecto a la composición sin enriquecer con zinc.

Los ensayos *in vitro* mostraron la idoneidad de la composición 4ZN al revelar que la liberación de iones Zn^{2+}, Ca^{2+} y P(V) se encontraban en el rango de citocompatibilidad y, además, estimulaba significativamente la diferenciación y proliferación de células pre-osteoblásticas MC3T3-E1, por encima de las composiciones con 0 y 5% ZnO. Sin embargo, la liberación de iones Zn^{2+} suponía un impedimento a la hora de formar fases de apatita en la superficie del material.

La obtención de andamios meso-macroporosos tridimensionales se llevó a cabo mediante robocasting, por medio de la elaboración de una pasta a base de MBG-Zn y PCL para facilitar la impresión. Seguidamente se eliminó la PCL mediante un proceso de calcinación y finalmente se recubrieron de gelatina entrecruzada con glutaraldehído (GE) para incrementar sus propiedades mecánicas. Estos andamios se caracterizaban por presentar canales romboidales de entre 700-100 µm y 1000-1500 µm, y poros de 400 µm y de entre 1-10 µm, además de los poros presentes propios del MBG. Finalmente, los ensayos *in vitro* con células pre-osteoblasticas mostraron la idoneidad de la composición 4ZN-GE frente a las composiciones BL-GE y 5ZN-GE, al aumentar significativamente la colonización celular, estimular significativamente la proliferación, así como la expresión de marcadores tempranos de diferenciación celular.

El objetivo de este trabajo consiste en evaluar la capacidad de dichos andamios para adsorber y liberar los antibióticos vancomicina (V), gentamicina (G), rifampicina (R) y levofloxacino (L) en concentraciones bactericidas, así como evaluar la actividad bactericida sinérgica obtenida del efecto de los iones Zn^{2+} y los antibióticos.

III.1.2.2 Resumen

En este trabajo se desarrollaron dos composiciones de MBG basados en el sistema SiO_2–$5P_2O_2$–CaO, con y sin óxido de Zn integrado (4% mol) (**Tabla 6**). Estos materiales se sintetizaron por el método EISA [202] y se conformaron en andamios utilizando PCL y GE como se describe por Heras. et al [240]. Los estudios presentes en este trabajo abarcan ensayos *in vitro* en medio de cultivo bacteriano, así como los estudios microbiológicos en los que se evalúa la capacidad bactericida del sistema antes y después de cargar antibióticos a dos concentraciones para cada antibiótico: concentración saturada y a concentraciones MIC frente a cepas modelo de Gram +, *S. aureus* y Gram -, *E. coli*.

Tabla 6. Nomenclatura y composición (% mol) de los andamios tridimensionales de MBG para el tratamiento de infecciones bacterianas.

Nomenclatura	Composición (% mol)	Recubrimiento con gelatina entrecruzada con GA	Fármaco cargado
BL	$80SiO_2$–$5P_2O_5$–15CaO	-	Sin fármacos
4ZN	$82{,}2SiO_2$–$3{,}3\ P_2O_5$–10,3CaO–**4,2ZnO**	-	Sin fármacos
BL-GE	$80SiO_2$–$5P_2O_5$–15CaO	+	Levofloxacino (LEVO) Vancomicina (VANCO) Gentamicina (GENTA) Rifampicina (RIFAM)
4ZN-GE	$82{,}2SiO_2$–$3{,}3\ P_2O_5$–10,3CaO–**4,2ZnO**	+	Levofloxacino (LEVO) Vancomicina (VANCO) Gentamicina (GENTA) Rifampicina (RIFAM)

A fin de evaluar el potencial antibacteriano de los iones Zn^{2+} se analizó el perfil de liberación de iones desde los andamios BL-GE y 4ZN-GE en medio de cultivo de bacterias THB. La composición BL-GE liberó menor cantidad de iones Ca^{2+} en comparación con 4ZN-GE, probablemente debido a la precipitación de Ca^{2+} para la formación de una fase de apatita en su superficie, mientras que la composición 4ZN-GE al no ser tan reactiva los iones Ca^{2+} se liberaron al medio. En cuanto a la liberación de P al medio, ambas muestras liberaron cantidades de fósforo semejantes sin llegar a ser significativa su diferencia. Respecto a la liberación de Zn^{2+}, el andamio 4ZN-GE liberó Zn^{2+} a un ratio de 1.5 ppm día durante las primeras 48 h para más tarde descender su ratio.

Se evaluó la capacidad de los andamios BL-GE y 4ZN-GE de adsorber fármacos (LEVO, VANCO, GENTA y RIFAM) mediante TG/ DTA y adsorción de N_2. Los resultados obtenidos por TG/DTA demostraron que ambas composiciones cargaban la misma cantidad de cada uno de los fármacos. El análisis por N_2 reveló que ambas composiciones cargadas con cada uno de los fármacos presentaban isotermas tipo IV, características de MBG y ciclos de histéresis H1, propias de poros cilíndricos. Se observaron como las propiedades texturales de ambos andamios sufrieron un ligero descenso como consecuencia de la carga de los poros con los fármacos.

Con el objetivo de estudiar la interacción entre los fármacos y la matriz de los MBG de los andamios 4ZN-GE, se realizó un análisis molecular de sus interacciones. El análisis mostró la naturaleza zwitteriónica de los antibióticos LEVO y RIFAM, mientras que VANCO y GENTA presentan carga positiva. Dado que los MBG están densamente poblados por grupos silanoles con carga negativa, el análisis predijo la presencia de 6 enlaces de hidrógeno entre la matriz y la VANCO y 4 junto con la GENTA, mientras que para la RIFAM y VANCO se predijeron 2 y 0 enlaces respectivamente. Aunque la VANCO presenta 6 posibles enlaces de hidrógeno con la superficie de los andamios 4ZN-GE, el tamaño de la molécula impide que una gran cantidad del fármaco pueda adsorberse. Por otro lado, ocurre el caso contrario con LEVO, pues su tamaño reducido permite que los andamios adsorban grandes cantidades de este fármaco, aunque no se produzcan interacciones entre ambos.

Se llevó a cabo un ensayo de liberación de fármacos desde los andamios BL-GE y 4ZN-GE a pH 7.4, en la que no se obtuvo diferencias significativas entre la liberación de ambos andamios para el mismo fármaco. La cinética de liberación del levofloxacino siguió una liberación de orden 0, mientras que los demás fármacos, siguieron el modelo de liberación de primer orden de Noyes-Whitney. Los antibióticos GENTA y VANCO, se liberaron desde los andamios 4ZN-GE, de una forma más abrupta, mientras que RIFAM y LEVO experimentaron una liberación más pausada en el tiempo.

Los ensayos *in vitro* de formación de halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* se llevaron a cabo a partir de alícuotas extraídas de la liberación obtenida de la composición 4ZN-GE a pH 6,5 y 7,4. Se formaron halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* durante 18, 9 y 5 días con los andamios 4ZN-GE cargados de LEVO, RIFAM y VANCO respectivamente. Por otro lado, la inhibición en el crecimiento de *E. coli* se obtuvo durante 18 y 3 días con LEVO y GENTA. No se obtuvieron diferencias significativas entre los halos obtenidos por el mismo fármaco a distinto pH.

Los ensayos microbiológicos indicaron que todos los andamios cargados a concentraciones saturadas para cada uno de los fármacos daban lugar a una inhibición total en ambas especies bacterianas en estado planctónico. No obstante, los andamios cargados con antibióticos a la concentración MIC de cada uno de ellos, mostró un efecto sinérgico entre el efecto antibacteriano de los iones zinc y LEVO y VANCO frente a *S. aureus*, y LEVO y GENTA frente a *E. coli*.

Finalmente se llevó a cabo un ensayo de desestructuración de biofilms preformados por ambas especies bacterianas. Los andamios 4ZN-GE-R, 4ZN-GE-V y 4ZN-GE-L dieron lugar a una destrucción completa del biofilm de *S. aureus*, mientras que las composiciones 4ZN-GE-G y 4ZN-GE-L destruyeron completamente los biofilm de *E. coli*.

Estos resultados ponen de manifiesto que la eficacia de los antibióticos a una concentración MIC para cada uno de ellos, junto con la liberación de los iones zinc logran reducir drásticamente el crecimiento bacteriano tanto en estado planctónico como en forma de biofilm preformado de ambas especies bacterianas. Además, los resultados mostraron que este abordaje reduce la cantidad necesaria de antibiótico a emplear de forma que se reduce el riesgo de sufrir efectos secundarios ocasionados por el tratamiento con antibióticos y consolidan este sistema como una propuesta prometedora el desarrollo de nuevos implantes óseos.

Acta Biomaterialia 114 (2020) 395–406

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Biomaterialia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actbio

Full length article

Multifunctional antibiotic- and zinc-containing mesoporous bioactive glass scaffolds to fight bone infection

C. Heras[a], J. Jiménez-Holguín[a], A.L. Doadrio[a,b], M. Vallet-Regí[a,b], S. Sánchez-Salcedo[a,b,*], A.J. Salinas[a,b,*]

[a] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, UCM, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, i+12, 28040 Madrid, Spain
[b] Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 April 2020
Revised 18 June 2020
Accepted 21 July 2020
Available online 24 July 2020

Keywords:
Mesoporous bioactive glasses
ZnO
Bone infection
Staphylococcus aureus
Escherichia coli

ABSTRACT

Bone regeneration is a clinical challenge which requires multiple approaches. Sometimes, it also includes the development of osteogenic and antibacterial biomaterials to treat the emergence of possible infection processes arising from surgery. This study evaluates the antibacterial properties of gelatin-coated meso-macroporous scaffolds based on the bioactive glass 80%SiO_2–15%CaO–5%P_2O_5 (mol-%) before (BL-GE) and after being doped with 4% of ZnO (4ZN-GE) and loaded with both saturated and the minimal inhibitory concentrations of one of the antibiotics: levofloxacin (LEVO), vancomycin (VANCO), rifampicin (RIFAM) or gentamicin (GENTA). After physical-chemical characterization of materials, release studies of inorganic ions and antibiotics from the scaffolds were carried out. Moreover, molecular modelling allowed determining the electrostatic potential density maps and the hydrogen bonds of antibiotics and the glass matrix. Antibacterial *in vitro* studies (in planktonic, inhibition halos and biofilm destruction) with *S. aureus* and *E. coli* as bacteria models showed a synergistic effect of zinc ions and antibiotics. The effect was especially noticeable in planktonic cultures of *S. aureus* with 4ZN-GE scaffolds loaded with VANCO, LEVO or RIFAM and in *E. coli* cultures with LEVO or GENTA. Moreover, *S. aureus* biofilms were completely destroyed by 4ZN-GE scaffolds loaded with VANCO, LEVO or RIFAM and the *E. coli* biofilm total destruction was accomplished with 4ZN-GE scaffolds loaded with GENTA or LEVO. This approach could be an important step in the fight against microbial resistance and provide needed options for bone infection treatment.

Statement of Significance

Antibacterial capabilities of scaffolds based on mesoporous bioactive glasses before and after adding a 4% ZnO and loading with saturated and minimal inhibitory concentrations of levofloxacin, vancomycin, gentamicin or rifampicin were evaluated. Staphylococcus *aureus* and *Escherichia coli* were the infection model strains for the performed assays of inhibition zone, planktonic growth and biofilm. Good inhibition results and a synergistic effect of zinc ions released from scaffolds and antibiotics were observed. Thus, the amount of antibiotic required to inhibit the bacterial planktonic growth was substantially reduced with the ZnO inclusion in the scaffold. This study shows that the ZnO-MBG osteogenic scaffolds are multifunctional tools in bone tissue engineering because they are able to fight bacterial infections with lower antibiotic dosage.

© 2020 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author.
E-mail addresses: sansanch@ucm.es (S. Sánchez-Salcedo), salinas@ucm.es (A.J. Salinas).

https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.044
1742-7061/© 2020 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The emergence of infection processes is one of the most common and challenging complication during and after a surgical intervention [1,2]. Bone bacterial infection is a serious issue with important clinical and socio-economic implications. It is an inflammatory process which provokes osteolysis [3,4]. Post-operative implant infections are one of the most serious complications associated with bone diseases and fractures, treated with bone grafts and prostheses [5,6]. Bacteria of principal concern include *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* [5,7,8] Treatment usually involves surgery, antibiotic systemic administration and implant removal which has limitations and repercussions in patients live quality: additional surgical interventions, prolonged hospital stays, high side effects and higher mortality [9,10]. The appearance of bacterial infection derived from surgical procedures (332,000 total hip and 719,000 total knee arthroplasties performed in 2010, just in the United States) [11] represent a substantial problem. The numbers are projected to reach 572,000 and 3.48 million by 2030 for hips and knees, respectively [11]. In Europe, the situation is analogous, but larger number of patients undergoes primary hip arthroplasty than knee arthroplasty. Modelling data predicts the incidence of prosthetic joint infection will increase to greater than 6% by 2030 [11] owing to factors such as increased demand for surgery, the aging population, and the obesity epidemic [12–14]. Moreover, the number of people over 50 years suffering from bone related diseases, was envisaged to increase two-fold from 2012 to 2020 [15]. One of the principal reasons of the failure is the appearance of antibiotic-resistant strains [16,17] and the bacteria capability to develop a biofilm. Biofilms are groups of bacteria growing together which are able to produce an extracellular matrix accomplishing in a cooperative manner [16,17]. In a biofilm, bacteria grow protected from environmental stresses, develop antibiotic resistance, and skip the innate and adaptive immune system host strategies [18,19]. Being aware that oral and injection antibiotic administration involve several problems, higher antibiotic concentrations are required which is not a recommendable approach. Moreover, the administration of antibiotics below the minimal inhibitory concentration (MIC) leads to the development of antibiotic-resistant species. Therefore, the development and use of local strategies, including antibiotic release systems, able to eliminate or reduce the bacterial attachment, growth, and biofilm formation have attracted significant attention in bone tissue engineering [20].

With this purpose, the development of multifunctional 3D scaffolds based on Mesoporous Bioactive Glasses (MBGs) [21], doped with antibacterial ions [22] and loaded with low enough concentration of different antibiotics to avoid antibiotic resistance is a promising approach [23,24]. Moreover, MBGs present huge surface area and pore volume [25], which provides fast *in vitro* and *in vivo* responses, bone regenerative capability [26] and the possibility of being doped with different ions to add additional capabilities to the biomaterial [27, 28]. It has been demonstrated that the variation of intracellular ion concentration caused by the bioactive glass biodegradation, leads the activation of intracellular signalling pathways [27]. Mainly, zinc, copper, and silver ions, incorporated into the glass structure, allow the release of ions with antibacterial properties [29]. Moreover, they can influence gene expression mechanisms of osteoprogenitor cells, increasing bone regeneration [27]. Zinc ions are a good option for that purpose, due to their specific capacity to increase osteogenesis and their antimicrobial properties [30].

In a previous article, [31] we demonstrated the synergistic effect of Zn^{2+} ions and the osteogenic peptide osteostatin released from ZnO-MBG scaffolds, in the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. In the present paper we investigated the antibacterial effect of Zn^{2+} ions released from the aforementioned scaffolds in *S. aureus* and *E. coli* cultures, before and after load the scaffolds with one of the following antibiotics: levofloxacin (LEVO), vancomycin (VANCO), gentamicin (GENTA) or rifampicin (RIFAM).

With this purpose, two types of MBG scaffolds were synthesised, first one with composition 80%SiO_2–15%CaO–5%P_2O_5 (mol-%) (BL), and the second one, with analogous composition, included a 4% of ZnO (4ZN). After coating the scaffolds with gelatin (BL-GE and 4ZN-GE) they were loaded with LEVO, VANCO, GENTA or RIFAM (BL-GE-L/V/G/R and 4ZN-GE-L/V/G/R). BL and 4ZN scaffolds were tested in *S. aureus* and *E. coli* strains, as bone infection bacteria models, in three types of assays: inhibition zone, planktonic growth and biofilm. To understand the interactions between the antibiotics and the scaffolds, molecular modeling calculations were performed. The objective of this study is based on checking whether the antibacterial activity of Zn^{2+} ions, released from the scaffolds, allows the amount of antibiotic used to be reduced maintaining their antibacterial function.

2. Materials and methods

2.1. Reactants

Reactants were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) Inc. to perform the described experiment: tetraethyl orthosilicate (TEOS), triethyl phosphate (TEP), calcium nitrate tetrahydrate ($CaNO_3)_2{\cdot}4H_2O$), pluronic F123 ($EO_{20}PO_{70}EO_{20}$), ε-caprolactone (Mw = 58,000 Da) and hydrochloric acid (HCl, 37 %). All antibiotics (levofloxacin, vancomycin, gentamicin sulfate and rifampicin) were also from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Absolute ethanol (EtOH) was purchased from Panreac Quimica SLU (Castellar del Valles, Barcelona, Spain). All reagents were used as received without further purification. Ultrapure deionized water with resistivity of 18.2 MΩ was obtained using a Millipore Milli- Q plus system (Millipore S.A.S., Molsheim, France).

2.2. Fabrication of mesoporous bioactive glass scaffolds

The manufacturing process of the scaffolds began with the synthesis of two compositions of MBGs: 80%SiO_2–15%CaO–5%P_2O_5 (mol %), BL, and 82.2%SiO_2–10.3%CaO–3.3%P_2O_5–4.2%ZnO (mol %), 4ZN, by the Evaporation Induced Self Assembly (EISA) method. The MBGs obtained as powders were used to build the 3D meso-macroporous scaffolds by rapid prototyping as described by Heras et al. [31]. In short, powders were mixed with polycaprolactone (PCL) dissolved in dichloromethane to later evaporate the solvent until obtain a paste with the right rheological properties to print. As a result, 7 mm diameter 5 mm high scaffolds were obtained. Printed scaffolds were calcined to remove PCL and traces of solvent. Finally, scaffolds were coated with gelatin (GE) crosslinked with glutaraldehyde to increase their mechanical consistency and improve the diffusion of ions and antibiotics to the medium. Resultant scaffolds, used for the in vitro assays, were denoted as BL-GE and 4ZN-GE.

2.3. Meso-macroporous 3D scaffolds characterization

Scaffolds were characterized by: small angle X-ray diffraction (SA-XRD) in a X'pert-MPD system (Eindhoven, The Netherlands) equipped with Cu Kα radiation in the 0.6 to 8° 2θ range; transmission electron microscopy (TEM) in a JEM-2100 JEOL microscope (Tokyo, Japan) operating at 200 kV; Fourier transform infrared FTIR spectroscopy, in a Thermo Scientific Nicolet iS10 (Waltham, MA, USA) equipped with a SMART Golden Gate attenuated total reflection ATR accessory; and scanning electron microscopy (SEM) in a

JEOL JSM-6400 (Tokyo, Japan) operating at 20 kV. In addition, thermogravimetric analysis (TGA) in a Perkin Elmer Pyris Diamond system (Waltham, MA, USA) allowed to quantify the drug loading and Nitrogen adsorption measurements in a Micromeritics 3 Flex (Norcross, GA, USA), were performed before and after loading the scaffold with the antibiotics to verify the loading process.

2.4. In vitro antibiotic loading and release

After sterilization by UV irradiation for 60 min, scaffolds were loaded with two concentrations of each antibiotic: saturated concentration and the concentration required to reach the minimum inhibitory concentration (MIC), which is the one that inhibits by 50% the bacterial growth of each strain. The loading process was carried out by immersing scaffolds of 80 mg in a 3 mL solution of each antibiotic, in their specific solvent (water or ethanol) at the desired concentration. Immersed scaffolds were kept under stirring at 100 rpm for 24 h at room temperature. Then, scaffolds were vigorously washed and dried for 48 h at 37 °C. LEVO and RIFAM are light sensitive, so in these cases the entire process was done in dark conditions to avoid degradation.

Dry scaffolds were immersed in phosphate buffered saline (PBS) solution adjusted at physiological pH of 7.4. Pieces were kept at 37 °C in stirring conditions (100 rpm) up to 18 days. 500 µL aliquots were extracted each day to measure the antibiotic release by UV spectrophotometry. The whole antibiotic release procedure was also performed at pH 6.5, which corresponds with the acidic pH generated in an infection process. There were no significant differences between both pH and because of that release results at pH 6.5 are not shown.

2.5. Molecular modelling

A molecular model based on mesoporous MCM-41 silica doped with zinc, similar to mesoporous 4ZN glass, was generated by using Spartan'14 software (Wavefunction Inc.). The building unit in this model was the Si_6O_{12} pseudo–cell, consisting of hexagonal arrangements of Si–O–Si and Si–O–Zn units until reaching a model of 2 nm length and 4 nm diameter. The final structure was refined by geometry optimization using the MM+ force field. Docking calculations were carried out on the MCM-41 surface model by Hex 8.0 and CUDA 5.0 Nvidia GPU acceleration software with Polar fast Fourier transform (FFT) method and Shape+electro+DARS (decoys as reference state) correlation type with a cubic box of 10 nm and grid dimension of 0.6 nm. The correlation was only shape type. For electrostatic potential maps, coordinates of gentamicin 5+, zwitterionic rifampicin, zwitterionic levofloxacin and vancomycin 1+ were obtained from PubChem (U.S. National Library of Medicine) and treated by molecular dynamics simulations from Spartan'14 (Wavefunction, Inc.). The energy was optimized by AM1 Hamiltonian Method.

2.6. Ion release assay

For these assays, each scaffold was placed in a well of a transwell plate of 12 wells with 2 mL of Todd Hewitt Broth (THB) in each of them. They were kept at 37 °C with stirring (100 rpm) for 10 days. Each day, the 2 mL were extracted in full to measure in the culture medium the amount of Ca, P and Zn ions that had been released and another 2 mL of fresh THB were added to continue with the release study. Ion concentrations were determined by inductively coupled plasma/optical emission spectrometry (ICP/OES) using an OPTIMA 3300 DV device (Perkin Elmer). Each ion was determined in two different samples measured by triplicate.

2.7. Bacterial cultures

For these studies, Gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) and Gram-negative *Escherichia coli* (ATCC25922) were used as bacteria models.

2.7.1. Agar disk-diffusion tests of drug loaded materials

Zinc-doped scaffolds (4ZN-GE) and loaded with the saturated concentration of each antibiotic, were immersed in 2 mL at pH 7.4 and 6.5 and kept at 37 °C and stirring conditions (100 rpm). 7.4, was selected because corresponds to physiological one, and 6.5 because matches with generated in infection environment. Aliquots (20 µL) were extracted at several times to load foams placed later in contact with a pre-seeded (100 µL) of *S. aureus* or *E. coli* having 1.3×10^{10} bacteria/mL) agar plates. After 24 h of culture in static conditions at 37 °C, the inhibition zone was analysed. The bacterial inhibition zone size was measured as: (outer diameter of the inhibition zone - disk diameter)/2. Each study was performed in triplicate.

2.7.2. Planktonic growth inhibition test

Pre-loaded scaffolds, at saturated or minimal inhibitory concentration (MIC) of each antibiotic for each strain (*S. aureus* and *E. coli*), were placed in a 12 transwell plate. Then, 3 mL of bacteria dissolution (2×10^8 bacteria/mL) were added to put in contact bacteria culture with the zinc doped (4ZN-GE) or undoped (BL-GE) scaffold loaded with the different antibiotics. 24 h later, aliquots (20 µL) were extracted and seeded in agar plates. After 24 h of culture at 37 °C in static conditions, colony forming units (CFUs) were counted to know how the material, ions and antibiotic, affect the bacterial growth. Results of 4ZN-GE-antibiotic loaded scaffolds and BL-GE-antibiotic loaded scaffolds were compared. For the tests at saturated drug concentration, bacteria culture controls without material and controls with bacteria cultured with drug unloaded materials were carried out. For MIC tests, controls were carried out with bacteria cultures, growing in contact with the MIC of each drug for each strain, but without any material.

2.7.3. Biofilm degradation

1 mL of both strains (*S. aureus* and *E. coli*) was seeded (2×10^8 bacteria/mL) on a glass slide, kept at 37 °C and stirring conditions (100 rpm). During the first 24 h of culture, the medium (THB) was doped with 4% of sucrose. Then, it was replaced by a normal one. 24 h later, the biofilm was already formed. Pre-formed biofilms were placed in a 12 transwell plate were the different type of scaffolds were also located (BL-GE, 4ZN-GE and 4ZN-GE-Drug loaded scaffolds). After 24 h of culture at 37 °C and stirring conditions (100 rpm), the biofilm was extracted and stained with live and dead BacLigth bacteria viability kit (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™) and tested in a MC1025 confocal laser scanning microscope (Biorad). Alive bacteria were stained in green (SYTO 9), dead bacteria in red (propidium iodide, PI) and extracellular matrix in blue (calcofluor).

2.7.4. Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SEM (SEM: standard error of mean). Statistical evaluation was carried out with nonparametric Kruskal-Wallis test and post-hoc Dunn's test, when appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Meso-macroporous 3D scaffolds characterization

Structural powder characterization by SA-XRD in Fig. 1, revealed that gelatin containing scaffolds, exhibited maxima in the meso-

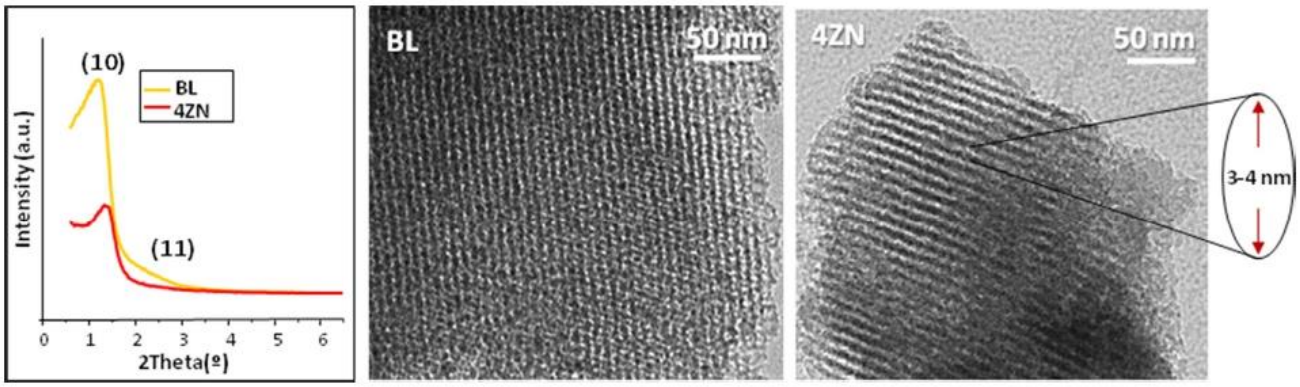


Fig. 1. SA-XRD patterns and TEM micrographs of BL and 4ZN scaffolds.

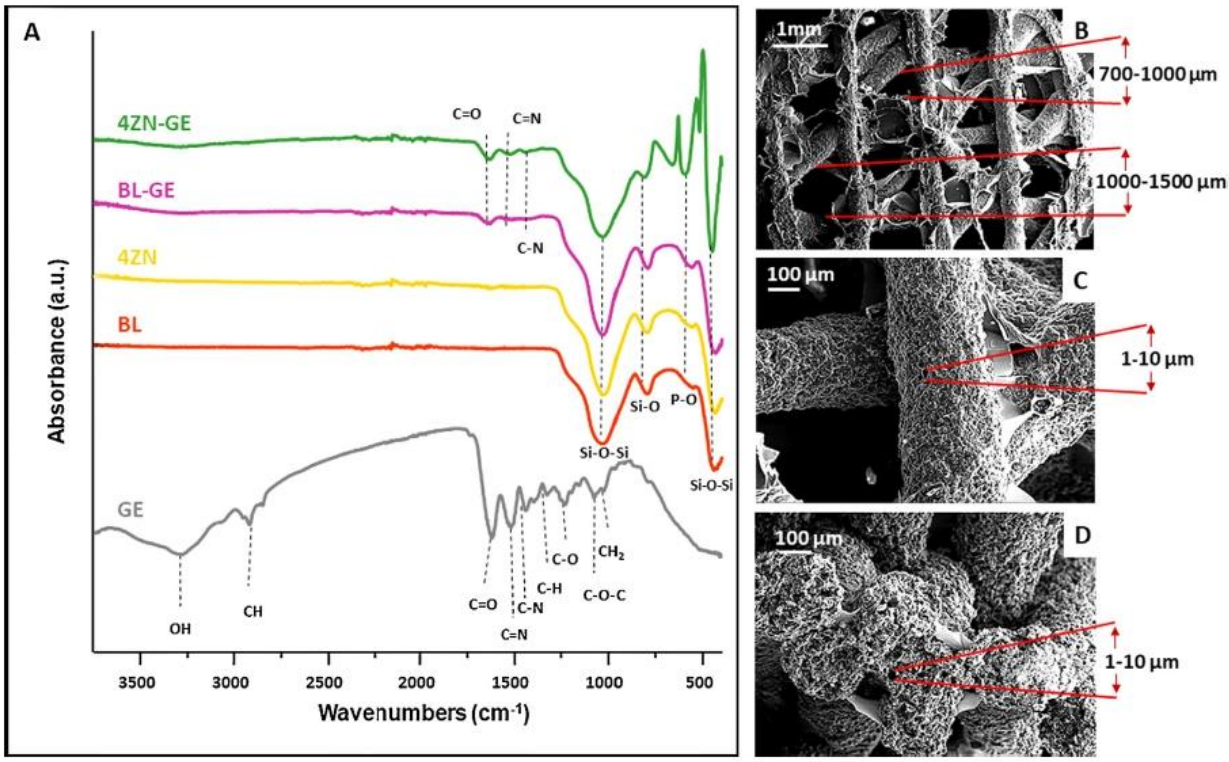


Fig. 2. A. FTIR spectra of 4ZN, 4ZN-GE, BL and BL-GE scaffolds. SEM micrographs of 4ZN-GE scaffold: **B**. Front view of the 700–1000 µm and 1000–1500 µm channels. **C.** Detail of the intersection of two bars where macropores of between 1-10 µm are displayed. **D.** Fracture detail of the intersection where the macropores are also visualised (1-10µm).

porous order indicative region. However, differences between samples as a function of the ZnO content were observed. Thus, BL-GE displayed a sharp diffraction maximum at 2θ in the region of 1.0–1.4º, assigned to the (10) reflection along with a poorly resolved peaks at around 2.0 that can be assigned to the (11) reflection. These maxima were indexed on the basis of an ordered two-dimensional (2D) hexagonal structure (plane group p6mm). The intensity of the (10) maximum decreased while the ZnO content increased, indicating a partial deterioration of the mesoporous structure in 4ZN-GE scaffolds. TEM images of zinc-doped (4ZN) and undoped (BL) scaffolds, obtained with the electron beam parallel to the mesoporous channels, are shown in Fig. 1. Therefore, both samples exhibited a typical 2D-hexagonal ordered mesoporous arrangement. FTIR profile of the 4ZN, 4ZN-GE, BL and BL-GE scaffolds showed the characteristic bands of each material, including the bands of gelatin used to coat the scaffolds (Fig. 2A). SEM micrographs from 4ZN-GE scaffolds, showed two types of channels (Figs. 2B-D). First of them were channels with sizes between 700 and 1000 µm and between 1000 and 1500 µm (Fig. 2B), and the second ones were macropores with sizes between 1-10 µm (Figs. 2C-D). Higher magnification (Figs. 2C-D) shows both, surface and fracture views of the 300 µm wide bars, mentioned macropores between 1-10 µm and the homogeneous gelatin layer on the material surface (Figs. 2C-D). It should be mentioned that the mesopores (2-10 nm) are so small that they cannot be observed at the magnification that the SEM images were taken. BL-GE material showed similar SEM structure to 4ZN-GE. Therefore, BL-GE images were omitted for Fig. 2 simplification.

3.2. Ion release assay

To understand the possible antibacterial activity of the scaffolds, the cumulative release of calcium, phosphorus and zinc ions after soaking in THB was measured (Fig. 3). For BL-GE scaffolds, the lower release of Ca^{2+} ions compared with 4ZN-GE was attributed to its higher *in vitro* bioactive behaviour. Thus, a part of the Ca^{2+} ions released would precipitate as carbonate hydroxyapatite (CHA) on the scaffold surface being eliminated from medium. In contrast, 4ZN-GE scaffolds displayed slower bioactive behaviour and, consequently, most part of the released Ca^{2+} ions from these scaf-

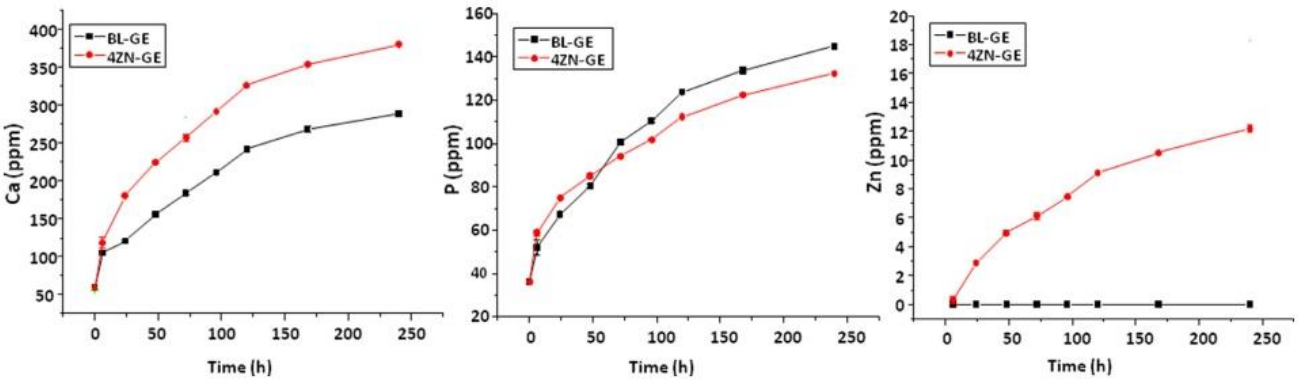


Fig. 3. Amount of Ca^{2+}, P(V) and Zn^{2+} ions released from BL-GE and 4ZN-GE scaffolds as a function of the soaking time in THB.

Table 1
Textural properties of BL-GE and 4ZN-GE before and after to be loaded with antibiotic (L. levofloxacin, V: vancomycin, G: gentamicin or R: rifampicin) determined by nitrogen adsorption. S_{BET}: BET surface area; V_p: pore volume. D_P: pore diameter. The amounts of saturated antibiotic loaded in each sample determined form TGA were also included.

MATERIAL	BL-GE	BL-GE-L	BL-GE-V	BL-GE-G	BL-GE-R	4ZN-GE	4ZN-GE-L	4ZN-GE-V	BL-GE-G	4ZN-GE-R
S_{BET} (m^2/g)	188	146.5	180.5	180.7	126.5	151.4	111.3	107.5	124.5	142.2
V_P (cm^3/g)	0.21	0.15	0.21	0.21	0.12	0.14	0.06	0.11	0.11	0.13
D_P (nm)	3.7	3.5	3.7	3.7	3.4	3.5	3.3	3.5	3.4	3.5
mol drug / mg scaffold	0	1.3×10^{-4}	1.1×10^{-5}	1.3×10^{-5}	8.4×10^{-6}	0	1.3×10^{-4}	1.1×10^{-5}	1.3×10^{-5}	8.4×10^{-6}

folds remained in the solution. Regarding phosphorous ions, 4ZN-GE scaffolds showed lower concentration in the medium that was attributed to the precipitation of calcium and zinc phosphates [31]. Accumulated concentration of zinc increased about 1.5 ppm/day in the first 48 h and more slowly for longer times, in the same conditions than those of bacterial assays.

3.3. Antibiotic loading in MBG scaffolds

Antibiotic adsorption was performed at two different concentrations: saturated and the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for each antibiotic and tested strain.

3.3.1. Thermogravimetric Analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) of scaffolds provided the amount of drug loaded in each case (Table 1). This analysis showed the satisfactory drug loading into the scaffolds by detecting losses of mass which correspond to the loaded drug.

3.3.2. Nitrogen Adsorption Porosimetry

Nitrogen adsorption–desorption isotherms and pore size distributions of BL-GE and 4ZN-GE scaffolds, before and after loaded with each antibiotic, are shown in Fig. 4. All curves can be identified as type IV isotherms, characteristic of mesoporous materials (Fig. 4.A). Observed type H1 hysteresis loops in the mesopore range are characteristic of open cylindrical pores. Fig. 4.B correspond to pore size distributions. Variations were detected when the scaffolds were loaded with the antibiotics. Loaded scaffolds showed a decrease both in surface area and pore volume verifying the drug loading into the mesopore structure. Table 1 collects the textural properties, i. e., surface area (S_{BET}), pore diameter (D_P) and pore volume (V_p) of loaded and non-loaded scaffolds. In general, higher values were found for antibiotic unloaded samples. Thus, BL-GE and 4ZN-GE antibiotic-loaded scaffolds, presented a slight decrease in surface area and pore volume because of the drug loading. These data allowed to verify the successful drug loading into the mesopores of MBG scaffolds.

3.4. Molecular modelling

MBGs investigated have compositions based in SiO_2–CaO–P_2O_5 (BL) or SiO_2–CaO–P_2O_5–ZnO (4ZN) systems. There, silicon and phosphorus elements, as SiO_2 and P_2O_5, are the basis of the glass network in tetrahedral units that bond each other through covalent bonds by their oxygen atoms. Calcium, as CaO, is a network modifier bonded through ionic interactions to the oxygen atoms. Moreover, our research group demonstrated from ^{29}Si NMR spectroscopy that 4ZN-GE scaffolds contain [ZnO_4] tetrahedra [31]. These tetrahedra exhibit negative charge (2–), which justifies the attraction of Ca^{2+} and Zn^{2+} ions acting as network compensators of charge instead of as network modifier cations. Accordingly, the number of non bonding oxygen (NBO) decreases with the increase of Q^4 species and the Q^3 species decrease Moreover, these MGBs present in their surface ionized silanol Si–OH groups which produce a negative charge that interact with the loaded drugs.

Electrostatic potential mapped density (Fig 5.A) and molecular modelling interaction studies (Fig 5.B) of 4ZN-GE model loaded with LEVO VANCO, GENTA, and RIFAM were calculated. Molecular modelling indicates a positive total charge in VANCO and GENTA and a zwitterionic nature in RIFAM and LEVO. Moreover, modelling showed strong 6 and 4 hydrogen bonds with VANCO (-295.7 kcal/mol) and GENTA (-250.1 kcal/mol), respectively. In case of RIFAM (-226.1 kcal/mol) and LEVO (-368.7 kcal/mol) modelling exhibited 2 and 0 hydrogen bonds, respectively. Although VANCO has 6 hydrogen bonds that favourably interact with 4ZN-GE surface, it is a large molecule (1450.3 uma) which causes low antibiotic loading. Zwitterionic LEVO presents no hydrogen bonds but it is the smallest molecule (823.9 uma) allowing the formation of a stable complex and achieved a high loading yield.

3.5. Antibiotic release from MBG scaffolds

Antibiotics release assays were performed in PBS at physiological pH of 7.4. The use of THB for these studies was discarded because the bacterial growth induction in this medium at the analysis conditions. No significant differences were obtained between BL-GE and 4ZN-GE. Thus, only results corresponding to the last one

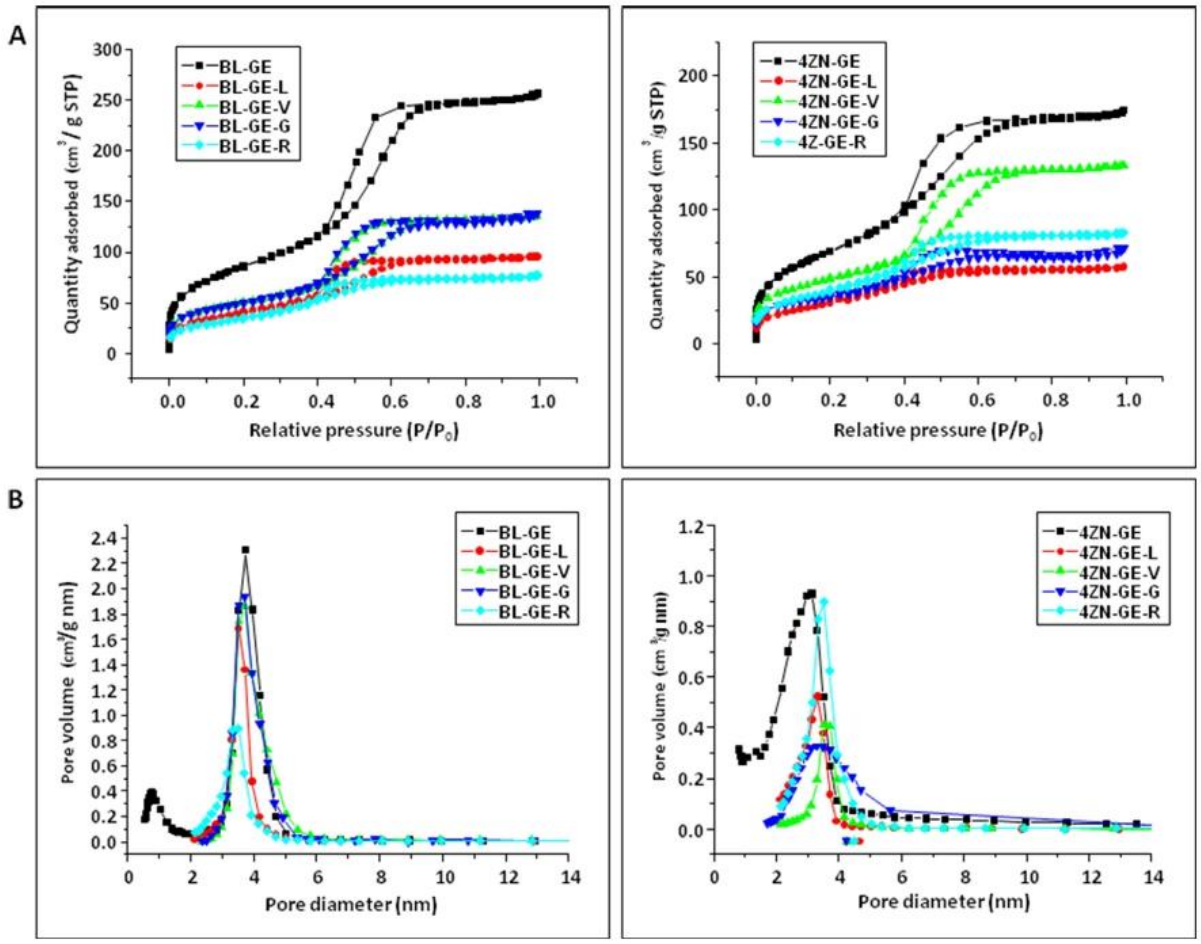


Fig. 4. **A** Nitrogen adsorption isotherms and **B** pore size distributions of BL-GE and 4ZN-GE scaffolds before and after be loaded with the antibiotics.

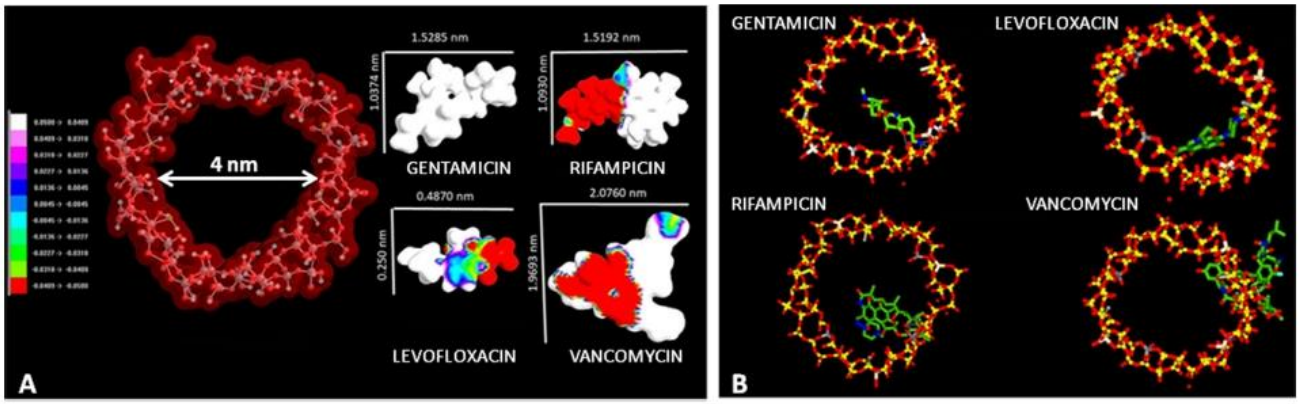


Fig. 5. **A.** Electrostatic potential mapped density calculations carried out with Hex 8.0 software. **B.** Molecular modelling interaction studies where 4ZN-GE model was used as receptor and gentamicin 5+, levofloxacin zwitterion, rifampicin zwitterion or vancomycin 1+ as ligands.

will be presented. Fig. 6 shows the release from 4ZN-GE scaffolds of each antibiotic along time. Antibiotics release kinetics from the MBGs were evaluated according to zero-order kinetics and first-order kinetic model. Zero-order kinetics,

$$Q_0 - Q_t = k_0 \bullet t \quad (1)$$

Where Q_t is the amount of drug remaining as a solid at time t, Q_0 is the initial amount of drug in the pharmaceutical dosage form and k_0 is the zero-order release rate constant. As it is observed in Fig. 6, LEVO presents a release preserved in time, maintaining the release even after 15 days. It must be considered that LEVO presents a zwitterionic nature (pKs 6.1-8.2) [32] having a neutral total charge but being able to establish electrostatic interactions with the silanol groups of the MBG matrix and providing a maintained release favoured by its high load and solubility [32]. However, in case of RIFAM, VANCO and GENTA, the release data showed in Fig. 6 fit better to a first-order kinetic model with an empirical non-ideality factor (δ) [33].

$$w_t/w_0 = (w_t/w_0)_{max}(1 - e^{k1t})^{\delta} \quad (2)$$

Where w_t/w_0 is the percentage of antibiotic released at time t, A the maximum amount of antibiotic released (in %), and k_1, the release rate constant. δ values are 1 for first-order kinetics materials and 0, for materials that release the loaded drug in the very initial time of analysis. RIFAM, VANCO and GENTA present zero and positive total charge of 6+ and 5+, respectively at the physiological pH of assay. δ value provides a fidelity degree approximation to proposed model for theoretical first-order kinetics (Table 2). When

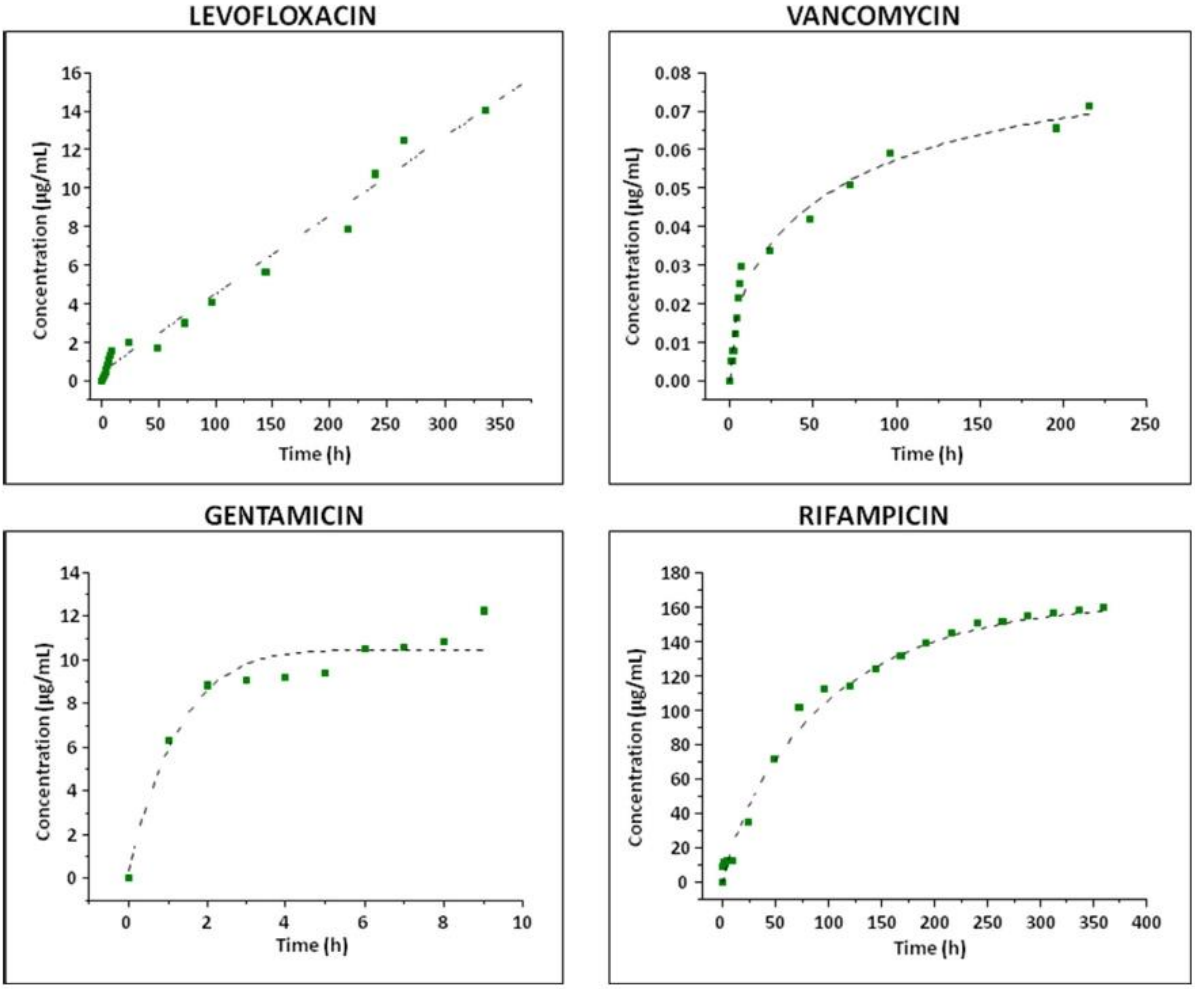


Fig. 6. Antibiotic release curves from 4ZN-GE at physiological pH of 7.4.

Table 2
Parameters of antibiotics release kinetics from 4ZN-GE scaffolds. w_0: initial loaded mass (% of antibiotic loaded); $(w_t/w_0)_{max}$: maximum relative release; k_1: constant of Chapman model release rate and $\mathbf{K}_{\mathbf{LEVO}}$ zero model release rate; δ: non-ideality factor in Chapman model; R: goodness of fit.

Sample	pH	w_0 (%)	$(w_t/w_0)_{max}$ (%)	K_1 (x10^3 h^{-1}) $K_{0\ LEVO}$	δ	R
4ZN-GE-L	7.4	6	71	0.05	-	0.99
4ZN-GE-V	7.4	1	87	10.5	0.45	0.97
4ZN-GE-G	7.4	2	99	8.0	0.27	0.97
4ZN-GE-R	7.4	4	78	9.5	0.83	0.99

δ is near to 1, first-order kinetic is more accurate and drug delivery from mesopores has smaller burst effect. This effect is usually attributed to the adsorption of drug molecules into the mesopores of the matrix. As it can be observed in Table 2, the biggest value of δ is 0.83 for RIFAM and then VANCO, 0.45 and finally GENTA 0.27. As is observed in Fig. 6, RIFAM release is maintained due to its stable interaction with the surface of MBGs and its limited solubility. However, VANCO present a less stable interaction with MBGs and GENTA a higher solubility having, in both cases, a faster release.

At this pH of 7.4, interactions between the antibiotics and the thin gelatin layer coating the scaffolds were not considered, due to the pKs: pKb ~ 6.5 and pKa ~ 4.7 of NH_2 and COOH ionisable groups of gelatin that were not able to establish electrostatic interactions with the drugs.

On the other hand, the complete antibiotic release assay was also performed at pH 6.5, which corresponds to the pH generated in an infection process. There were no significant differences for results obtained at pH 7.4 and at pH 6.5. For this reason, the antibiotic release results at pH 6.5 are not shown.

3.6. Agar disk-diffusion tests of drug loaded materials

3.6.1. S. aureus

4ZN-GE scaffolds were loaded with LEVO, VANCO and RIFAM because their referenced effectiveness against *S. aureus* (Fig. 7.1-3) [34-36]. The antibiotic loaded scaffolds were named as 4ZN-GE-L, 4ZN-GE-V and 4ZN-GE-R, respectively. The assay allowed evaluating the capability of the scaffolds loaded samples to eradicate bacteria. Disks foams were impregnated with aliquots (20 µL) containing the antibiotic and zinc ions released from scaffolds at each time at both infection and physiological conditions, and put in contact with pre-seeded *S. aureus* agar plates. 4ZN-GE-L scaffolds inhibited *S. aureus* growth for 18 days (Fig. 7.1) and reached their maximal inhibition after 5 days with a 14 mm halo. 4ZN-GE-V scaffolds inhibited *S. aureus* growth for 5 days. 4ZN-GE-V scaffolds reached their maximal inhibition after 6 h showing 18 % of inhibition respect LEVO (Fig. 7.2). 4ZN-GE-R scaffolds inhibited *S. aureus* growth for 10 days and reached their maximal inhibition after 48 h showing 57 % of inhibition compared to LEVO (Fig. 7.3). There

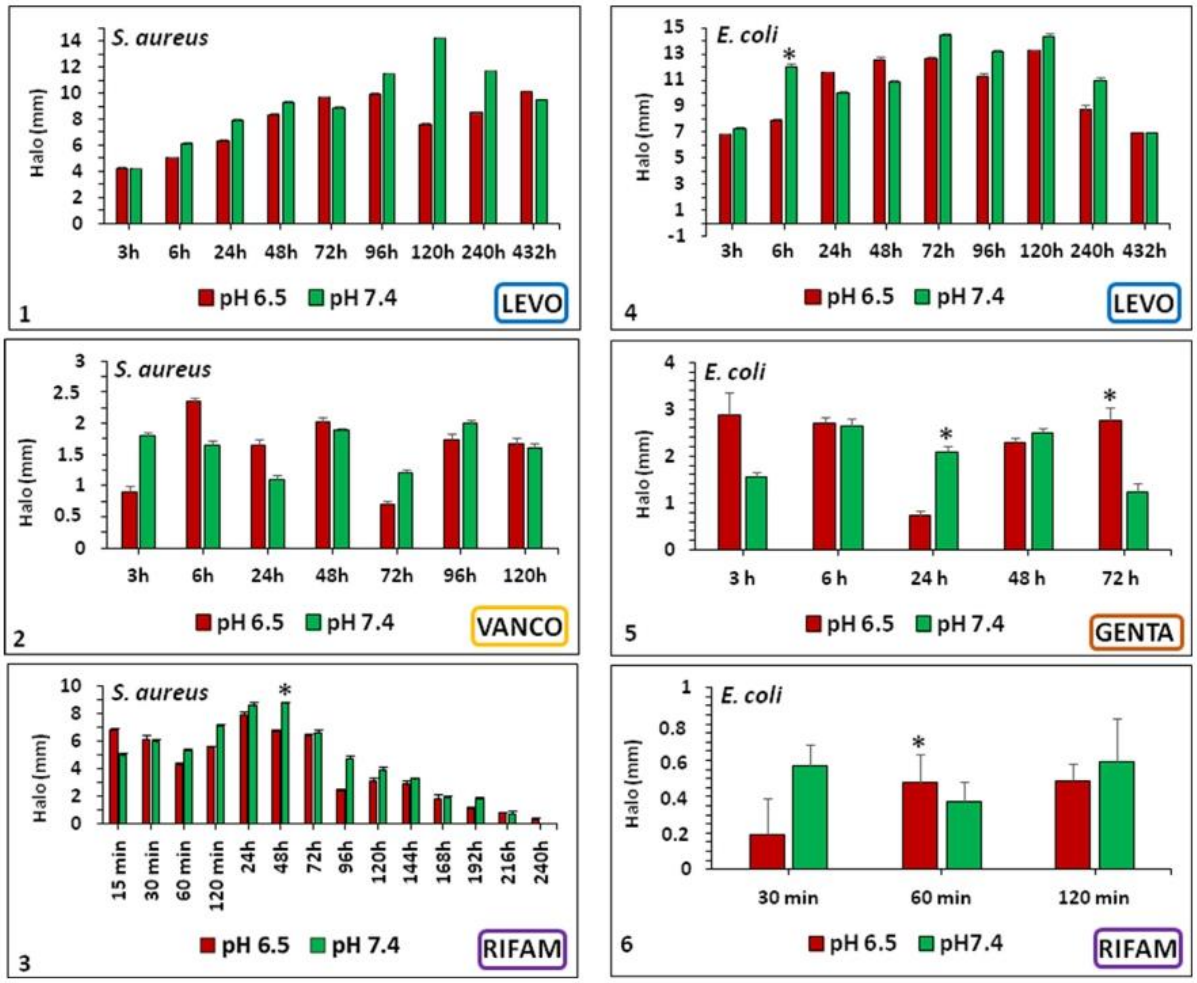


Fig. 7. Variation with time of scaffolds inhibition zone of 4ZN-GE-L (**1**), 4ZN-GE-V (**2**) and 4ZN-GE-R (**3**) against *S. aureus*, and of 4ZN-GE-L (**4**), 4ZN-GE-G (**5**) and 4ZN-GE-R (**6**) against *E. coli*, at physiological pH of 7.4 and pH 6.5 of an infection environment. * Indicates significant differences between pH 7.4 and pH 6.5. Statistical significance: $p < 0.05$.

were no significant differences between results obtained at physiological, 7.4, and infection, 6.5, pH values.

3.6.2. *E. coli*

4ZN-GE scaffolds were loaded with LEVO, GENTA and RIFAM active antibiotics against *E. coli* (Fig. 7.4-6) [34,37,38]. Loaded scaffolds were named as 4ZN-GE-L, 4ZN-GE-G and 4ZN-GE-R, respectively. Agar disk diffusion tests were performed as above. 4ZN-GE-L scaffolds inhibited *E. coli* growth for 18 days (Fig. 7.4). 4ZN-GE-L scaffolds reached their maximal inhibition after 72 h with a 15 mm halo. 4ZN-GE-G scaffolds inhibited *E. coli* growth for 72 h with a maximal inhibition at 6 h, showing 20% of inhibition respect LEVO (Fig. 7.5). 4ZN-GE-R scaffolds inhibited *E. coli* growth for 120 min and reached their maximal inhibition after 48 h showing 4 % of inhibition respect LEVO (Fig. 7.6). As Fig. 7 shows, the most effective antibiotics against *E. coli* were LEVO and GENTA. The inhibition zone created by RIFAM was just the 4% respect LEVO. There were no significant differences between physiological and infection pH values.

3.7. Planktonic growth inhibition tests

Tested scaffolds were loaded with a saturated antibiotic concentration and the loaded drug was quantified (Table 1) to assess the antibiotic effect against bacteria. The antimicrobial effect of BL-GE and 4ZN-GE scaffolds, with and without drugs, at concentrations of 27 and 80 mg scaffold/mL, was evaluated between 2 and 48 h by measuring colony forming units (CFUs)/mL. Fig. 8 shows the CFUs/mL for both strains (*S. aureus* and *E. coli*) and both materials (BL-GE and 4ZN-GE), loaded or not with the tested antibiotics. Regarding *S. aureus* cultures, bacteria growth for VANCO, LEVO and RIFAM loaded BL-GE and 4ZN-GE scaffolds was inhibited at a 99.9%. For unloaded 4ZN-GE scaffolds, only after 48 h the bacteria growth decreased up to a 50% compared to BL-GE scaffolds. This effect can be attributed to the zinc release, reaching 5.5 ppm of Zn^{2+} at 2 days of assay, enough amounts to inhibit S. *aureus* growth (Fig. 3) [39]. In *E. coli* cultures, for unloaded BL-GE and 4ZN-GE scaffolds, bacteria growth was inhibited only the first 2 h until a 75% due to the calcium and zinc ions release. For BL-GE and 4ZN-GE LEVO and RIFAM loaded scaffolds, almost of 100% of bacteria growth inhibition was achieved. RIFAM was no tested against *E. coli* because it was reported that this antibiotic is not effective against these bacteria [40]. As Fig. 8 shows, the same antibiotics that managed to inhibit bacterial growth in the inhibition zone experiments, achieved an effective antibacterial effect for the planktonic growth of *S. aureus* and *E. coli*.

3.8. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) tests

Previous planktonic growth tests showed no significant differences between zinc doped and undoped scaffolds. Antibiotics were very effective against both strains and zinc effect was no appreciable. For this reason, we considered of interest to prove, in an antibiotic resistant scenario, what role zinc ions released from the scaffold could play. Thus, to test zinc antibacterial effect and its possible synergistic effect with antibiotics, the concentration of an-

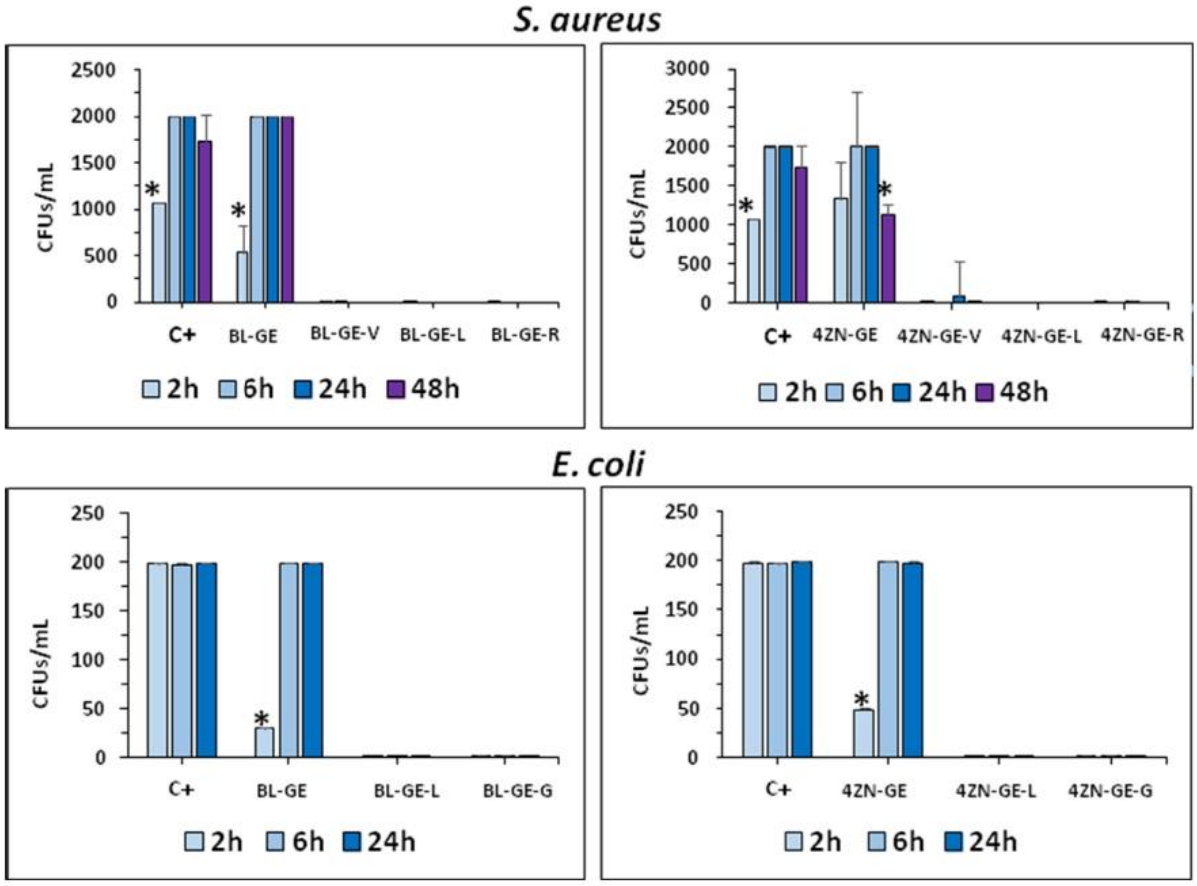


Fig. 8. Planktonic growth of *S. aureus* and *E. coli* after 2, 6, 24 and 48 h of bacteria culture in contact with BL-GE and 4ZN-GE scaffolds, loaded and unloaded with: Levofloxacin (L), Vancomycin (V), Gentamicin (G) and Rifampicin (R). * indicates significant differences between 2, 6, 24 and 48 h. Statistical significance: $p < 0.05$.

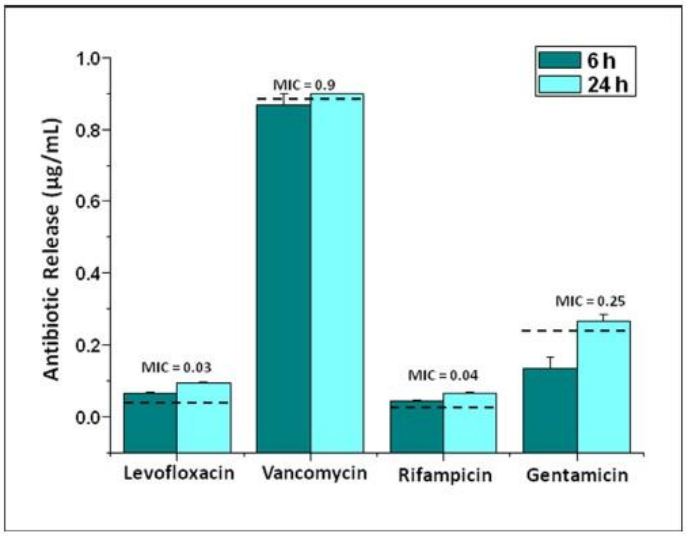


Fig. 9. Antibiotic released from MIC loaded 4ZN-GE scaffolds at pH 7.4 after 6 and 24 h. Release of antibiotics from BL-GE was analogous in all the cases (data not shown).

tibiotic loaded was reduced for each strain from the saturated one to the MIC of each drug (Fig. 9).

Two different concentrations (27 mg/mL and 80 mg/mL) of BL-GE and 4ZN-GE scaffolds were loaded with the antibiotics to have the MIC of antibiotic for each strain released to the culture medium. Both bacteria strains were cultured 24 h in contact with the loaded scaffolds and its antibacterial effect was compared for both strains with the MIC effect for each antibiotic. Inhibition growth was achieved by all of them, compared with the MIC [41].

In *S. aureus* assays (Fig. 10) when concentration was 80 mg scaffold/mL, 4ZN-GE loaded with antibiotic achieved a higher CFUs decrease at 24 h (except for LEVO) than antibiotic loaded BL-GE scaffolds. This fact was attributed to the synergistic effect of zinc ions and the antibiotics. On the other hand, when the concentration was 27 mg scaffold/mL, the synergistic effect at 24 h was demonstrated with the combinations of zinc-containing scaffolds with VANCO or with LEVO.

In *E. coli* assays (Fig. 10) for 27 and 80 mg scaffold/mL concentrations, 4ZN-GE and BL-GE scaffolds loaded with LEVO showed almost total capability to kill bacteria at 24 h. However, for GENTA-loaded scaffolds, a superior behaviour was achieved for 4ZN-GE scaffold indicating again a synergistic effect of zinc and GENTA.

3.9. Biofilm degradation

Finally, the antimicrobial effect of antibiotic loaded and unloaded BL-GE and 4ZN-GE scaffolds was investigated in a simulate infection environment containing *S. aureus* and *E. coli* biofilms. In Fig. 11, it is possible to appreciate the typical structure of a preformed biofilm which shows colonies of living bacteria (green) covered by a protective mucopolysaccharide matrix (blue) used as a control in both strains.

After contacting Gram + and - bacteria with the tested scaffolds, notable differences were observed in the biofilms. According to each case, they were partially or totally destroyed showing extracellular matrix in blue (calcofluor), alive bacteria in green (PI) and dead bacteria in red (SYTO 9).

Regarding *S. aureus* assays, the scaffolds BL-GE, 4ZN-GE and 4ZN-GE-G produced a partial destruction of the biofilm at 24 h. However, RIFAM, VANCO and LEVO loaded 4ZN-GE scaffolds reached complete biofilm destruction, observing colonial killed

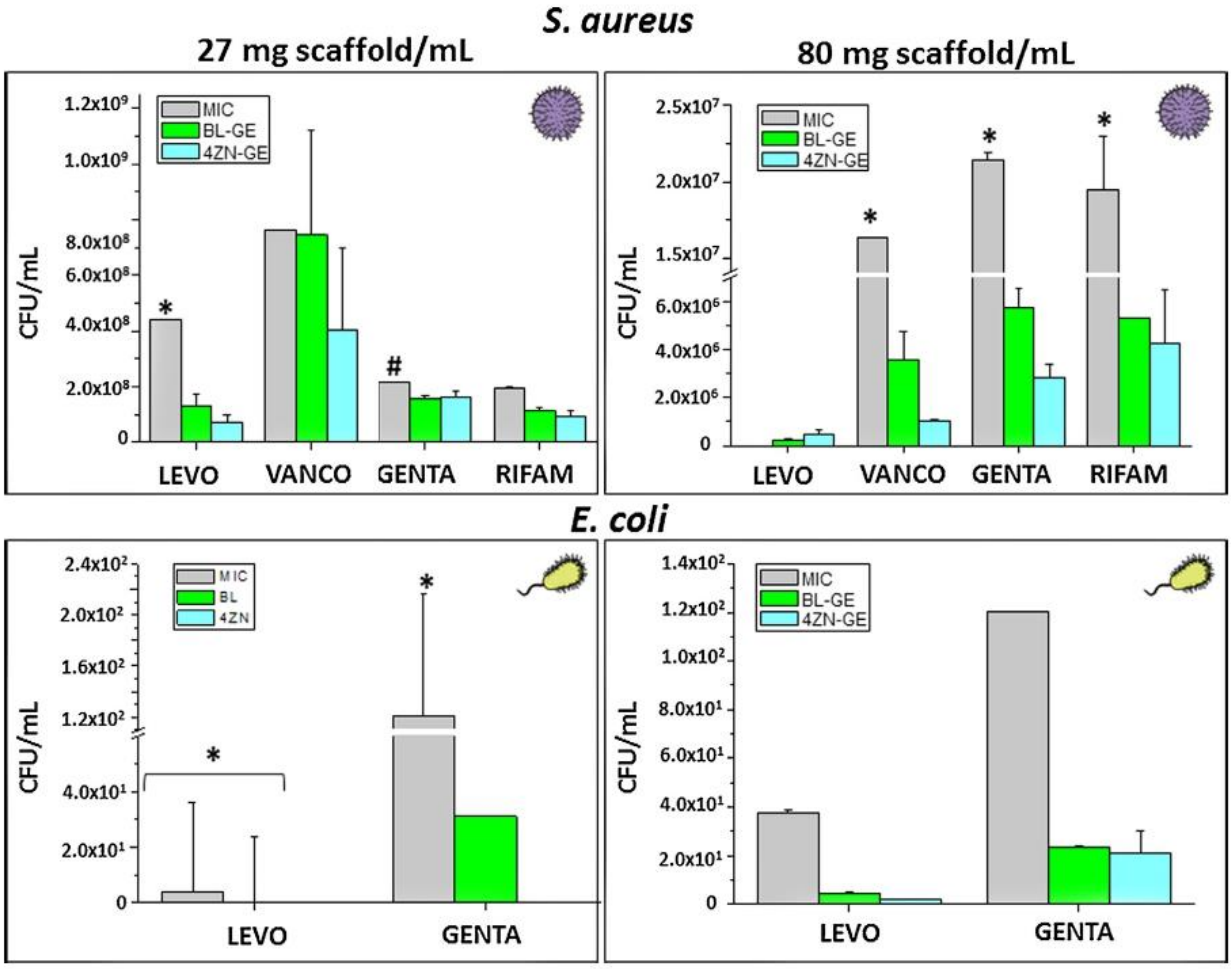


Fig. 10. CFUs/mL of *S. aureus* and *E. coli* for 27 and 80 mg scaffold/mL concentrations after 24 h in contact with 4ZN-GE and BL-GE antibiotic loaded scaffolds and with MIC. *and # indicate significant differences between the different samples. Comparisons between: BL-GE and 4ZN-GE (*), MIC and BL-GE (#); Statistical significance: $p < 0.05$.

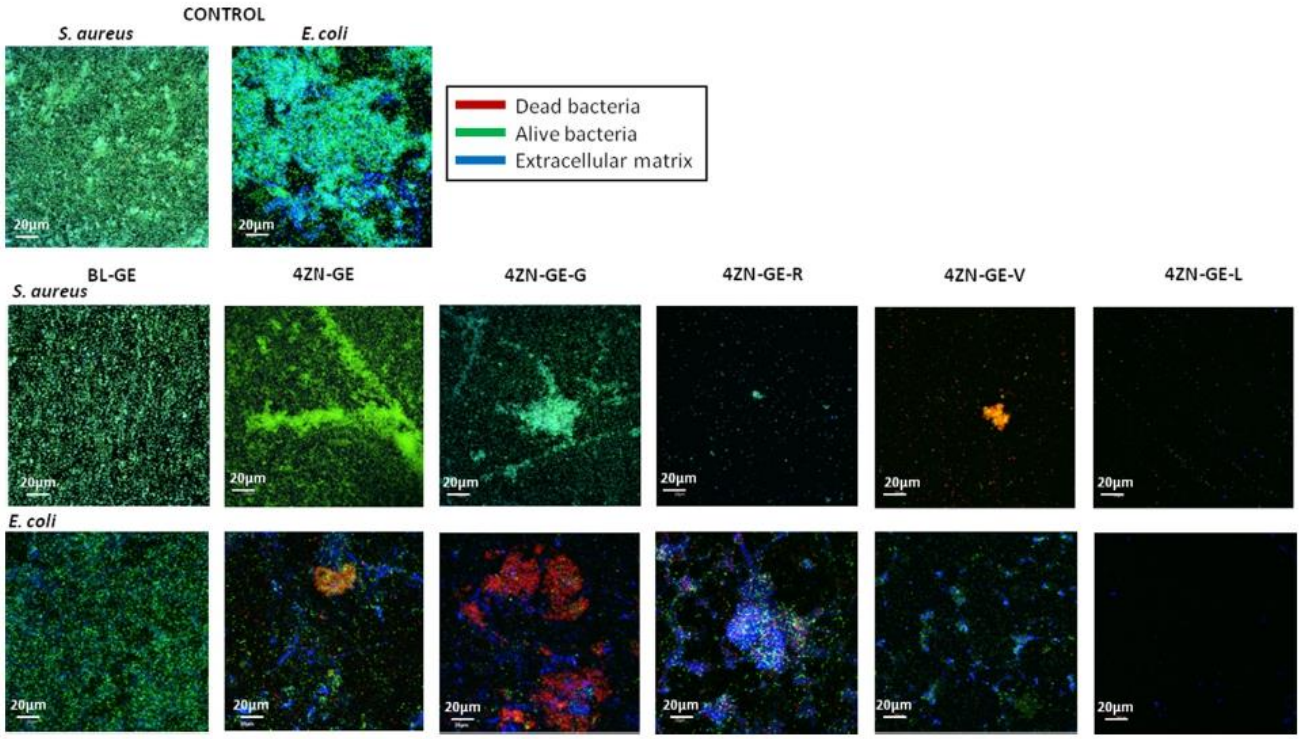


Fig. 11. Confocal micrographs of *S. aureus* and *E. coli* biofilms before (control) and after 24 h in contact with BL-GE scaffolds, 4ZN-GE scaffolds and 4ZN-GE scaffolds loaded with each tested antibiotic

bacteria without the presence of protective layer of mucopolysaccharides.

Regarding *E. coli* assays, BL-GE, 4ZN-GE, 4ZN-GE-V and 4ZN-GE-R loaded scaffolds reached a partial destruction of the biofilm after 24 h. Nevertheless, LEVO and GENTA loaded 4ZN-GE scaffolds reached complete biofilm destruction.

These results show that our therapeutic ion-drug systems formed by the combination zinc together with GENTA or LEVO for *E. Coli* and RIFAM, VANCO or LEVO for *S. aureus* are very effective for the total destruction of the biofilm in the first 24 h of incubation, which is indicative of their antimicrobial effect. These results agree with inhibition zone assays (Fig. 7) and planktonic growth experiments (Fig. 8) where it was possible to confirm the antibacterial efficiency of same antibiotics for same strain [34-38]. When biofilms were in contact with the unloaded 4ZN-GE scaffolds a partial biofilm destruction was found in both strains which show zinc antibacterial effect by itself.

4. Conclusions

Zn^{2+} ions in combination with antibiotics, included in the mesoporous bioactive glass scaffolds increased the antibacterial effect of the system. *In vitro* studies of Zn-free (BL-GE) and Zn-containing (4ZN-GE) scaffolds with *S. aureus* and *E. coli*, showed a synergistic antibacterial effect of zinc with the antibiotics LEVO, VANCO, RIFAM or GENTA loaded in the scaffolds.

In planktonic assays, BL-GE and 4ZN-GE scaffolds loaded with saturated antibiotic concentration, exhibited total inhibition growth of *S. aureus* and *E. coli* cultures at 2 h. However, when scaffolds were loaded only with the MIC of antibiotics, zinc ions coming from 4ZN-GE scaffolds, showed synergistic antibacterial effect with LEVO and VANCO against *S. aureus* and with LEVO and GENTA against *E. coli* cultures.

In the inhibition growing zone tests, inhibition halos were achieved in *S. aureus* cultures at 18, 9 and 5 days with 4ZN-GE scaffolds loaded respectively with LEVO, RIFAM and VANCO. Nevertheless, in *E. coli* cultures, inhibition halos were maintained at 8 and 3 days with 4ZN-GE scaffolds loaded with LEVO and GENTA.

Partial biofilm destruction was reached with 4ZN-GE scaffolds, and total biofilm destruction with VANCO, LEVO and RIFAM 4ZN-GE loaded scaffolds for *S. aureus* and LEVO and GENTA 4ZN-GE loaded scaffolds for *E. coli*.

Therefore, the study demonstrated that the addition of antibacterial zinc ions inhibits planktonic bacterial growth and destroys biofilms with minimal antibiotic loaded concentration. There was an antibacterial effect of same antibiotics for same strains, potentiated by zinc. This approach reduces antibiotic resistance mechanisms eradicating bacteria in the surroundings of the implant site. These results provide significant insights for designing bone osteogenic implants capable of playing simultaneously a dual role against infection.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This research was funded by Instituto de Salud Carlos III, grant number PI15/00978 co-funded with European Union FEDER funds and the European Research Council, Advanced Grant Verdi-Proposal No. 694160 (ERC-2015-AdG).

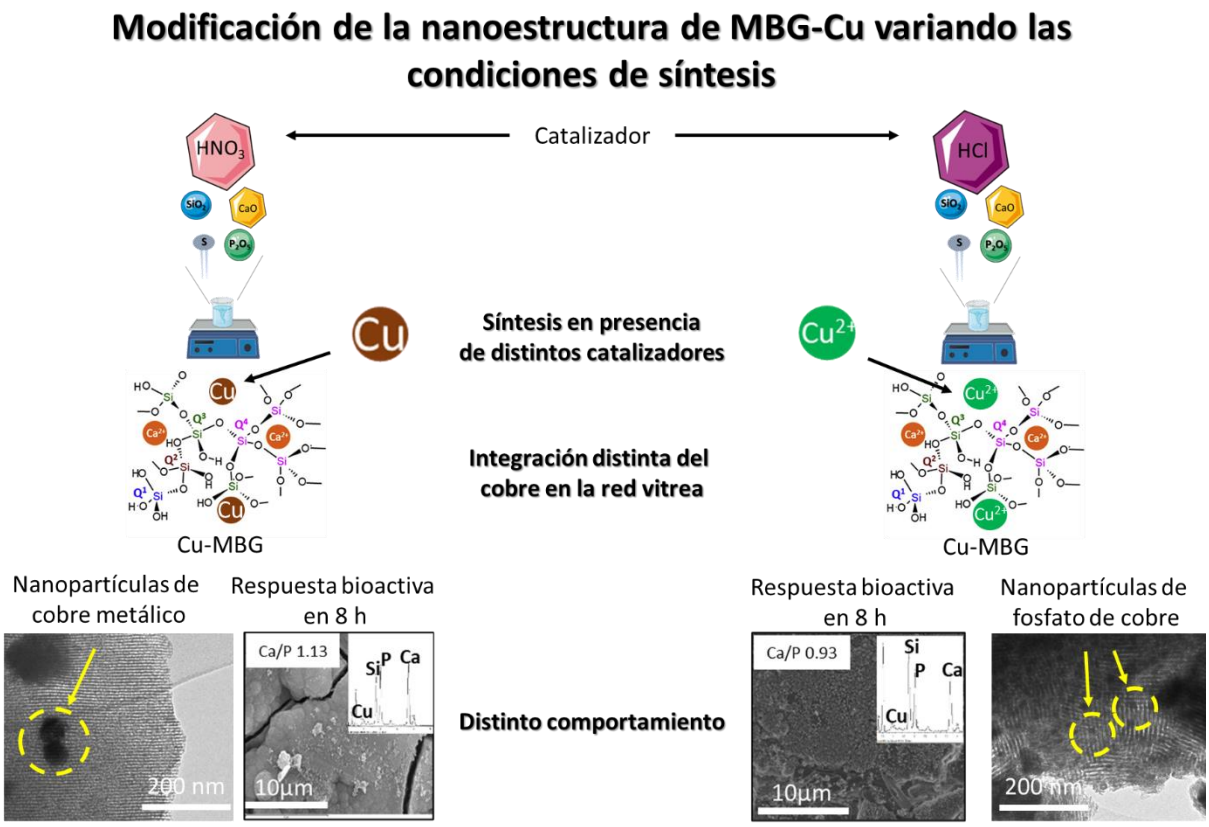
References

[1] M. Ozaki, K. Narita, M. Kurita, Y. Iwashina, A. Takushima, K. Harii, Implantation of Thickened Artificial Bone for Reduction of Dead Space and Prevention of Infection Between Implant and Dura in Secondary Reconstruction of the Skull, J. Craniofac. Surg. 28 (2017) 888–891.
[2] S. Masuda, S. Fujibayashi, B. Otsuki, H. Kimura, S. Matsuda, Efficacy of Target Drug Delivery and Dead Space Reduction Using Antibiotic-loaded Bone Cement for the Treatment of Complex Spinal Infection, Clin. Spine. Surg. 30 (2017) E1246–E1250.
[3] P.P. Chakraborty, A. Roy, R. Bhattacharjee, S. Mukhopadhyay, S. Chowdhury, Reversible Secondary Osteolysis in Diabetic Foot Infection, J. Am. Podiatr. Med. Assoc. 107 (2017) 538–540.
[4] H.W. Zhang, L. Peng, B.W. Li, G.K. Song, The Role of RANKL/RANK/OPG System in the Canine Model of Hip Periprosthetic Infection Osteolysis, Int. J. Artif. Organs. 39 (2017) 619–624.
[5] J.M. Schierholz, J. Beuth, Implant infections: a haven for opportunistic bacteria, J. Hosp. Infect. 49 (2001) 87–93.
[6] S. Sánchez-Salcedo, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M Vallet-Regí, Design and preparation of biocompatible zwitterionic hydroxyapatite, J, Mater. Chem. B. 11 (2013) 1595–1606.
[7] S. Makvana, L.R. Krilov, Escherichia Coli Infections, Pediatr. Rev. 36 (2015) 167–170.
[8] B.K. Giersing, S.S. Dastgheyb, K. Modjarrad, V. Moorthy, Status of Vaccine Research and Development of Vaccines for Staphylococcus Aureus, Vaccine 34 (2016) 2962–2966.
[9] A. Nishimura, A. Matsumine, K. Kato, K. Aasanuma, T. Nakamura, A. Fukuda, A. Sudo, Endoscopic Versus Open Surgery for Calcaneal Bone Cysts: A Preliminary Report, J. Foot Ankle Surg 55 (2016) 782–787.
[10] M. Kanayama, T. Hashimoto, K. Shigenobu, F. Oha, A. Iwata, M. Tanaka, MRI-based Decision Making of Implant Removal in Deep Wound Infection After Instrumented Lumbar Fusion, Clin. Spine Surg. 30 (2017) E99–E103.
[11] S. Kurtz, K. Ong, E. Lau, F. Mowat, M. Halpern, Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States From 2005 to 2030, J Bone Joint Surg. Am. 89 (2007) 780–785.
[12] C. Li, N. Renz, A. Trampuz, Management of Periprosthetic Joint Infection, Hip Pelvis 30 (2018) 138–146.
[13] T.N. Peel, Studying Biofilm and Clinical Issues in Orthopedics, Front. Microbiol. 10 (2019) 359.
[14] A.J. Tande, R. Patel, Prosthetic joint infection, Clin. Microbiol. Rev. 27 (2014) 302–345.
[15] M. Ribeiro, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, Infection of Orthopedic Implants With Emphasis on Bacterial Adhesion Process and Techniques Used in Studying Bacterial-Material Interactions, Biomatter 2 (2012) 176–194.
[16] K. Hiramatsu, Y. Katayama, M. Matsuo, T. Sasaki, Y. Morimoto, A. Sekiguchi, T. Baba, Multi-drug-resistant Staphylococcus Aureus and Future Chemotherapy, J. Infect. Chemother. 20 (2014) 593–601.
[17] R. Gao, Q. Wang, P. Li, Z. Lia, Y. Feng, Genome sequence and characteristics of plasmid pWH12, a variant of the mcr-1-harbouring plasmid pHNSHP45, from the multi-drug resistant E, coli, Virulence. 7 (2016) 732–735.
[18] G. Sharma, S. Sharma, P. Sharma, D. Chandola, S. Dang, S. Gupta, R. Gabrani, Escherichia Coli Biofilm: Development and Therapeutic Strategies, J. Appl. Microbiol. 121 (2016) 309–319.
[19] S.K. Shukla, T.S. Rao, Staphylococcus aureus Biofilm Removal by Targeting Biofilm-Associated Extracellular Proteins, Indian J. Med. Res. 146 (2017) S1–S8.
[20] C. Wu, J. Chang, Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors, J. Control. Release. 193 (2014) 282–295.
[21] A.J. Salinas, P. Esbrit, M. Vallet-Regí, A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair, Biomater. Sci. 1 (2013) 40–51.
[22] A. Hoppe, V. Mouriño, A.R. Boccaccini, Therapeutic inorganic ions in bioactive glasses to enhance bone formation and beyond, Biomater. Sci. 1 (2013) 254–256.
[23] A.L. Doadrio, J.C. Doadrio, J.M. Sánchez-Montero, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, A rational explanation of the vancomycin release from SBA-15 and its derivative by molecular modelling, Micropor. Mesopor. Mat. 132 (2010) 556–559.
[24] D. Arcos, M. Vallet-Regí, Sol-gel Silica-Based Biomaterials and Bone Tissue Regeneration, Acta Biomater. 6 (2010) 2874–2888.
[25] A. Anand, V. Lalzawmliana, V. Kumar, P. Das, K.B. Devi, A.K. Maji, B. Kundu, M. Roy, S.K. Nandi, Preparation and in Vivo Biocompatibility Studies of Different Mesoporous Bioactive Glasses, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 89 (2019) 89–98.
[26] X. Zhang, D. Zeng, N. Li, J. Wen, X. Jiang, C. Liu, Y. Li, Functionalized mesoporous bioactive glass scaffolds for enhanced bone tissue regeneration, Sci. Rep. 6 (2016) 19361.
[27] G. Kaur, N. Sriranganathan, S.G. Waldrop, P. Sharma, B.N. Chudasama, Effect of Copper on the Up-Regulation/Down-Regulation of Genes, Cytotoxicity and Ion Dissolution for Mesoporous Bioactive Glasses, Biomed. Mater. 12 (2017) 045020.
[28] S. Garg, S. Thakur, A. Gupta, G. Kaur, O.P. Pandey, Antibacterial and Anticancerous Drug Loading Kinetics for (10-x) CuO-xZnO-20CaO-60SiO_2-10P_2O_5 ($2 \leq X \leq 8$) Mesoporous Bioactive Glasses, J. Mater. Sci. Mater. Med. 28 (2017) 11.
[29] S. Kaya, M. Cresswella, A.R. Bocaccini, Mesoporous silica-based bioactive glasses for antibiotic-free antibacterial applications, Mat. Sci. & Eng. C-Mater. 83 (2018) 99–107.

[30] R. Pérez, S. Sanchez-Salcedo, D. Lozano, C. Heras, P. Esbrit, M. Vallet-Regí, A.J. Salinas, Osteogenic Effect of ZnO-Mesoporous Glasses Loaded With Osteostatin, Nanomaterials (Basel) 8 (2018) 592.
[31] C. Heras, S. Sanchez-Salcedo, D. Lozano, J. Peña, P. Esbrit, M. Vallet-Regi, A.J. Salinas, Osteostatin Potentiates the Bioactivity of Mesoporous Glass Scaffolds Containing Zn^{2+} Ions in Human Mesenchymal Stem Cells, Acta Biomater 89 (2019) 359–371.
[32] W. Xia, J. Chang, Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): a promising bioactive drug delivery system, J. Control. Release. 110 (2006) 522–530.
[33] A. Nieto, F. Balas, M. Colilla, M. Manzano, M. Vallet-Regí, Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate sodium alendronate dosage, Microp. Mesopor. Mat. 116 (2008) 4–13.
[34] W. Zimmerli, P. Sendi, Orthopaedic Biofilm Infections, APMIS 125 (2017) 353–364.
[35] C. Loc-Carrillo, C. Wang, A. Canden, M. Burr, J. Agarwal, Local Intramedullary Delivery of Vancomycin Can Prevent the Development of Long Bone Staphylococcus aureus Infection, PLoS One 11 (2016) e0160187.
[36] S.W.N Ueng, L. Song-Shu, W. I-Chun, Y. Chuen-Yung, C. Ru-chin, L. Shih-jung, C. Err-Cheng, L. Cheng-Fen, Y. Li-Jen, C. Sheng-Chieh, Efficacy of vancomycin-releasing biodegradable poly(lactide-co-glycolide) antibiotics beads for treatment of experimental bone infection due to Staphylococcus aureus, J. Orthop. Surg. Res. 11 (2016) 52.
[37] M. Cicuéndez, I. Izquierdo-Barba, M.T. Portolés, M. Vallet-Regí, Biocompatibility and Levofloxacin Delivery of Mesoporous Materials, Eur. J. Pharm. Biopharm. 84 (2013) 115–124.
[38] C.C. Llanos-Paez, S. Hennig, C.E. Staatz, Population pharmacokinetic modelling, Monte Carlo simulation and semi-mechanistic pharmacodynamic modelling as tools to personalize gentamicin therapy, J. Antimicrob. Chemother. 72 (2017) 639–667.
[39] S. Sánchez-Salcedo, S. Shruti, A.J. Salinas, G. Malvasi, L. Muenbue, M. Vallet-Regi, In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO_2–CaO–P_2O_5 meso-macroporous glass scaffolds enriched with ZnO, J. Mater. Chem. B. 2 (2014) 4836–4847.
[40] L. Angiolini, M. Agnes, B. Cohen, K. Yannakopoulou, A. Douhal, Formation, characterization and pH dependence of rifampicin: heptakis(2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrin complexes, Int. J. Pharm. 531 (2017) 668–675.
[41] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, J. Antimicrob. Chemother. 48 (2001) 5–16.

III.1.3 Development and evaluation of Cu-containing MBG for bone defects therapy

III.1.3.1 Introducción



Esquema 3. Resumen gráfico del trabajo "Development and evaluation of Cu-containing MBG for bone defects therapy".

En busca de estrategias alternativas con las que incrementar las propiedades terapéuticas de los MBG, una de las estrategias más populares es la de incorporar cationes metálicos con aplicaciones médicas. En este sentido podemos destacar las aplicaciones de cationes de diversos cationes como Ag, Sr, Zn, Ga Mg, B, Co y Cu, entre otros. Sin embargo, de los cationes anteriormente mencionados, solamente el Zn, Ce, Ga, B y Cu [319,398–404] tienen propiedades osteogénicas y antibacterianas, pero solamente el Cu, además, tiene propiedades angiogénicas [324,405,406].

Este elemento metálico participa en diversos procesos biológicos como el metabolismo de la mitocondria al funcionar como un cofactor esencial en la actividad de la citocromo C oxidasa, la superóxido dismutasa dependiente de Zn, dopamina-β- hidroxilasa, ceruloplasmina, etc [407]. Se ha demostrado que este catión metálico activa las rutas de diferenciación de las células madre mesenquimales de la medula hacia líneas osteogénicas [334] e inhibir la osteoclastogénesis [330,331]. Participa también en el entrecruzamiento de las fibras de colágeno del hueso [332,333]. La carencia de cobre da lugar a enfermedades como la anemia, neutropenia, osteopenia y fracturas patológicas del hueso [326].

Como ya se ha mencionado, el cobre funciona como un fuerte inductor de la angiogénesis, pues por medio de la estabilización del factor 1 α inducible por hipoxia (HIF-1α) y la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial (VEGF) se produce un aumento del desarrollo y formación de vasos sanguíneos [327–329]. Por último, es necesario mencionar la actividad antibacteriana de los cationes Cu^{2+}. Dichos cationes actúan a través de distintos mecanismos, uniéndose a los peptidoglicanos cargados positivamente y endureciendo la pared bacteriana [343,344], formando radicales hidroxilos reactivos [345], provocando la fuga de iones del interior de la bacteria [347] y la desnaturalización de aminoácidos y proteasas que conduce a la muerte bacteriana [347,348].

Se diseñaron MBGs con porcentajes atómicos crecientes de CuO. Para este fin, se tomó como partida la metodología modificada descrita por Cicuendez *et al.* [391] para el desarrollo de MBG. Dado que en la bibliografía se ha reportado el empleo tanto del HCl [211,352,408] como de HNO_3 [409–411] como catalizador en la síntesis de MBG, se estudió su influencia en las propiedades texturales como bioactivas de los materiales sintetizados, de esta forma se sintetizaron dos familias de materiales enriquecidos con cobre: Los obtenidos por la catálisis de la síntesis con HNO_3 y los nitratos de los precursores (Cu_HNO_3), así como los materiales obtenidos con HCl y los cloruros de los sus precursores (Cu_HCl).

III.1.3.2 Resumen

Para este trabajo se desarrollaron dos familias de MBGs basados en el empleo de nitratos (Cu_HNO_3) y cloruros (Cu_HCl) tanto como catalizador como conjugado con los precursores de síntesis mediante el método de síntesis EISA [202] (**Tabla 7**). Estos materiales se desarrollaron dentro del sistema SiO_2─P_2O_5─CaO propuesto ampliamente por la bibliografía como el sistema óptimo para el desarrollo de materiales sustitutivos óseos.

Tabla 7. Nomenclatura y composición (%mol) de MBGs enriquecidos con cobre, empleando distintos catalizadores.

Nomenclatura	Catalizador	Composición (% mol)
0% Cu_HNO_3	HNO_3	85SiO_2─5P_2O_5─10CaO
2.5% Cu_HNO_3		82.5SiO_2─5P_2O_5─10CaO─**2.5CuO**
5% Cu_HNO_3		80SiO_2─5P_2O_5─10CaO─**5CuO**
0% Cu_HCl	HCl	85SiO_2─5P_2O_5─10CaO
2.5% Cu_HCl		82.5SiO_2─5P_2O_5─10CaO─**2.5CuO**
5% Cu_HCl		80SiO_2─5P_2O_5─10CaO─**5CuO**

Ambas familias de MBG presentaron un elevado orden mesoporoso como se pudo observar al TEM. Además, se pudo observar la aparición de nanopartículas en ambas familias de materiales. Para la familia HNO_3 se observaron nanopartículas solamente en aquellas composiciones enriquecidas con

cobre, lo que en los ensayos de RMN se indicaría como nanopartículas de cobre metálico. Mientras que en la familia HCl, se obtuvieron pequeñas nanopartículas en todas las composiciones muy semejantes a las obtenidas por Cicuendez *et al*. [391] e independientemente del porcentaje atómico de cobre de la muestra, lo que sería un indicio de nanopartículas fosfato de calcio.

Las dos familias de materiales presentaron excelentes propiedades texturales, observándose un ligero incremento de dichas propiedades para la familia Cu_HCl, presentado, mayor orden mesoporoso, superficie específica, volumen de poro y diámetro de poro que la familia Cu_HNO_3. Todas las composiciones presentaron isotermas tipo IV, propios de materiales mesoporosos. Se obtuvieron ciclos de histéresis tipo H2, característicos de poros con forma de tintero, para todas las muestras salvo para 2.5 y 5% Cu_HNO_3. Para dichas composiciones se obtuvo ciclos tipo H1 característico de materiales con poros cilíndricos.

Los resultados obtenidos por RMN ^{29}Si indicaron que la familia Cu_HCl presentaba un grado de conectividad superior que la obtenida por Cu_HNO_3 lo que se en propiedades texturales superiores, un dato que ya se podía presuponer de los resultados obtenidos por adsorción de nitrógeno. En ambas familias la inclusión del cobre daba lugar a una ligera pérdida de la interconectividad de la red de sílice a medida que el porcentaje atómico de cobre integrado fue superior.

Por otra parte, los resultados de RMN ^{31}P demostraron como la integración de mayor porcentaje atómico del cobre producía un aumento de la participación del fósforo como formador de red para la familia Cu_HNO_3, mientras que para la Cu_HCl ocurría lo opuesto. Esto puede deberse a que en la familia Cu_HNO_3, el cobre se integre formando nanopartículas metálicas que impiden la formación de clusters de grupos ortofosfato y, a su vez, favorezcan que el fósforo participe activamente como formador de red. Mientras que en la familia Cu_HCl, vemos que la integración del cobre redujo considerablemente la participación del fósforo como formador de red, lo que significa que se favoreció la formación de clusters de grupos ortofosfato o bien fosfato de cobre, como se pudo observar en las imágenes del TEM. Estos resultados revelaron como el cobre presenta un comportamiento dual en función del catalizador que se emplee para su integración en la red de sílice, ya sea como nanopartículas de cobre metálico o probablemente, como fosfato de cobre (**Esquema 3**).

Para la realización de los ensayos de bioactividad y liberación de iones, todas las composiciones se conformaron en discos densos y se caracterizaron por adsorción de nitrógeno. Los resultados obtenidos fueron muy semejantes a los obtenidos por las mismas composiciones en polvo. Sin embargo, las composiciones de la familia Cu_HNO_3 sufrieron un descenso de aproximadamente un 17% en su superficie específica, mientras que la familia Cu_HCl, perdió un 3%.

Las composiciones conformadas en discos densos se sumergieron en SBF hasta 7 d, para evaluar su respuesta bioactiva. Resultados obtenidos por FTIR mostraron máximos entre el 600 y 570 cm^{-1} para las comisiones 2.5 y 5% Cu_$HNNO_3$ antes de sumergirlo en SBF indicando la formación de nanocristales de apatita desde su síntesis. Para el resto de las composiciones, incluidas las Cu_HCl, se obtuvieron dichos máximos tras sumergirlos en SBF durante 24 h. Sin embargo, solamente las composiciones 0% y 2.5% Cu_HNO_3 mostraron máximos a las 8 h, indicando su reactividad superior. Las imágenes

obtenidas por SEM confirmaron los resultados obtenidos por FTIR. Todas las composiciones a las 24 h mostraron una capa fosfato de calcio amorfo, indicativo de que el material posee una superficie reactiva. Dicha respuesta fue más adelantada para la familia Cu_HNO_3, pues se pudo observar la formación de nanocristales de apatita con forma de aguja.

Finalmente, todas las composiciones conformadas en disco se sumergieron en MEM y THB para estudiar la liberación de iones en un medio propicio para el cultivo de células de mamífero y bacterias respectivamente. Referente a la familia Cu_HNO_3, no se obtuvo diferencias significativas para las cantidades obtenidas de la liberación de iones Ca^{2+}y P en medio MEM, entre las distintas composiciones. Mientras que para la liberación de Ca^{2+} en THB, se obtuvo una mayor liberación de 0% Cu_HNO_3. Referente a los iones Cu^{2+}, se obtuvo una liberación doblemente superior para 5% Cu_HNO_3, frente a 2.5% Cu_HNO_3 en medio MEM. No obstante, ocurrió lo opuesto en medio THB, pues debido a los niveles más elevados de P en el medio se pudo producir la precipitación de fosfato de cobre. En ambos medios se alcanzó concentraciones de iones Ca^{2+} y Cu^{2+} terapéuticas en menos de 24 h.

Referente a la familia Cu_HCl, se observaron diferencias significativas entre las composiciones sin enriquecer y las enriquecidas con Cu^{2+} para las liberaciones de Ca^{2+} debido a las diferencias entre la interconectividad de la matriz de sílice como se demostró por RMN. En el caso de la liberación de Cu^{2+} se observó casi el doble de liberación de iones Cu^{2+} para la composición 5% Cu_HCl respecto a la 2.5% Cu_HCl.

En vista de los resultados obtenidos los autores concluyen que la serie Cu_HNO_3 es más adecuada para el propósito de la regeneración ósea y combatir una infección activa, debido a sus excelentes propiedades texturales, bioactividad y liberación de iones.

Microporous and Mesoporous Materials 308 (2020) 110454

Contents lists available at ScienceDirect

Microporous and Mesoporous Materials

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/micromeso

Development and evaluation of copper-containing mesoporous bioactive glasses for bone defects therapy

J. Jiménez-Holguín [a], S. Sánchez-Salcedo [a,b,**], M. Vallet-Regí [a,b], A.J. Salinas [a,b,*]

[a] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid 28040 Madrid Spain
[b] Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Mesoporous bioactive glasses
CuO
Mesostructure
In vitro bioactivity
Therapeutic ions release

ABSTRACT

Mesoporous bioactive glasses (MBGs) are gaining increasing interest in the design of new biomaterials for bone defects treatment. An important research trend to enhance their biological behavior is the inclusion of moderate amounts of oxides with therapeutical action such as CuO. MBGs with composition (85-x) SiO_2–10CaO–5P_2O_5–xCuO (x = 0, 2.5 or 5 mol-%) were synthesized, investigating the influence of the CuO content and some synthesis parameters in their properties. Two series were developed; first one used HCl as catalyst and chlorides as CaO and CuO precursors, second one, used HNO_3 and nitrates. MBGs of chlorides family exhibited calcium/copper phosphate nanoparticles between 10 and 20 nm in size. Nevertheless, CuO-containing MBGs of nitrates family showed metallic copper nanoparticles larger than 50 nm as well as quicker in vitro bioactive responses. Thus, MBGs of the nitrate series were coated by an apatite-like layer after 24 h soaked in simulated body fluid (SBF) a remarkably short period for a MBG containing 5% of CuO. A model, focused in the location of copper in the glass network, was proposed to relate nanostructure and in vitro behaviour. Moreover, after 24 h soaked in MEM or THB culture media, all the MBGs released therapeutic amounts of Ca^{2+} and Cu^{2+} ions. Because the quick bioactive response in SBF, the capacity to host biomolecules in their pores and to release therapeutic concentrations of Ca^{2+} and Cu^{2+} ions, MBGs of the nitrate families are proposed as excellent biomaterials for bone regeneration.

1. Introduction

Mesoporous bioactive glasses, MBGs, of the SiO_2–CaO–P_2O_5 system are being widely investigated for bone diseases therapy, due to their amazing properties including ordered mesopores arrangements, narrow pore size distribution and huge surface areas and pore volumes [1–3]. MBGs belong to the family of bioactive glasses that have attracted much attention because of their capability to bond with bone and to stimulate osteogenesis and angiogenesis [4–7]. The reactivity of bioactive glasses in the biological environment begins with the ionic interchange of ions in the glass and protons from medium. A silica-rich layer is formed in the glass surface that attracts Ca^{2+} and P(V) ions from medium producing an amorphous calcium phosphate layer that, after crystallizing into bone-like carbonate apatite, plays an important role in the bond of bioactive glasses to bone [8]. These physical-chemical processes are speeded by the huge textural properties of MBGs. Moreover, these glasses are able to host molecules with biological activity inside their mesopores.

In the last years, several strategies were proposed to improve MBGs by loading with small biomolecules and drugs and/or oxides of chemical elements with biological activities such as copper [9–12]. It must be considered that copper is an essential trace element that account between 1.5 and 2.1 mg per kg of human body [13]. Many studies demonstrated that copper lack produces a loss of bone mineral density [14,15]. This was explained by the loss of activity of Cu-containing enzymes, like superoxide dismutase with antioxidant properties or lysyl oxidase, involved in the collagen cross-linking during the bone formation [16,17]. Furthermore, it is known the role of copper mimicking a hypoxia situation by stabilizing hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) expression. This situation increases the transcription

* Corresponding author. Dpt. Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, UCM, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, imas12, 28040, Madrid, Spain.
** Corresponding author. Dpt. Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, UCM, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, imas12, 28040, Madrid, Spain.
E-mail addresses: sansanch@ucm.es (S. Sánchez-Salcedo), salinas@ucm.es (A.J. Salinas).

https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110454
Received 26 March 2020; Received in revised form 7 June 2020; Accepted 29 June 2020
Available online 14 July 2020
1387-1811/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

of hypoxia sensitive genes, like vascular endothelial growth factor (VEGF) the proliferation of endothelial cells and the recruitment and differentiation of mesenchymal cells [18–22]. In addition, copper shows antibacterial behaviour against *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* [23–25], and antiviral activity against norovirus [26] and influenza A virus [27].

A recent paper of Romero-Sanchez et al. reported the in vitro and in vivo angiogenic capability of SiO_2–CaO–P_2O_5 MBGs before and after doping with 5% of CuO [28]. On the other hand, in a previous article of our group, the synthesis conditions were adjusted to obtain copper-free MBGs composites showing nanometric calcium phosphate nuclei in the glass walls [29]. These nanocomposites maintained the structural properties of MBGs with enhanced in vitro reactivity in simulated body fluid, SBF due to the presence of mentioned apatite-like nuclei. The presence of the new-formed nanoapatite layer was detected after 24 h of immersion.

The starting point of the present study was to obtain MBGs with enhanced biological properties by the inclusion in their composition of 2.5 or 5 mol-% of CuO. Nevertheless, our previous studies demonstrated that the inclusion of a fourth oxide in ternary SiO_2–CaO–P_2O_5 MBGs produced a decrease in the in vitro bioactive response in SBF [30]. For this reason, a revision and reinvention of the method of synthesis used by Cicuendez et al. for copper-free MBGs [29] was here proposed for the synthesis of SiO_2–CaO–P_2O_5–CuO MBGs. Cicuendez et al. used hydrochloric acid and the chloride precursors of CaO for the synthesis of the nanocomposites because of the easy removal of chloride anions by calcination. Accordingly, we investigated a family of CuO-MBGs, synthesized in the presence of hydrochloric acid and chlorides (Cu_HCl). However, most research groups more often use nitric acid and nitrates as sources for the MBGs syntheses [31–34]. Thus, another series of CuO-MBGs, was investigated employing nitric acid as catalyst and nitrates as CaO and CuO sources (Cu_HNO_3).

In this study, two families of MBGs, Cu_HCl and Cu_HNO_3, containing 0, 2.5 or 5 mol-% of CuO will be investigated. A detailed study of the MBGs nanostructure and also the in vitro behavior in SBF and in frequent culture media of cells and bacteria will be carried out. Our goal will be to relate the in vitro behavior of MBGs with their nanostructure and to determine if some of the MBGs designed could be of interest as bone substitute.

2. Experimental

2.1. Synthesis of the mesoporous bioactive glasses

Two families of MBGs with composition (85-x) SiO_2–CaO–P_2O_5–$xCuO$, (x = 0, 2.5 and 5) were synthesized by the Evaporation-Induced Self Assembly (EISA) method. First series, used HNO_3 1 M as catalyst and $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ and $Cu(NO_3)_2 \cdot 2.5H_2O$ as CaO and CuO sources. Second one was obtained using HCl 1 M, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ and $CuCl_2$ as catalyst and sources of CaO and CuO. In all cases SiO_2 and P_2O_5 sources were tetraethyl orthosilicate (TEOS) and triethyl phosphate (TEP), respectively. In brief, the synthesis was performed by mixing Pluronic® F127, ethanol (99.98%), distilled water and HNO_3 or HCl, in a flask that was covered with Parafilm® and kept 1 h under stirring. (Reactants were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The corresponding amounts of reactants were added in the sequence indicated in Table 1 with 60 min intervals. The mixture was kept 14 h at 40 °C under stirring. Then, the mixture was poured in open Petri dishes (27 mL/plate) and kept 4 d at 30 °C in a stove to evaporate water and ethanol formed in the hydrolysis of the alkoxides. Along this process the critical micellar concentration, cmc, of surfactant was reached which yield the formation of mesophases that guided the formation of an ordered mesostructure during the silica condensation. After that, the total drying produced dried gels precursors of the MBGs. Finally, MBGs as powders were obtained by heating the dried gels for 6 h at 700 °C (heating ramp of 1 °C/min) to remove the surfactant contained into the mesopores and grinding and sieving the resultant materials with a 40 μm mesh. The in vitro studies were performed in disks, 10 mm diameter, 1 mm height, obtained compacting 100 mg of MBG powders in a mould with 5 MPa of uniaxial pressure for 1 min.

2.2. Physicochemical characterization of samples

Samples were characterized by Small-Angle X-ray diffraction, SA-XRD, in a X'pert-MPD system (Eindhoven, The Netherlands) equipped with Cu Kα radiation in the 0.6 to 8° 2θ range; Thermogravimetric and Differential Thermal analysis (TG/DTA) in the 30 °C to 900 °C interval (air flow: 100 mL/min) in a Perkin Elmer Pyris Diamond system (Waltham, MA, USA), Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy in a Thermo Scientific Nicolet iS10 apparatus (Waltham, MA, USA) equipped with a SMART Golden Gate attenuated total reflection ATR diffuse reflectance accessory and Transmission Electron Microscopy (TEM), in a JEM-2100 JEOL microscope operating at 200 kV (Tokyo, Japan). For TEM analysis, samples were dispersed in ethanol, sonicated and deposited in a nickel grid coated with a holed polyvinyl-formaldehyde layer. Moreover, materials were characterized by nitrogen porosimetry using Micromeritics 3 Flex (Norcross, GA, USA). For these measurements, the samples were previously degassed 24 h at 120 °C under vacuum. Surface area, S_{BET}, was calculated by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method [35], and pore size distributions by the Barret–Joyner–Halenda (BJH) method [36]. Finally, MBG samples were analyzed by ^{29}Si and ^{31}P solid state single pulse magic angle spinning nuclear magnetic resonance (SP MAS-NMR) on a Bruker Avance AV-400WB spectrometer (Karlsruhe, Germany) equipped with a 4 mm zirconia rotor. Frequencies were set at 79.49 and 161.97 MHz for ^{29}Si and ^{31}P respectively and chemical shift values were referenced to tetramethylsilane, for ^{29}Si, and H_3PO_4, for ^{31}P. Time period between accumulations were 5 s, for ^{29}Si and 4 s, for ^{31}P, and the number of scans was 10,000. MNR spectra were fitted with OriginLab 7.0 software (OriginLab Corporation, MA, USA). The quality of spectra fitting was checked by comparing the concordance of experimental and calculated spectra.

2.3. In vitro studies in acellular solutions

The reactivity of MBGs was assessed under in vitro conditions in SBF to evaluate the in vitro bioactivity and in culture media of cells or

Table 1
Amounts of reactants used in the synthesis of MBG series (F127: Pluronic® F127; Et–OH: ethanol; TEOS: tetraethyl orthosilicate, TEP: triethyl phosphate).

Sample	F127 (g)	Et–OH (mL)	H_2O (mL)	HNO_3 1 M (mL)	HCl 1 M (mL)	TEOS (mL)	TEP (mL)	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (g)	$Cu(NO3)_2 \cdot 2.5H_2O$ (g)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (g)	$CuCl_2$ (g)
0% Cu_HNO_3	6.5	56.2	6.46	5.45	□	12.4	1.12	1.56	0	□	□
2.5% Cu_HNO_3	6.5	56.2	6.46	5.45	□	12.2	1.12	1.56	0.384	□	□
5% Cu_HNO_3	6.5	56.2	6.46	5.45	□	11.9	1.12	1.56	0.768	□	□
0% Cu_HCl	6.5	56.2	6.46	□	4.26	12.4	1.07	□	□	0.822	0
2.5% Cu_HCl	6.5	56.2	6.46	□	4.26	11.7	1.07	□	□	0.822	0.212
5% Cu_HCl	6.5	56.2	6.46	□	4.26	11.4	1.07	□	□	0.822	0.425

bacteria to quantify the amount of inorganic ions released to medium.

2.3.1. Assays in SBF

The surface reactivity of the samples was assessed by following the formation of an apatite-like layer on the MBG disks surface after being immersed in SBF [37]. MBG disks were sterilized with 20 min of UV radiation (10 min/face) in a laminar flux cabinet and the SBF solution was filtered with a 0.22 μm filter to avoid bacterial contaminations. MBG disks were soaked for 8 h, 24 h, 3 d and 7 d in 30 mL of SBF at 37 °C and a pH of 7.4. SBF volume was the one fulfilling with the proportion $V_S = D_S/0.075$ (V_s the SBF volume in mL and D_S the geometric external area in cm^2 of the item investigated) that we always maintain constant in our studies [31]. Inside the assay container, the disks were maintained in a vertical position with a support constructed with platinum wire. Assays were performed with two replicas by time and a material-free container only with SBF that was used as control.

Apatite-like phase formation was assessed by wide angle XRD (WA-XRD, 2θ from 10 to 70°), FTIR spectroscopy and scanning electron microscopy and (SEM) in a JSM-7600F JEOL microscope (JEOL, Tokyo, Japan) coupled with an energy dispersive X ray spectroscopy (EDS) system (Oxford Instruments, Abingdom, UK).

2.3.2. Ions release from disks

Assays were performed by soaking the MBG disks in 2 mL of Eagle's minimal essential medium, MEM, with 0.5% of penicillin-streptomycin and, in parallel, in 2 mL of Todd Hewitt Broth, THB, (both from Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA). These studies allowed exploring the ion release in a mammal cell culture medium, MEM, and in a bacterial culture medium, THB. Samples were collected at 8 h and 1, 2, 3, 4, 5 and 6 d. The accumulative concentration of Ca^{2+}, P(V) and Cu^{2+} in both medium was determined by inductively coupled plasma/optical spectrometry (ICP/OES) using an OPTIMA 3300 DV device (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Two replicas were used of each composition. Three measures were taken of each replica to do statistical analysis.

2.3.3. Statistical analysisStatistical analysis

Results were evaluated with nonparametric Kruskal-Wallis test and post-hoc Dunn's test. A probability value, p-value < 0.05 was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Glass powders characterization

MBG powders were characterized by TEM and SA-XRD to determine their nanostructure and check if the mesoporous structure was formed and by nitrogen adsorption to determine the textural properties. Moreover, they were characterized by EDS and by FTIR spectroscopy to determine the composition and confirm the complete removal of surfactant and other impurities during the calcination. Finally, ^{29}Si and ^{31}P NMR spectroscopy allowed the characterization of these species at atomic level which will allow understanding the glasses reactivity in aqueous solutions.

Fig. 1 depicts the TEM images and EDS spectra of the MBGs investigated. All the micrographs show the presence of ordered mesoporosity. It is remarkable to mention that whereas Cu_HNO_3 MBGs show highly ordered arrangements of mesoporous channels, Cu_HCl MBGs exhibit smaller mesopores order and the presence of curved channels. Furthermore, both series showed the presence of pseudo-spherical nanospheres that were of different size for each family. Thus, Cu_HCl MBGs exhibited abundant nanoparticles under 20 nm with composition calcium, phosphorous and oxygen, similar to the apatite nanoparticles described by our group in CuO-free MBGs [29]. However, in Cu_HNO_3 MBGs, fewer amount of nanoparticles but bigger in size was detected. More than 30 nanoparticles were measured in each case obtaining sizes of 59 ± 13 and 77 ± 36 nm for the samples containing respectively 2.5% and 5% of CuO. Table 2 shows the MBGs composition determined by EDS. A quite good agreement between the experimental values and the expected ones, considering the amounts of reactants used in the MBGs

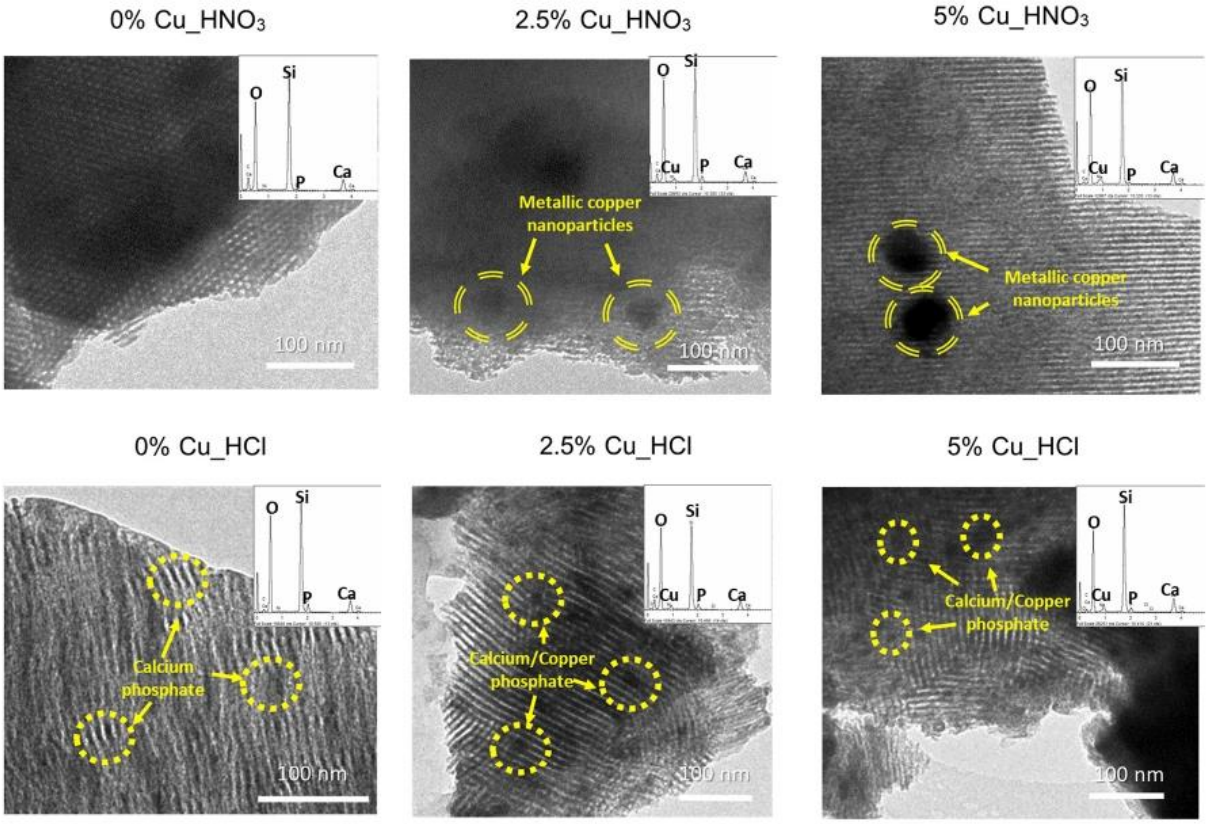


Fig. 1. TEM images of the two series of MBGs enriched with 0, 2.5 and 5% of CuO synthetized by using HNO_3/nitrate or HCl/chloride. Highlighted with striped circles the metallic copper nanoparticles and with dotted circles those of calcium/copper phosphate. Each image includes in the up right corner their EDS espectrum.

Table 2
Textural parameters of MBGs as powders and after being processed into disks (S_{BET}: BET surface area, V_p: pore volume and D_p pore diameter). MBGs composition (atom-%) determined by EDS is also included. Standard deviations were omitted for simplification, but they were for all the values inferior to 7%.

Sample	Powders			Disks			Composition (atomic-%)			
	S_{BET} (m^2g^{-1})	V_p (cm^3g^{-1})	D_p (nm)	S_{BET} (m^2g^{-1})	V_p (cm^3g^{-1})	D_p (nm)	Si	P	Ca	Cu
0% Cu_HNO_3	301	0.41	6.7	261	0.35	6.7	89.6	2.2	8.2	0
2.5% Cu_HNO_3	275	0.38	6.2	228	0.31	6.2	85.8	4.4	7.2	2.7
5% Cu_HNO_3	261	0.35	6.1	216	0.28	6.2	82.3	2.4	8.3	5.3
0% Cu_HCl	218	0.40	8.8	211	0.38	8.8	85.4	7.1	7.5	0
2.5% Cu_HCl	295	0.46	8.4	288	0.44	8.8	80.6	10.2	7.6	1.6
5% Cu_HCl	290	0.47	8.8	282	0.45	8.9	80.7	8.4	8.6	2.4

Table 3
Position of the sharp (10) maxima observed in the SA-XRD patterns of MBGs. In each case, the interplanar spacing (d) and the calculated unit cell parameter (a_o) are also included.

Sample	(10) maximum (θ)	Interplanar spacing d(10) (nm)	a_0 (nm)
0% Cu_HNO_3	0.98	9.0	10.4
2.5% Cu_HNO_3	0.98	9.0	10.4
5% Cu_HNO_3	1.04	8.5	9.8
0% Cu_HCl	0.88	10.0	11.6
2.5% Cu_HCl	0.86	10.3	11.9
5% Cu_HCl	0.88	10.0	10.0

syntheses, was observed.

Fig. 2A and 2A' includes SA-XRD diffraction patterns of MBGs. As observed, both series of materials exhibited a sharp maximum at around 1.0° in 2Θ, typical of mesoporous order, that was assigned to the (10) reflection of a 2D p6mm hexagonal phase (Table 3). In addition, in Cu_HCl MBGs it can be observed a shoulder at around 1.5° in 2Θ that was assigned to the (10), (20) reflections [30]. Nevertheless, in Cu_HNO_3 family (10) and (20) reflections were less defined, suggesting lower mesoporous order for these samples. SA-XRD results agree with those observed by TEM showing that Cu_HCl samples exhibited higher mesoporous order than Cu_HNO_3 ones.

Fig. 2B and 2B′ show the nitrogen adsoption/desorption isotherms of MBG powders. As observed, in all cases they are type IV that is characteristic of mesoporous materials. However two different hysteresis cycles were observed. Thus, MBGs of Cu_HNO_3 family with 2.5% and 5% of CuO exhibited type H1 cycle of hysteresis, characteristic of materials with cylindrical pore channels. In contrast, the CuO-free glass of the nitrate series and all the Cu_HCl glasses showed a cycle of hysteresis type H2 that is related with materials exhibiting pores with bottleneck shape [38]. In addition, Fig. 2C and 2C' showed pore diameter distribution of MBGs, centred in 6–6.5 nm for Cu_HNO_3 MBGs and in 8.5–9 nm for Cu_HCl MBGs.

Table 2 displays the textural properties of MBGs as powders and after be conformed into disks. As is observed, in CuO-free samples (0% Cu_HCl and 0% Cu_HNO_3), S_{BET} values were somewhat greater for the MBG of the nitrate family, but in CuO-containing MBGs the chloride samples showed higher S_{BET} values. If we focus in Cu_HNO_3 family, S_{BET} decreased from 301 to 261 m^2/g and pore volume from 0.41 to 0.35 cm^3/g when CuO increased from 0% to 5%. These results agree with

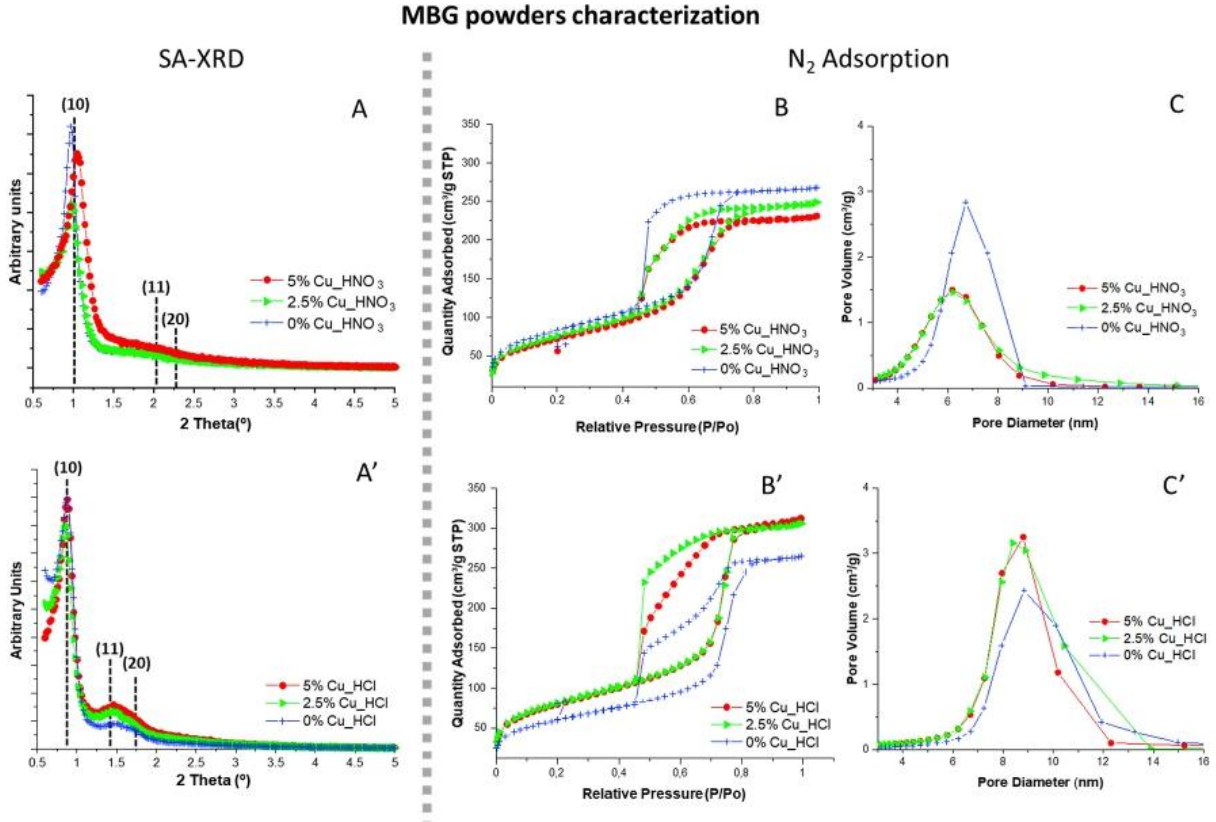


Fig. 2. Left, SA-XRD patterns of MBGs synthesized in the presence of HNO_3/nitrate or HCl/chloride (A, A′). Right, N_2-adsorption results showing the isotherms (B, B′) and pore size distributions (C, C′) of both MBG series.

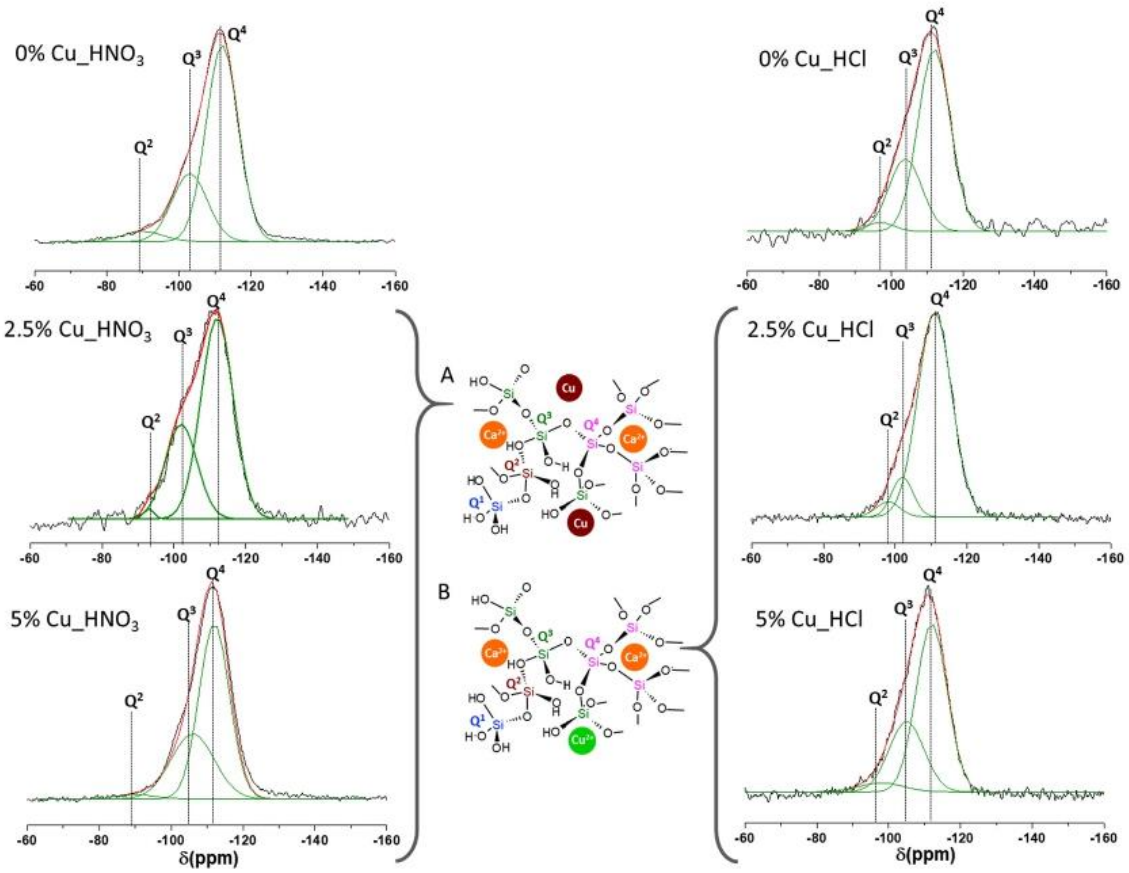


Fig. 3. Solid-state ^{29}Si single-pulse MAS-NMR spectra of MBGs. Q^2, Q^3 and Q^4, obtained by Gaussian line-shape deconvolution, are displayed in green. Left: nitrate series. Right: chloride series. Two models showing the copper location in the glass network were proposed. (A) Nitrate MBGs. (B) Chloride MBGs. The outstanding concordance of calculated (in red) and experimental (in black) spectra confirms the goodness of the fitting. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

reported for the copper addition to other MBG compositions [28,39–41]. Besides, pore diameter of Cu_HNO_3 samples slightly decreased from 6.7 to 6.1 nm when the CuO content increased. This was explained considering the segregation of the large metallic copper nanoparticles in this series which could hinder the mesopores structural order.

However, in Cu_HCl glasses when CuO increased from 0% to 5%, S_{BET} increased from 218 to 295 m^2/g and pore volume from 0.40 to 0.47 cm^3/g. This effect was explained considering that the formation of the numerous calcium/copper phosphate smaller nanoparticles decreased the proportion of network modifiers (Ca^{2+} and Cu^{2+}) in the MBG structure increasing the participation of the glass network forming (SiO_2) and therefore increases the order in the structure. Nevertheless, all Cu_HCl samples exhibited pore diameters around 8 nm, showing that CuO inclusions have not effects on the pore diameter of this family of MBGs. In summary, nitrogen adsorption results suggested that copper exerts a different effect in the textural properties of MBG depending on the catalyst and precursors used for the synthesis.

On the other hand, ^{29}Si and ^{31}P NMR measurements were carried out to investigate the environments at the atomic level of the network formers in the MBGs. Fig. 3 shows the ^{29}Si NMR spectra where Q^2, Q^3, and Q^4 represent three different environments of the silicon atom (Si*): $(NBO)_2Si^*–(OSi)_2$, $(NBO)Si^*–(OSi)_3$, and $Si^*(OSi)_4$ (NBO: non-bonding oxygen). Moreover, Table 4 includes the chemical shifts (CS), the area of the peaks, expressed as %, and the silica network connectivity $<Q^n>$ of each MBG. As is observed, the signals at −111 to −112 ppm were assigned to Q^4, at −102 to −106 ppm to Q^3 and at −95 to −98 ppm to Q^2 [42].

Fig. 4 shows the ^{31}P NMR spectra of MBGs, where Q^0 and Q^1 represent the phosphorus atom (P*) in the PO_4^{3-} species: $P^*–(NBO)_4$ and $(NBO)_3–P^*–(OP)$. The CS and the area of the peaks in % of P were also included in Table 4 where the intense signals in the range 1.8–2.2 ppm were assigned to the Q^0 environment typical of P in amorphous orthophosphate. For Cu_HNO_3 samples a second weak signal (Q^1), between −5.4 and −4.5 ppm, was observed which intensity increased as CuO in

Table 4
Chemical shifts (CS) and relative peak areas of MBGs obtained by ^{29}Si and ^{31}P NMR. For each MBG, the silica network connectivity $<Q^n>$ is also included.

Sample	^{29}Si							^{31}P			
	Q^4		Q^3		Q^2			Q^1		Q^0	
	CS ppm	Area[a] (%)	CS ppm	Area[a] (%)	CS ppm	Area[a] (%)	$<Q^n>$	CS ppm	Area[a] (%)	CS ppm	Area[a] (%)
0% Cu_HNO_3	−112	72.0	−103	27.5	−97	0.5	3.71	−4.5	10.4	2.1	89.5
2.5% Cu_HNO_3	−112	67.6	−102	31.2	−96	1.0	3.66	−4.5	19.4	1.9	80.6
5% Cu_HNO_3	−112	64.1	−106	33.9	−95	2.0	3.62	−5.4	21.2	2.2	78.8
0% Cu_HCl	−111	84.1	−102	12.0	−95	3.8	3.8	−8.5	29.9	1.8	70.0
2.5% Cu_HCl	−111	81.9	−102	12.7	−98	5.3	3.76	−2.1	8.3	1.9	91.7
5% Cu_HCl	−112	64.6	−105	30.4	−98	4.9	3.59	−2.1	9.6	1.9	90.4

[a] Areas of the Q^nunits were calculated by Gaussian deconvolution. The relative populations were expressed as %.

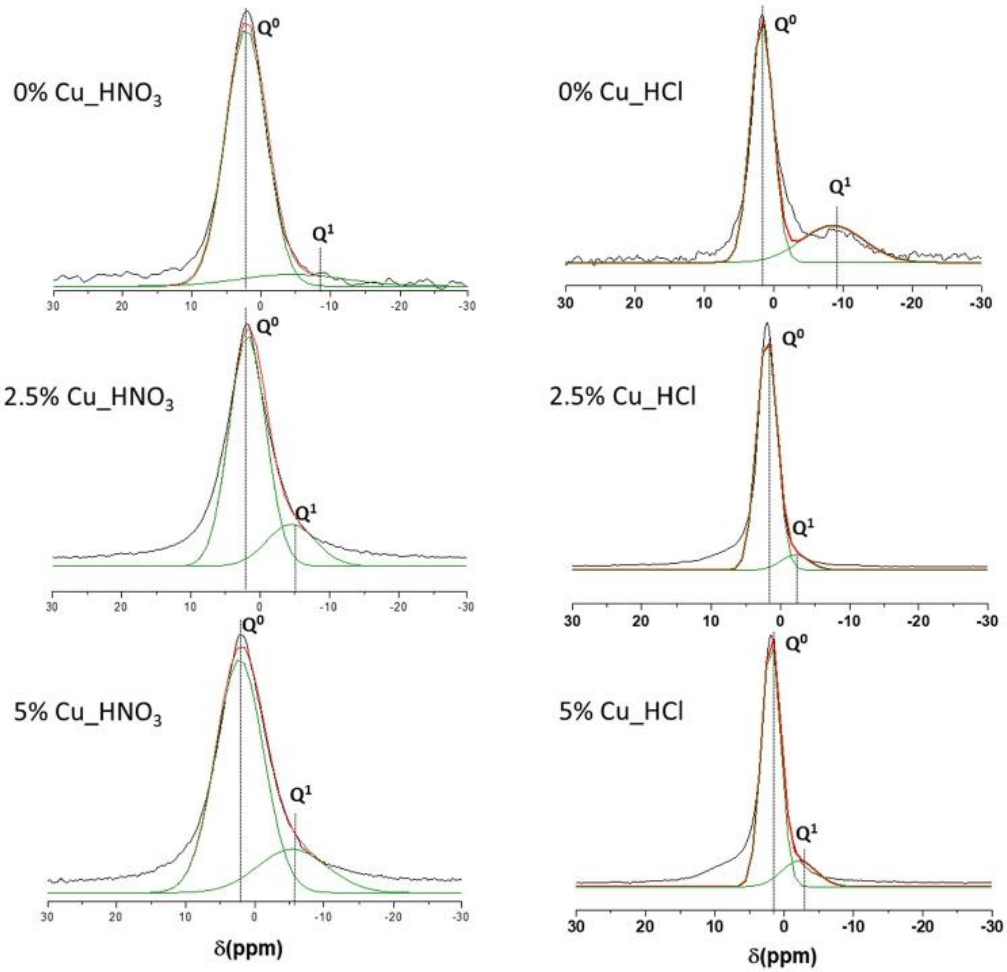


Fig. 4. Solid-state ^{31}P single-pulse MAS-NMR spectra of MBGs. Q^0 and Q^1, obtained by Gaussian line-shape deconvolution, are displayed in green. Left: Nitrate series. Right: Chloride series. The outstanding concordance of calculated (in red) and experimental (in black) spectra confirms the goodness of the fitting. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

the MBG increased. This second maximum that is in the Q^1 tetrahedra range could be assigned to P–O–Si environments as previously reported [42]. This effect could suppose an incorporation of phosphorous in the glass network and consequently a decrease of amorphous orthophosphate clusters favouring the formation of metallic copper nanoparticles observed by TEM (Fig. 1). The slight variation of the network connectivity when copper was added to nitrate MBGs demonstrated the segregation of Cu in metallic nanoparticles and no copper participation in the glass network.

In addition, the high values of Q^0 for Cu_HCl glasses, up to 91.7% and 90.4%, observed in Table 4, suggest that phosphorous would be mainly in these glasses as orthophosphate clusters decreasing the proportion of P–O–Si units. Besides, it is worthy to note that the introduction of copper in Cu_HCl samples caused a large decrease in the percentage of Q^1, from 29.9%, for CuO-free glass, to 8.3% and 9.1% respectively, for MBGs with 2.5 and 5% of CuO. This variation agrees with the decrease of the network connectivity when Cu^{2+} is incorporated to the glass structure [43], indicating that this ion act as a network modifier and favours the orthophosphate clusters formation that were observed by TEM (Fig. 1). Moreover, these results suggest that copper hinders phosphate groups to participate as network formers which will be affect the in vitro bioactive response of Cu_HCl MBGs.

Therefore, the differences observed in the Q^0-Q^1 balance of MBGs with 0% of CuO can be explained by the smaller integration of P in HNO_3 series in contrast to HCl series

As is observed in Table 2. HCl series showed nanoparticles of calcium phosphate in their structure as reported in analogous MBGs by Cicuéndez et al. [29]. On the other hand, copper behaves differently in each series, favouring the participation of P as network former in HNO_3 series, which accordingly exhibit higher Q^1 percentages. However, in HCl series phosphorus seems to participate in forming ortophosphate clusters which would agree with the higher values of Q^0 percentages in these MBGs.

3.2. Characterization of the MBG disks by nitrogen adsorption

Previous section describes the physical-chemical characterization of MBG powders. However, for the in vitro studies in SBF as well as in both MEM and THB culture media the powders were conformed into disks. In this section, the characterization of MBG disks by nitrogen adsorption is described to verify that the processing of powders did not modify significantly the textural properties. Fig. 5 shows the nitrogen adsorption/desorption isotherms and the pore diameter distributions of MBG disks. As is observed, the isotherms are analogous to those of MBG powders showed in Fig. 2. Moreover, Table 2 collects the textural parameters of both MBG powders and MBG disks. Values in Table 2 confirm that both series of MBG powders experience a small surface area decrease in their processing into disks, average 17% for Cu_HNO_3 glasses, and 3% for Cu_HCl samples. These decreases are consequence of the partial collapse of the pore structure of glasses due to the uniaxial pressure exerted to obtain the disks. However, the isotherms shape and the pore diameter size remain stable for both series of materials. Furthermore, S_{BET} and pore volume of MBG disks are in all cases much more than enough for the intended application of these materials in bone disease treatment.

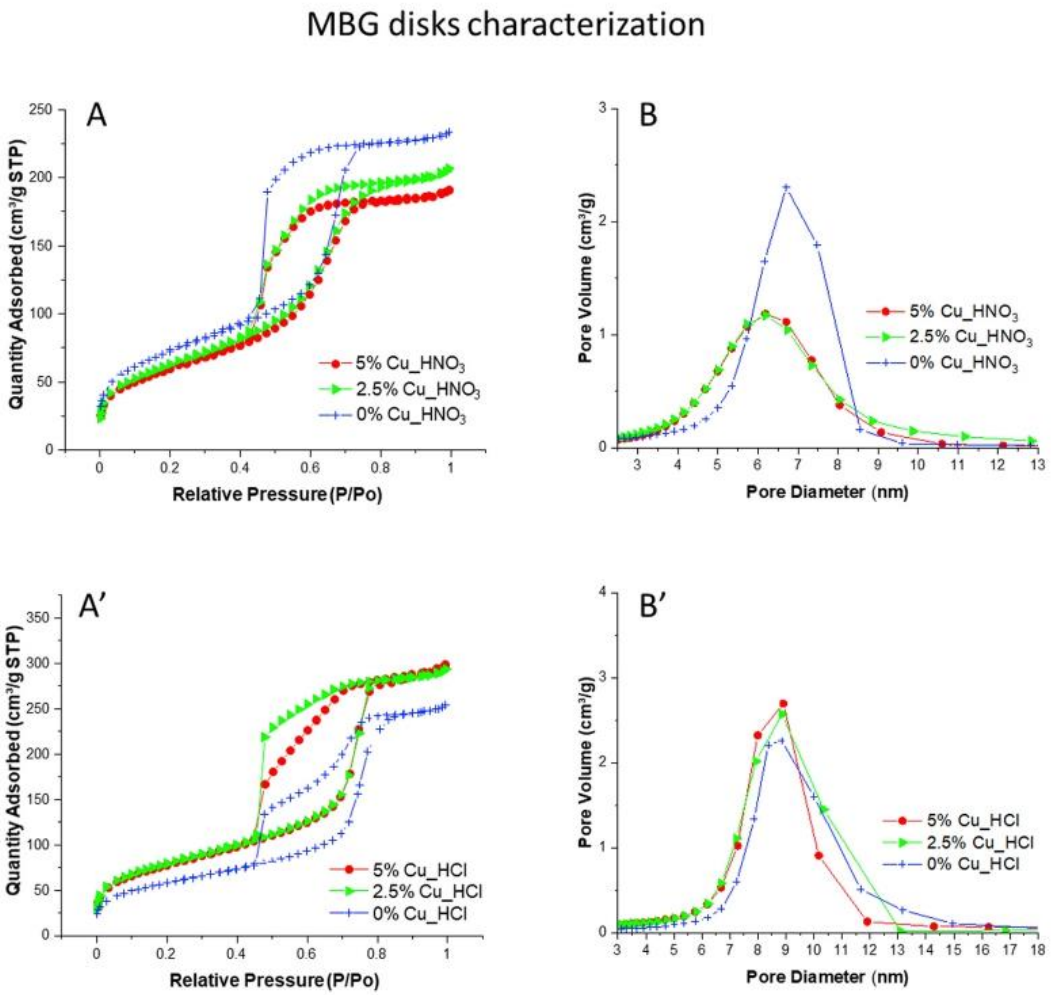


Fig. 5. N_2-adsorption results showing the isotherms (A, A′) and pore size distributions (B, B′) of nitrate and chloride MBGs after be compacted into disks.

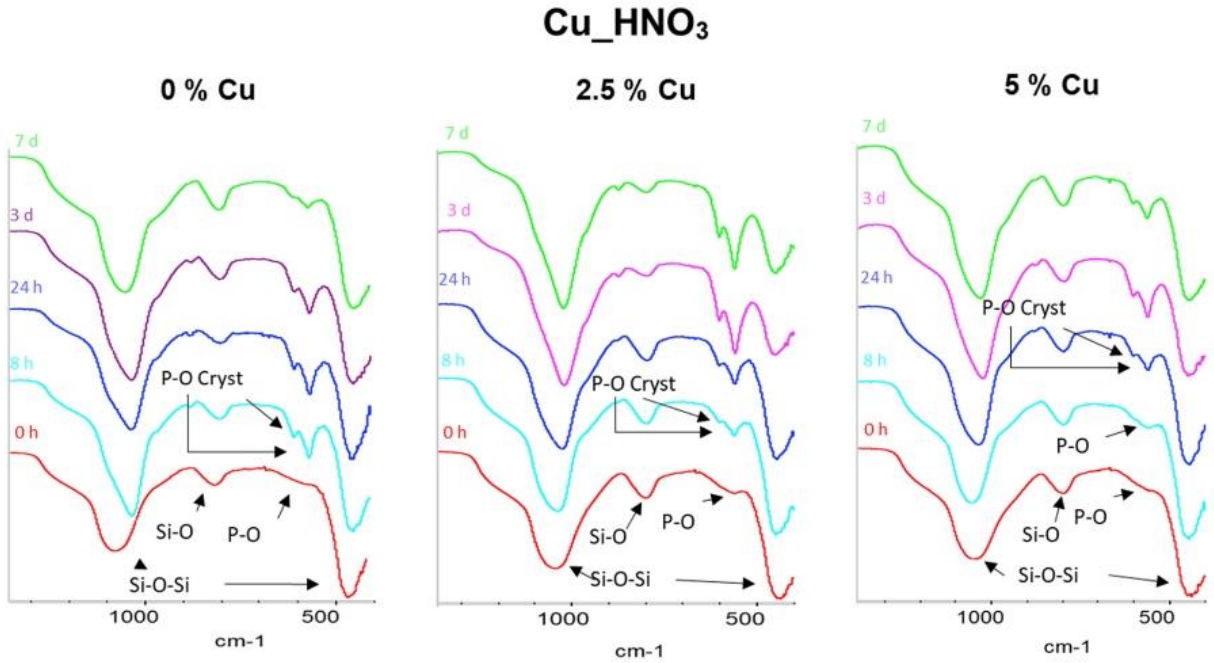


Fig. 6. FTIR spectra of nitrate series before and after 8 h, 24 h, 3 d and 7 d of immersion in SBF. Arrows highlight the most significant bands of Si–O and P–O in the spectra. Of interest are the bands of phosphate in a crystalline environment, labeled as P–O Cryst.

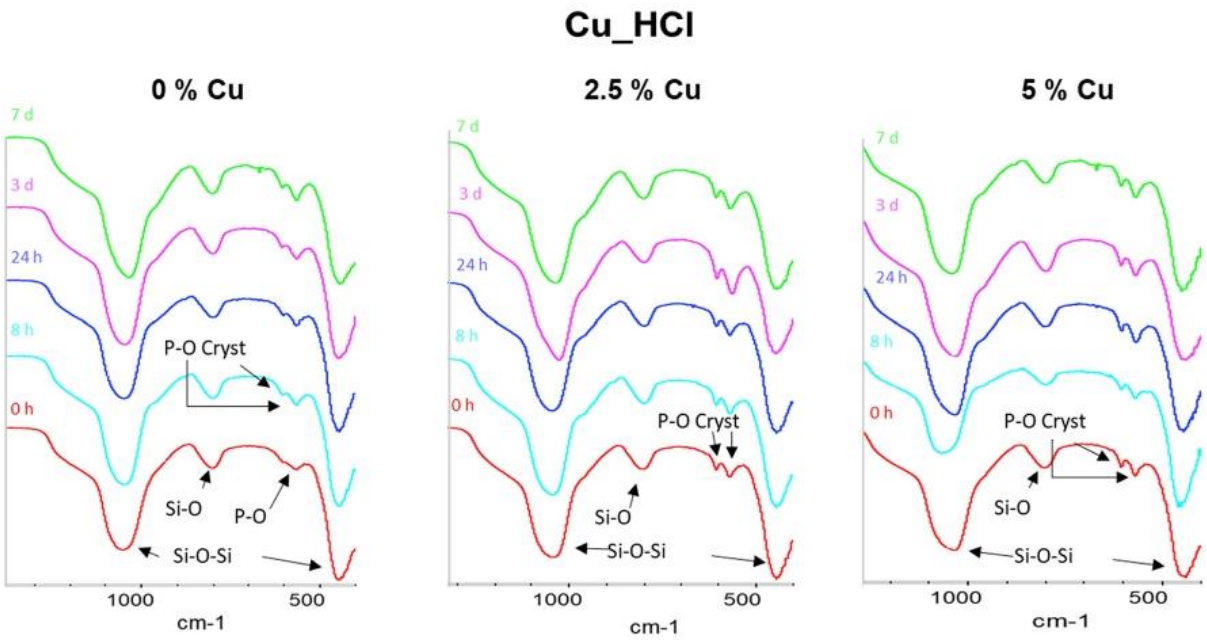


Fig. 7. FTIR spectra of chloride series before and after 8 h, 24 h, 3 d and 7 d of immersion in SBF. Arrows highlight the most significant bands of Si–O and P–O in the spectra. Of interest are the bands of phosphate in a crystalline environment, labeled as P–O Cryst.

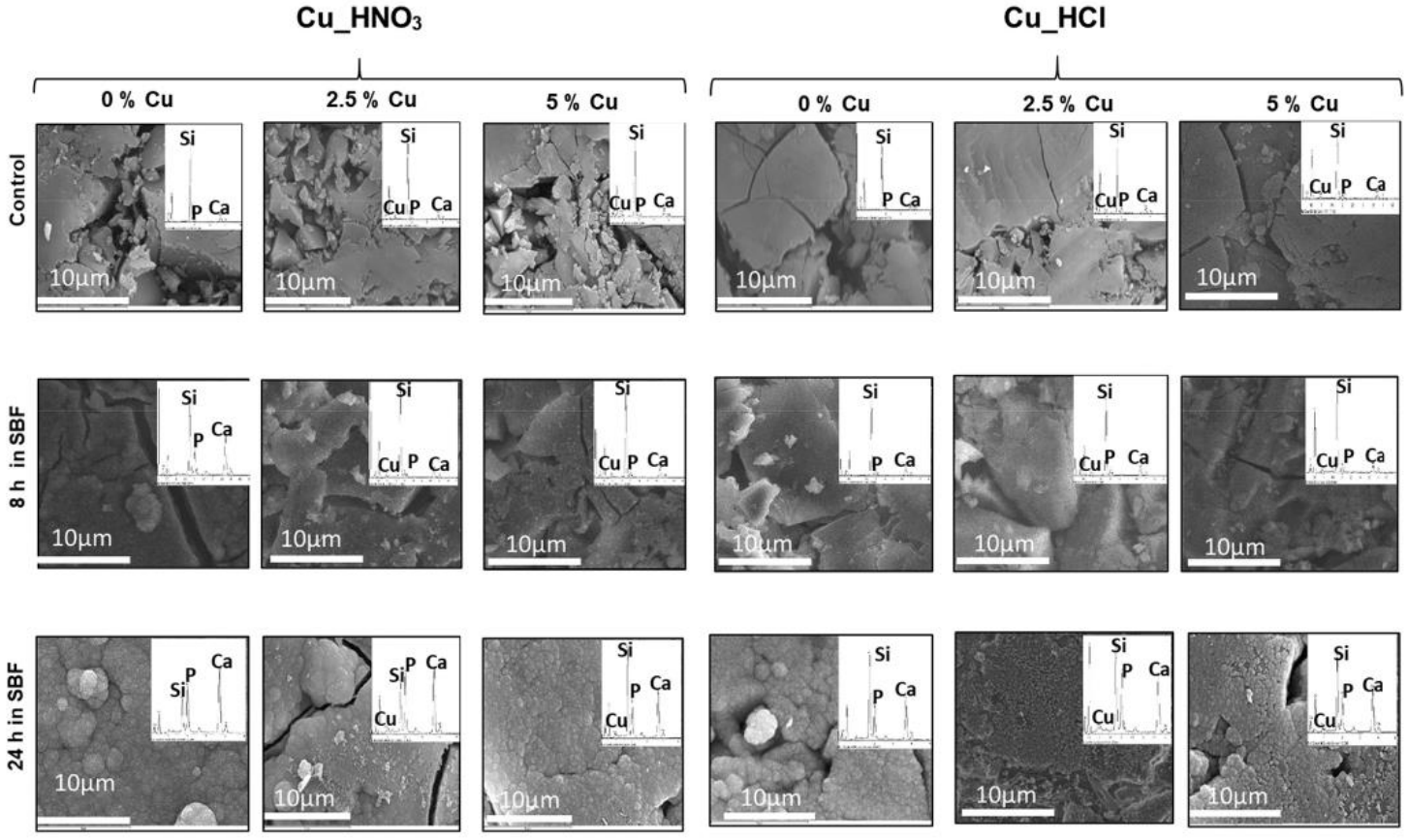


Fig. 8. SEM images of the disks surface before and after 8 and 24 h of immersion in SBF. Each image includes their respective EDS spectrum.

3.3. *In vitro bioactivity assays of the MBG disks in simulated body fluid*

Two disks of each MBG composition were soaked in SBF for 8 h, 24 h, 3 d and 7 d. Disks were analyzed by FTIR spectroscopy (Figs. 6 and 7) and SEM-EDS (Fig. 8) before and after be immersed in SBF. FTIR spectra of MBGs before soaking in SBF showed asymmetric bending vibration Si–O–Si bands at 1100-1040 cm^{-1} and 478-441 cm^{-1} and a band at 800-793 cm^{-1} of the symmetric Si–O stretch [31]. Moreover, the spectra of Cu_HNO_3 MBGs showed a very low intensity band at 590 cm^{-1} that was attributed to the presence to a phosphate phase with extremely small crystalline domain size, often denoted as amorphous calcium phosphate (a-CaP). However, the spectra of Cu_HCl samples exhibit in this region two small bands at about 600 and 570 cm^{-1} characteristic of phosphate in a crystalline environment. Such bands, visible before soaking the MBGs in SBF, were attributed by Cicuéndez et al. to the nanocrystalline apatite phases in their nanocomposites [29].

After soaking nitrate-based MBGs in SBF, bands at 600 and 570 cm^{-1} in the FTIR spectra were detected which intensity increased with soaking time. The presence of these bands of nanometric hydroxycarbonate apatite (n-HCA) in the assays in SBF is indicative of the in vitro bioactive response of a tested material [30]. After 8 h of soaking these bands were clearly visible in 0%Cu_HNO_3 and 2.5% Cu_HNO_3 spectra, although the intensity decreased when the CuO content increased. Thus, for 5% Cu_HNO_3, the mentioned bands were only visible after 24 h of assay in SBF. This delay in the n-HCA formation was explained considering that the high copper content in the MBG prevents a quicker bioactive response. The very short time for the in vitro bioactive response of the CuO-free glass is similar to reported by us and other research groups in equivalent ternary MBGs. However, 8 h to show in vitro bioactive response is a very short time for a MBG containing 2.5% of CuO.

On the other hand, MBG of the Cu_HCl series showed a more moderated in vitro bioactive response than Cu_HNO_3 glasses. However, all the glasses exhibited an in vitro bioactive response after 7 d or less in SBF. In some of the spectra of Cu_HCl MBGs after soaking in SBF is not clear about whether the two bands in this region come from the phosphate nuclei initially present in the MBG or of n-CHA formed after the in vitro bioactivity tests. Probably in several cases the bands observed are sum of the two types of bands mentioned. Therefore, another technique is necessary, i.e. SEM, which allowed checking in which cases the MBGs surface was coated by a newly formed material.

Fig. 8 shows the SEM images of MBG disks of the two series before and after soaking 8 and 24 h in SBF. For each sample, the corresponding EDS spectrum was also included, as well as the Ca/P molar ratio. The images of MGB disks before soaking show the bare surface of disks, where the grains of MBG powders used to obtain the disks are still visible. However, after 8 h of soaking, the surface of more reactive samples is coated by a newly formed layer, whereas the surface of other samples remained unchanged. At 24 h, all the disks are coated by a newly formed layer indicative of an in vitro bioactive response.

Several steps can be distinguished in the formation in SBF of the layer that is indicative of the in vitro bioactive response of a material. These steps are related with the in vivo mineralization process [44–46]. The process starts with the formation of a smooth layer of a-CaP coating the disks. The layer evolves into needle-like nanocrystals of n-CHA. Finally, the thickness of the layer increases until a certain maximum value. Checking in which phase is each sample at each time, comparative information between the bioactive responses of MBGs can be obtained.

Indeed, in the biomineralization process in the maturation of a-CaP to n-CHA an intermediate phase of octacalcium phosphate (OCP) is formed. OCP was only detected in vitro for MBG compositions of with an especially quick bioactive response. Detect OCP formation is a rather complex procedure that requires High Resolution TEM (HR-TEM) analysis. Once our group detected the in vitro formation of OCP in some MBGs, this was not a priority of this study. However, our experience allows predicting that, at least in the CuO-free MBG of nitrate series, OCP will be formed in the in vitro assays.

As is observed in Fig. 8, at 8 h the a-CaP layer was formed on 2.5% and 5%_HNO_3 samples. However, at this time the bioactive response 0% _HNO_3 was more advanced because the needle-like n-CHA layer was already formed. Regarding the Cu_HCl series, a-CaP formation was not observed at 8 h indicating the slower bioactive response of this series compared with nitrates one. However, a layer was present in the three cases after 24 h, again the CuO-free MBG was the one with a quicker bioactive response because the needle-like particles of n-CHA were observed.

After 24 h in SBF, surface of Cu_HNO_3 MBGs with 2.5% and 5% of CuO were coated with the thick n-CHA layer that was observed at 8 h for the CuO-free sample. Nevertheless, in the Cu_HCl series this thick layer

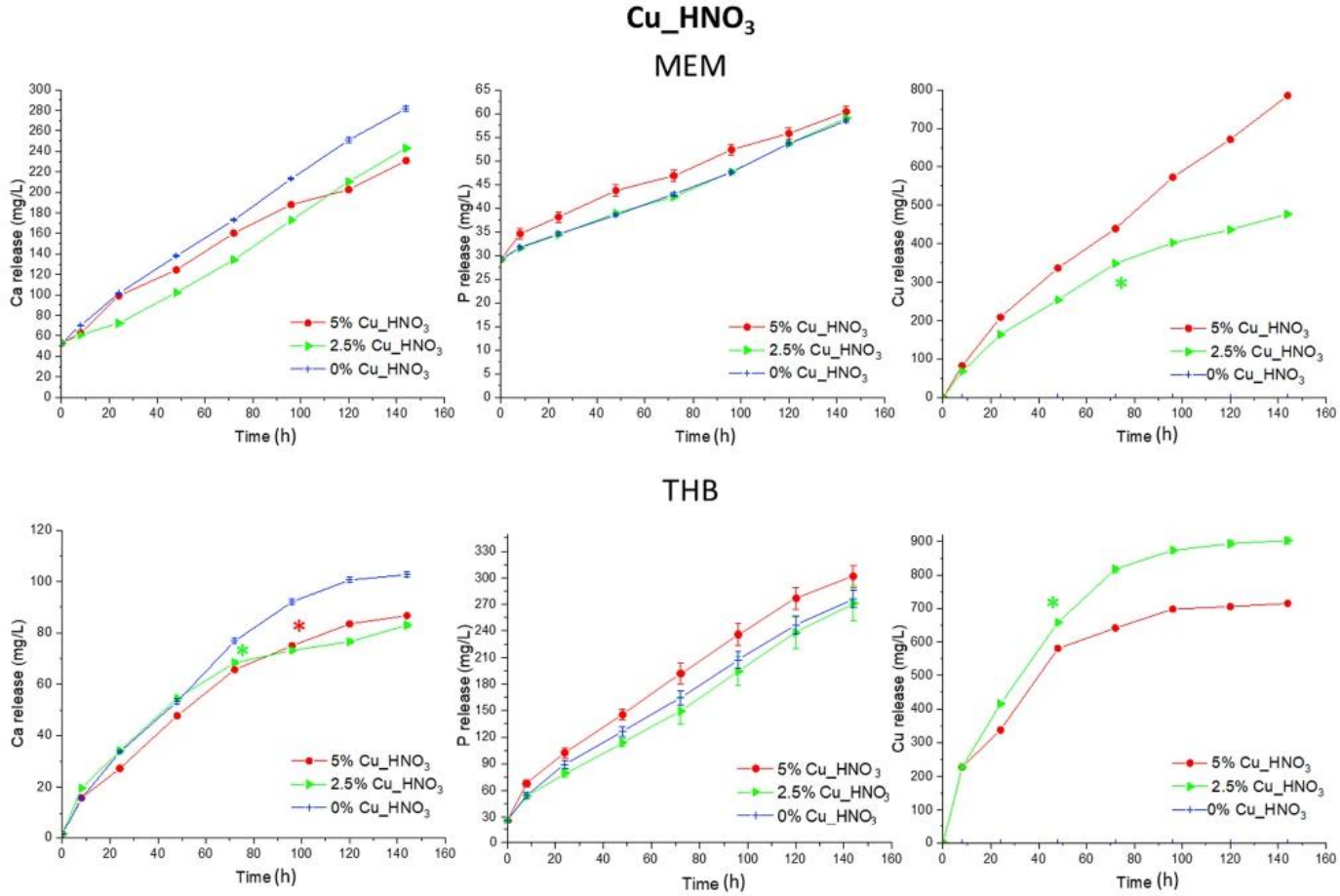


Fig. 9. Cumulative release of calcium, phosphorous and copper from nitrate series as a function of the time soaked in MEM and THB. The significant differences are marked with the symbol * in the time from which a p-value>0.05 was obtained with respect to the sample without copper, except for the measurement of copper.

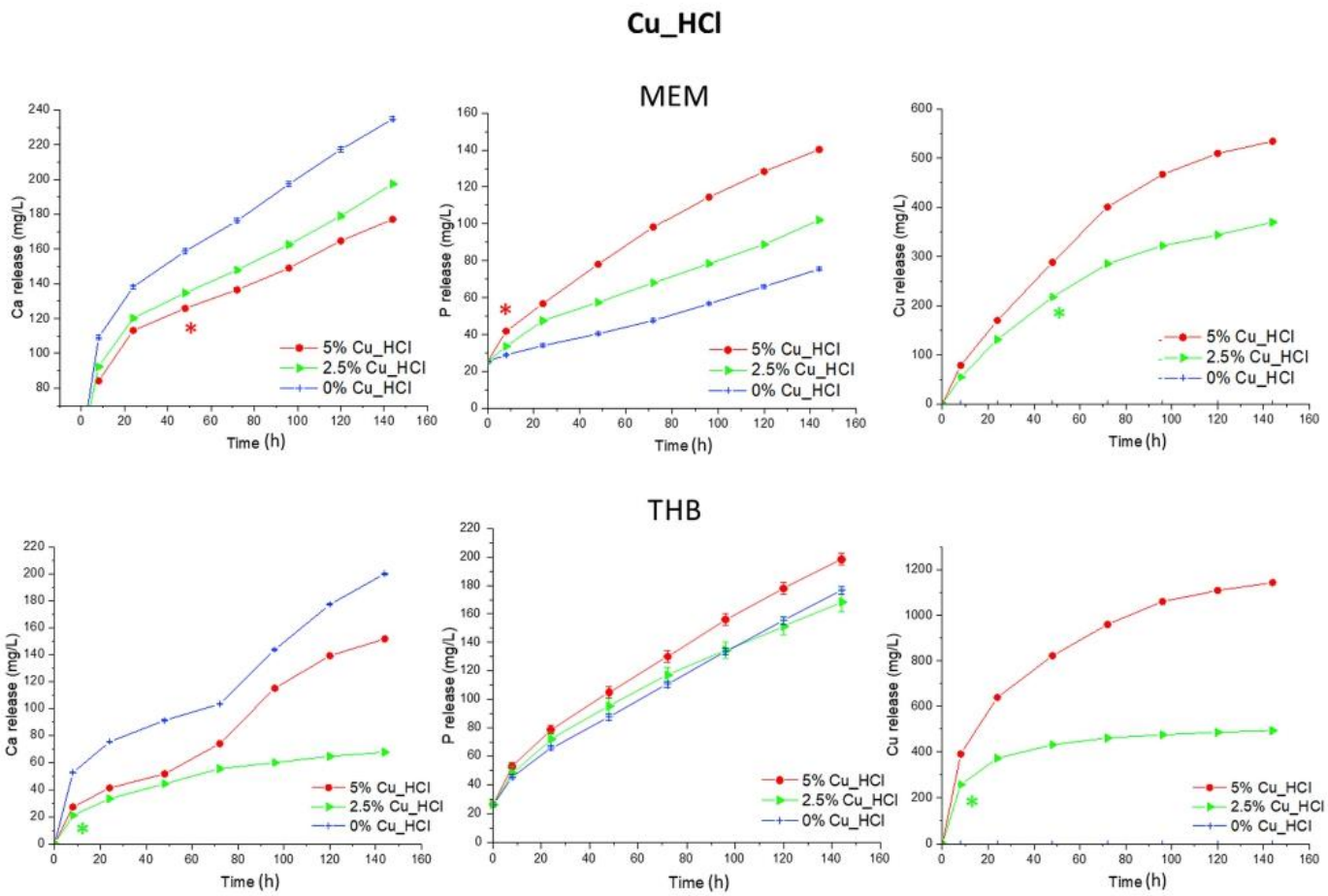


Fig. 10. Cumulative release of calcium, phosphorous and copper from chloride batch as a function of the time soaked in MEM and THB. The significant differences are marked with the symbol * in the time from which a p-value>0.05 was obtained with respect to the sample without copper, except for the measurement of copper.

was only observed after 24 h of treatment for the Cu-free sample. In the samples with 2.5% and 5% of CuO, the layer formed at 24 h was thinner and did not totally coat the surface of disks, evidencing that these samples exhibit lower in vitro bioactive response than Cu_HNO_3 series.

SEM results agree with obtained by FTIR (Figs. 6 and 7) where it was monitored the presence of: a band at 590 cm^{-1}, indicative of a-CaP, two bands at 570 and 600 cm^{-1} of n-CHA, and the increasing in the intensity of the bands when the layer thickness increased.

In summary, two general trends were observed regarding the in vitro response of MBGs: for the same composition, nitrate-based MBGs exhibited quicker bioactive response than chloride series, and for both series, the bioactive response decreased when copper amount in the MBG increased.

As it was observed in the previous paragraphs, SBF is a solution especially suitable for forming the n-CHA layer and consequently is excellent for comparative bioactivity screening here performed. However, SBF composition, without biochemical components, is far from the MBGs body conditions when implanted, but is also far from the solutions were the next steps in the MBGs assessment will be performed. Indeed, MBGs here optimized will be investigated in cell cultures to verify their osteogenic and angiogenic properties and in bacterial studies to evaluate their bactericidal capacity. For this reason, release studies of ions from MBGs were performed in cultures media of mammal cells, such as MEM, and of bacteria, such as THB.

Figs. 9 and 10 show the cumulative Ca, Cu and P ions release from both MBG series in MEM and THB culture media up to 6 d. Taking into account that MEM contains 90% more Ca and 50% less P in its composition than THB, absolute values between both media are not comparable. Results of Cu_HNO_3 series are depicted on Fig. 9, and show ions release profiles of Ca and P typical of highly bioactive glasses followed by release-precipitation equilibrium. In THB the three nitrate-based MBGs released analogous Ca amounts, being higher for CuO-free MBG after 3 d for both media and significantly different in MEM, reaching 102 ppm for Cu-free sample (Fig. 9). Regarding Cu ions (Fig. 9), knowing that copper are imbibed in glass structure as metallic nanoparticles (Figs. 1 and 3), higher amount of Cu nanoparticles in MBGs increase the release to the medium as it can be observed in MEM, being the difference between 2.5% Cu_HNO_3 and 5% Cu_HNO_3 samples up to 300 ppm after 6 d of treatment. However, it was inversely proportional due to the precipitation of copper phosphate when the cooper in medium is increased in THB (Fig. 9) [30].

The same assay was performed for chloride series (Fig. 10). Since Cu_HCl series stands out for having a high content of Ca/CuP nanoparticles imbibed in their structure (Fig. 1) and copper ions as a network modifier as it have been demonstrated by NMR (Fig. 3, Table 4). Ca and P ions (Fig. 10) release are typical of bioactive glasses followed the release-precipitation equilibrium. Moreover, there was a significantly deference between CuO-free samples and MBGs doped with Cu due to the different bioactive kinetic that has been demonstrated in the bioactive behaviour of this chloride-based series (Fig. 8) being more bioactive the CuO-free MBGs. In case of Cu ion (Fig. 10) release when copper enrichment are higher in the Cu_HCl series the amount of Cu released are significantly increased in both cell and bacteria media with a difference up to 150 and 600 ppm in MEM and THB, respectively. This effect confirms the decrease network connectivity (Q^n) calculated in NMR (Table 4) when Cu are increased in the MBG structure and thus more soluble in aqueous media.

The MBGs containing 2.5% and 5% of CuO investigated released therapeutic concentration of Cu^{2+} ions in MEM at 24 h with increments for each time in the cytocompatibility range [2]. However, after 6 d in THB, they released larger amounts of Cu^{2+} than in MEM. Consequently, CuO-containing MBGs here investigated, exhibiting good in vitro

bioactivity and Cu^{2+} release capability can be proposed for therapeutical application against bacterial infection. However, inclusion in the MBGs smaller than 2.5% of CuO will be investigated to ensure their cytocompatibility along with their antibacterial properties.

4. Conclusions

Two series of mesoporous bioactive glasses with composition (85-x) SiO_2–10CaO–$5P_2O_5$–xCuO (x = 0, 2.5%, 5 mol-%) were obtained by using nitrate or chloride precursors in their syntheses. Nanostructure and in vitro behaviour of MBGs were dependent on the synthesis conditions. CuO additions exerted different effect in the textural properties of MBGs of each series. However, all the MBGs showed high pore volumes and specific surface areas. Moreover, MBGs exhibited highly ordered mesoporous nanostructures and calcium/copper phosphate nanoparticles (10–20 nm) in Cu_HCl series, and nanoparticles larger than 50 nm of metallic copper in Cu_HNO_3 family.

The different nanostructures of MBGs yielded to diverse in vitro behaviours in simulated body fluid (SBF) or in cell (MEM) and bacteria (THB) culture media. Different location of copper in the glass structure for each series allowed explaining their different in vitro behaviours. MBGs released therapeutic amounts of Ca^{2+} and Cu^{2+} ions at 24 h. Moreover, MBGs of nitrate series exhibited quicker in vitro bioactive responses. Thus, MBG with 2.5% of CuO was coated by an apatite layer after 24 h in SBF, a remarkably short period for a MBG with this amount of CuO. Because of the quick bioactive response in SBF, the capacity to release therapeutic concentrations of ions and to host biomolecules, MBGs of the nitrate series are proposed as biomaterials for bone regeneration, and deserve further in vitro and in vivo studies.

CRediT authorship contribution statement

J. Jiménez-Holguín: Investigation, Data curation, Writing - original draft. **S. Sánchez-Salcedo:** Conceptualization, Methodology, Writing - original draft. **M. Vallet-Regí:** Resources, Supervision, Funding acquisition. **A.J. Salinas:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

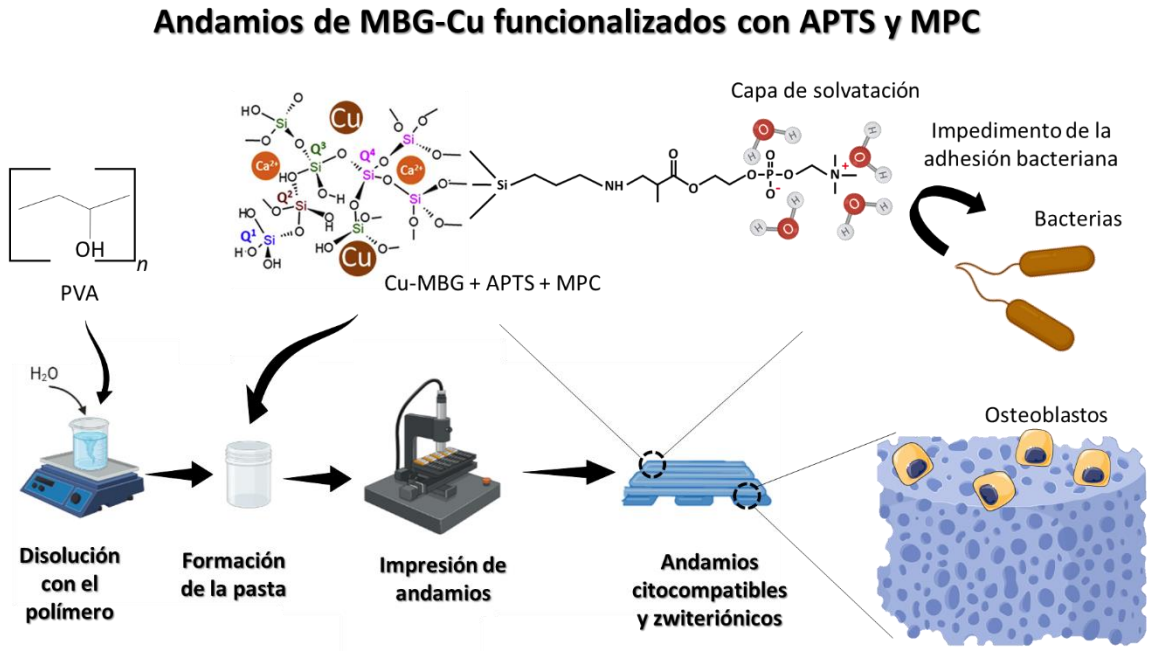
This study was supported by research grants from Instituto de Salud Carlos III (PI15/00978) project co-financed with the European Union FEDER funds, the European Research Council (ERC-2015-AdG), Advanced Grant Verdi-Proposal No.694160. JJ-H thanks to Youth Employment initiative (YEI) from Comunidad de Madrid (PEJ-2017-2017-AI/SALI-5825).

References

[1] I. Izquierdo-Barba, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, Bioactive glasses: from macro to nano, Int. J. Appl. Glass Sci. 4 (2013) 149–161, https://doi.org/10.1111/ijag.12028.
[2] C. Wu, J. Chang, Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors, J. Contr. Release 193 (2014) 282–295, https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.026.
[3] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities, Angew. Chem. Int. Ed. 43 (2004) 5980–5984, https://doi.org/10.1002/anie.200460598.
[4] L.L. Hench, The story of Bioglass®, J. Mater. Sci. Mater. Med. 17 (2006) 967–978, https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z.
[5] L.L. Hench, Genetic design of bioactive glass, J. Eur. Ceram. Soc. 29 (2009) 1257–1265, https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.002.
[6] A.A. Gorustovich, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences, Tissue Eng. B Rev. 16 (2010) 199–207, https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0416.
[7] L.L. Hench, J.M. Polak, Third-generation biomedical materials, Science 295 (2002) 1014–1017, https://doi.org/10.1126/science.1067404.
[8] A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, Bioactive ceramics: from bone grafts to tissue engineering, RSC Adv. 3 (2013) 11116–11131, https://doi.org/10.1039/c3ra00166k.
[9] N. Gupta, D. Santhiya, Mesoporous Bioactive Glass and its Applications, Bioact. Glas, 2018, pp. 63–85, https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100936-9.00003-4.
[10] R. Koohkan, T. Hooshmand, M. Tahriri, D. Mohebbi-Kalhori, Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous copper silicate bioactive glasses, Ceram. Int. 44 (2018) 2390–2399, https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2017.10.208.
[11] J. Li, D. Zhai, F. Lv, Q. Yu, H. Ma, J. Yin, Z. Yi, M. Liu, J. Chang, C. Wu, Preparation of copper-containing bioactive glass/eggshell membrane nanocomposites for improving angiogenesis, antibacterial activity and wound healing, Acta Biomater. 36 (2016) 254–266, https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2016.03.011.
[12] F. Baino, I. Potestio, C. Vitale-Brovarone, Production and physicochemical characterization of Cu-doped silicate bioceramic scaffolds, Mater. (Basel, Switzerland) 11 (2018) 1524, https://doi.org/10.3390/ma11091524.
[13] G. Borkow, J. Gabbay, Copper as a biocidal tool, Curr. Med. Chem. 12 (2005) 2163–2175, https://doi.org/10.2174/0929867054637617.
[14] J. Jonas, J. Burns, E.W. Abel, M.J. Cresswell, J.J. Strain, C.R. Paterson, Impaired mechanical strength of bone in experimental copper deficiency, Ann. Nutr. Metab. 37 (1993) 245–252, https://doi.org/10.1159/000177774.
[15] B.J. Smith, J.B. King, E.A. Lucas, M.P. Akhter, B.H. Arjmandi, B.J. Stoecker, Nutrient metabolism skeletal unloading and dietary copper depletion are detrimental to bone quality of mature rats, J. Nutr. 132 (2002) 190–196, https://doi.org/10.1093/jn/132.2.190.
[16] H. Nojiri, Y. Saita, D. Morikawa, K. Kobayashi, C. Tsuda, T. Miyazaki, M. Saito, K. Marumo, I. Yonezawa, K. Kaneko, T. Shirasawa, T. Shimizu, Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking, J. Bone Miner. Res. 26 (2011) 2682–2694, https://doi.org/10.1002/jbmr.489.
[17] W. Opsahl, H. Zeronian, M. Ellison, D. Lewis, R.B. Rucker, R.S. Riggins, Role of copper in collagen cross-linking and its influence on selected mechanical properties of chick bone and tendon, J. Nutr. 112 (1982) 708–716, https://doi.org/10.1093/jn/112.4.708.
[18] L. Finney, S. Vogt, T. Fukai, D. Glesne, Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 36 (2009) 88–94, https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.04969.x.
[19] C. Gérard, L.-J. Bordeleau, J. Barralet, C.J. Doillon, The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper, Biomaterials 31 (2010) 824–831, https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.009.
[20] C.K. Sen, S. Khanna, M. Venojarvi, P. Trikha, E.C. Ellison, T.K. Hunt, S. Roy, Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 282 (2002) 1821–1827, https://doi.org/10.1152/ajpheart.01015.2001.
[21] G. Hu, Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture, J. Cell. Biochem. 69 (1998) 326–335, https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19980601)69:3<326::AID-JCB10>3.0.CO;2-A.
[22] S.N. Rath, A. Brandl, D. Hiller, A. Hoppe, U. Gbureck, R.E. Horch, A.R. Boccaccini, U. Kneser, Bioactive copper-doped glass scaffolds can stimulate endothelial cells in co-culture in combination with mesenchymal stem cells, PloS One 9 (2014), https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113319.
[23] J. Ye, J. He, C. Wang, K. Yao, Z. Gou, Copper-containing mesoporous bioactive glass coatings on orbital implants for improving drug delivery capacity and antibacterial activity, Biotechnol. Lett. 36 (2014) 961–968, https://doi.org/10.1007/s10529-014-1465-x.
[24] J.P. Ruparelia, A.K. Chatterjee, S.P. Duttagupta, S. Mukherji, Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, Acta Biomater. 4 (2008) 707–716, https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2007.11.006.
[25] K.-Y. Yoon, J. Hoon Byeon, J.-H. Park, J. Hwang, Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles, Sci. Total Environ. 373 (2007) 572–575, https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2006.11.007.
[26] J. Barker, I.B. Vipond, S.F. Bloomfield, Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces, J. Hosp. Infect. 58 (2004) 42–49, https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2004.04.021.
[27] J.O. Noyce, H. Michels, C.W. Keevil, Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces, Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007) 2748, https://doi.org/10.1128/AEM.01139-06.
[28] L.B. Romero-Sánchez, M. Marí-Beffa, P. Carrillo, M.Á. Medina, A. Díaz-Cuenca, Copper-containing mesoporous bioactive glass promotes angiogenesis in an in vivo zebrafish model, Acta Biomater. 68 (2018) 272–285, https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.12.032.
[29] M. Cicuéndez, M.T. Portolés, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, New nanocomposite system with nanocrystalline apatite embedded into mesoporous bioactive glass, Chem. Mater. 24 (2012) 1100–1106, https://doi.org/10.1021/cm203416x.
[30] S. Shruti, A.J. Salinas, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regi, Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium- and zinc-containing glasses, Acta Biomater. 9 (2013) 4836–4844, https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.024.

[31] C. Heras, S. Sanchez-Salcedo, D. Lozano, J. Peña, P. Esbrit, M. Vallet-Regi, A. J. Salinas, Osteostatin potentiates the bioactivity of mesoporous glass scaffolds containing Zn^{2+} ions in human mesenchymal stem cells, Acta Biomater. 89 (2019) 359–371, https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.03.033.
[32] S. Zhao, J. Zhang, M. Zhu, Y. Zhang, Z. Liu, C. Tao, Y. Zhu, C. Zhang, Acta Biomaterialia Three-dimensional printed strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for repairing rat critical-sized calvarial defects, Acta Biomater. 12 (2015) 270–280, https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.015.
[33] W. Xia, J. Chang, Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG), A promising bioactive drug delivery system 110 (2006) 522–530, https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.11.002.
[34] A. Philippart, N. Gómez-Cerezo, D. Arcos, A.J. Salinas, E. Boccardi, M. Vallet-Regi, A.R. Boccaccini, Novel ion-doped mesoporous glasses for bone tissue engineering: study of their structural characteristics influenced by the presence of phosphorous oxide, J. Non-Cryst. Solids 455 (2017) 90–97, https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2016.10.031.
[35] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of gases in multimolecular layers, J. Am. Chem. Soc. 60 (1938) 309–319, https://doi.org/10.1021/ja01269a023.
[36] E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, J. Am. Chem. Soc. 73 (1951) 373–380, https://doi.org/10.1021/ja01145a126.
[37] A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, Glasses in bone regeneration: a multiscale issue, J. Non-Cryst. Solids 432 (2016) 9–14, https://doi.org/10.1016/J.JNONCRYSOL.2015.03.025.
[38] Z. ALOthman, A review: fundamental aspects of silicate mesoporous materials, Materials 5 (2012) 2874–2902, https://doi.org/10.3390/ma5122874.
[39] X. Wang, F. Cheng, J. Liu, J.H. Smått, D. Gepperth, M. Lastusaari, C. Xu, L. Hupa, Biocomposites of copper-containing mesoporous bioactive glass and nanofibrillated cellulose: biocompatibility and angiogenic promotion in chronic wound healing application, Acta Biomater. 46 (2016) 286–298, https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.021.
[40] H. Luo, J. Xiao, M. Peng, Q. Zhang, Z. Yang, H. Si, Y. Wan, One-pot synthesis of copper-doped mesoporous bioglass towards multifunctional 3D nanofibrous scaffolds for bone regeneration, J. Non-Cryst. Solids 532 (2020) 119856, https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2019.119856.
[41] C. Wang, K. Jin, J. He, J. Wang, X. Yang, C. Yao, X. Dai, C. Gao, Z. Gou, J. Ye, Synergistic effect of copper-containing mesoporous bioactive glass coating on stimulating vascularization of porous hydroxyapatite orbital implants in rabbits, J. Biomed. Nanotechnol. 14 (2018) 688–697, https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2513.
[42] E. Leonova, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, A. López-Noriega, N. Hedin, M. Vallet-Regí, M. Edén, Multinuclear Solid-State NMR Studies of Ordered Mesoporous Bioactive Glasses 112 (2008) 5552–5562, https://doi.org/10.1021/jp7107973.
[43] B.A.E. Ben–Arfa, S. Neto, I.M. Miranda Salvado, R.C. Pullar, J.M.F. Ferreira, Robocasting of Cu^{2+} & La^{3+} doped sol–gel glass scaffolds with greatly enhanced mechanical properties: compressive strength up to 14 MPa, Acta Biomater. 87 (2019) 265–272, https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.01.048.
[44] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomaterials 27 (2006) 2907–2915, https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
[45] R. Mathew, C. Turdean-Ionescu, Y. Yu, B. Stevensson, I. Izquierdo-Barba, A. García, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M. Edén, Proton environments in biomimetic calcium phosphates formed from mesoporous bioactive $CaO\text{-}SiO_2\text{-}P_2O_5$ glasses in vitro: insights from solid-state NMR, J. Phys. Chem. C 121 (2017) 13223–13238, https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b03469.
[46] D. Ye, W. Tang, Z. Xu, X. Zhao, G. Wang, Application of MBG as a coating material on mechanically stronger but less degradable ceramic scaffolds for enhanced osteogenesis, Mater. Lett. 223 (2018) 105–108, https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.03.202.

III.1.4 Andamios de Cu-MBG zwiterionicos



Esquema 4. Resumen gráfico del trabajo "Andamios de Cu-MBG zwiterionicos"

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por el trabajo "*Development and evaluation of copper-containing mesoporous bioactive glasses for bone defects therapy*" se llevó a cabo la optimización de la cantidad de cobre integrada en las composiciones, así como el método de conformado de andamios tridimensionales con PVA.

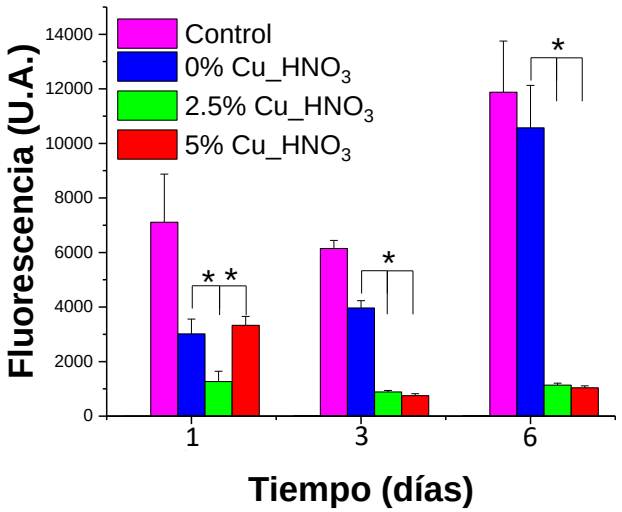


Figura 22. Ensayo de citotoxicidad tras poner en contacto discos densos de las composiciones 0, 2.5 y 5% CuO_HNO_3 durante 1, 3 y 6 días. El (*) indica diferencias significativas entre las muestras ($p<0,05$).

En vista de las propiedades fisicoquímicas de ambas familias (Cu_HNO_3 y Cu_HCl) se continuó con los estudios con la familia Cu_HNO_3, pues, aunque la familia Cu_HCl poseía un ligero aumento en sus propiedades texturales respecto a la familia Cu_HNO_3, esta última presentó una respuesta bioactiva

superior. Un estudio posterior de citocompatibilidad con células pre-osteoblásticas reveló que las composiciones con 2.5 y 5% de CuO integrado disminuían significativamente la viabilidad celular de células pre-osteoblásticas (**Figura 22**). Teniendo en cuenta dichos resultados, se llevó a cabo un estudio comparativo entre tres nuevas composiciones, con una cantidad reducida (%mol) de cobre, con el objetivo de investigar cual es el porcentaje máximo que puede integrarse de CuO en los MBG sin llegar a resultar citotóxico. Con este fin se utilizó células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 provenientes de ratón como modelo de estudio. Las composiciones estudiadas fueron las siguientes (**Tabla 8**).

Tabla 8. Nomenclatura y composición (%mol) de MBGs enriquecidas con cobre

Nomenclatura	Composición (% mol)
0% Cu_HNO_3	$85SiO_2$—$5P_2O_5$—10CaO
0.05% Cu_HNO_3	$84.95SiO_2$—$5P_2O_5$—10CaO—**0.05CuO**
0.1% Cu_HNO_3	$84.9SiO_2$—$5P_2O_5$—10CaO—**0.1CuO**
0.25% Cu_HNO_3	$84.75SiO_2$—$5P_2O_5$—10CaO—**0.25CuO**

Con el objetivo de estudiar la composición más idónea para su implantación en forma de andamio meso-macroporoso tridimensional con PVA, se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica de los MBGs, estudios de bioactividad en SBF y estudios de citocompatibilidad.

III.1.4.1 Síntesis y caracterización fisicoquímica de las composiciones

Las cuatro composiciones se sintetizaron combinando la química supramolecular con el método EISA, siguiendo la metodología descrita en el trabajo previo para la familia Cu_HNO_3 y variando las proporciones de los reactivos, acorde a las composiciones sintetizadas (**Tabla 9**)

Tabla 9. Cantidades empleadas de los reactivos para la síntesis de los MBG (F127: Pluronic® F127; Et–OH: etanol; TEOS: tetraethil ortosilicato, TEP: trietil fosfato).

MBG	F127 (g)	EtOH (ml)	H_2O (ml)	HNO_3 1 M (ml)	TEOS (ml)	TEP (ml)	$CaNO_3 \cdot 4H_2O$ (ml)	$CuNO_3 \cdot 2.5H_2O$ (g)
0% Cu_HNO_3	6.5	56.2	6.46	5.45	12.4	1.12	1.56	0
0.05% Cu_HNO_3	6.5	56.2	6.46	5.45	12.36	1.12	1.56	0.038
0.1% Cu_HNO_3	6.5	56.2	6.46	5.45	12.38	1.12	1.56	0.015
0.25% Cu_HNO_3	6.5	56.2	6.46	5.45	12.39	1.12	1.56	0.00768

Los MBG en polvo sintetizados fueron caracterizados a través de distintas técnicas experimentales. Mediante un análisis por termogravimetría (TG/DTA) se comprobó la correcta eliminación del surfactante empleado como agente director de estructura necesario para obtener el orden mesoporoso del material, así como los grupos nitratos provenientes de los precursores de calcio y cobre.

Mediante la caracterización por difracción de rayos-X (XRD), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y adsorción de nitrógeno, se obtuvo información acerca de sus propiedades texturales, forma de poro y orden mesoporoso.

En la **Figura 23.A**, se muestra el difractograma del XRD de cada material elaborado. Como puede observarse todas las composiciones muestran un máximo alrededor del ángulo 2θ ≈ 1º., indicativo del orden mesoporoso, y un hombro localizado en torno al ángulo 2θ ≈1.5. De acuerdo con la literatura, estos máximos se asocian con la reflexión (10) de la fase hexagonal 2D formada por la disposición de los mesoporos y el hombro se debe a las reflexiones de baja intensidad (11) y (20) de esta fase [215]. Sin embargo, para las composiciones enriquecidas con Cu, los máximos (11) y (20) aparecen difusos.

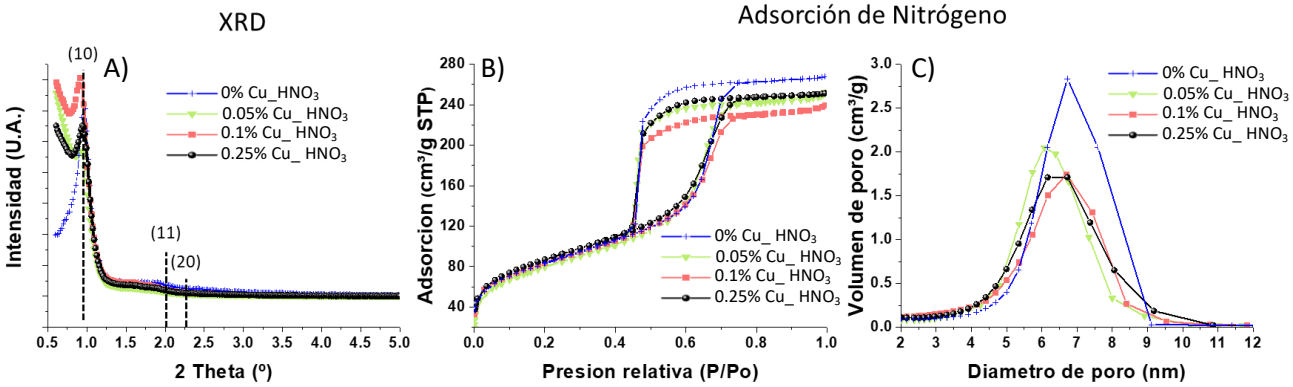


Figura 23. Patrones SA-XRD de los MBG sintetizados (**A**). resultados de la adsorción de N_2 mostrando las isotermas (**B**) y las distribuciones del tamaño de los poros (**C**) de ambas series de MBG.

Los materiales en polvo se caracterizaron por medio de adsorción de nitrógeno para evaluar si la reducción de la incorporación de Cu^{2+}, provocaba una variación significativa en las propiedades texturales de los materiales. En la **Figura 23.B** se muestran las isotermas de las cuatro composiciones, en todos los casos se obtuvo isotermas tipo IV, características de materiales mesoporosos. Por otra parte, las cuatro composiciones mostraron ciclos de histéresis tipo H2, propios de materiales con poros en forma de tintero [412]. Como era de esperar, las composiciones 0.05% Cu_HNO_3, 0.1% Cu_HNO_3 y 0.25% Cu_HNO_3, poseen tan poco porcentaje de Cu integrado que, a menor cantidad de dopante, más similitudes presentan con la composición sin cobre 0% Cu_HNO_3, a diferencia de lo que ocurría con las composiciones 2.5% y 5% Cu_HNO_3 que presentaban ciclos de histéresis tipo H1. Esta diferencia observada puede deberse a la no aparición de nanopartículas de cobre observadas en las composiciones 2.5% y 5% Cu_HNO_3 debido a una menor relación molar de CuO en las muestras.

Las propiedades texturales de los materiales se obtuvieron a partir de las isotermas. Como se observa en la **Tabla 10**, se produjo un ligero descenso de las propiedades texturales en aquellas composiciones enriquecidas con cobre. La composición 0% Cu_HNO_3 presentó un volumen de poro de 0,4 cm^3/g mientras que las composiciones con cobre disminuyeron hasta 0,38 cm^3/g. Así mismo, se observó también un descenso en el diámetro de poro, partiendo de 5,5 nm en la composición sin cobre, hasta disminuir a 4,9 nm. Estos resultados confirman los resultados observados por otros autores, pues los átomos de cobre actúan como modificadores de la red de sílice lo que conlleva a una pérdida gradual de las propiedades texturales [413,414]. Sin embargo, parecen presentar mayor superficie específica

conforme aumenta la proporción de cobre en su estructura, pues la composición sin cobre presentó 301 m^2/g hasta alcanzar 315 m^2/g para 0.25% Cu_HNO_3. Estas diferencias no son significativas pues entran dentro del 5% de error de la técnica.

Tabla 10. Propiedades texturales (S_{Bet}: superficie específica, V_p: volumen de poro, D_p: Diámetro de poro), así como la composición atómica (EDS) de las composiciones sintetizadas.

Material	S_{BET} (m^2/g)	V_{poro} (cm^3/g)	D_p (nm)	Composición atómica (EDS) %			
				Si	Ca	P	Cu
0% Cu_HNO_3	301	0,41	6,7	89.6	8.2	2.2	0
0.05% Cu_HNO_3	286	0,39	6,0	83.4	7.2	9.4	0.04
0.1% Cu_HNO_3	302	0,36	6,7	79.7	8.5	11.7	0.07
0.25% Cu_HNO_3	315	0,38	6,7	81.1	4.5	14.1	0.3

La **Figura 24** muestra las micrografías obtenidas por el TEM de los cuatro MBG, y sus respectivos espectros EDS. Las imágenes muestran fragmentos de los MBG con mesoporosidad ordenada para todas las muestras. Estos resultados confirman los resultados obtenidos por XRD, en los que se observaba que la presencia de Cu a estos niveles tan bajos no perturba el orden mesoporoso.

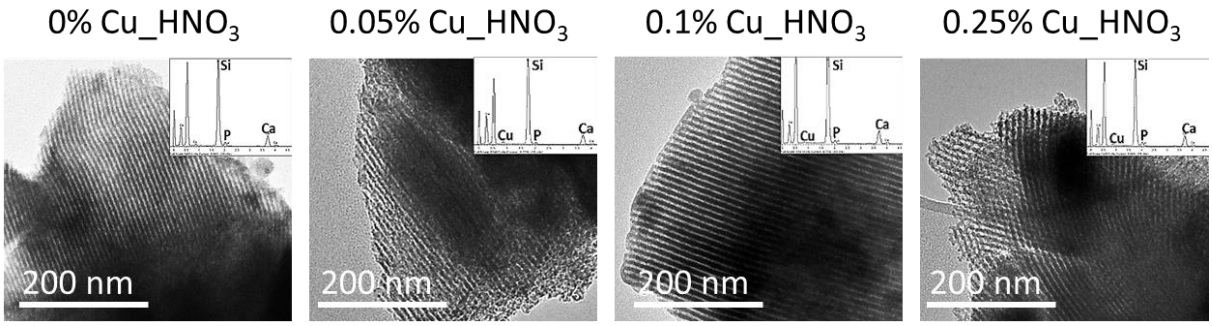


Figura 24. Micrografías obtenidas por TEM para las composiciones 0, 0.05, 0.1 y 0.25% Cu_HNO_3, con sus respectivos espectros EDS.

III.1.4.2 Proceso de funcionalización y caracterización de los MBG funcionalizados

Los materiales zwitteriónicos son una nueva clase de superficies antiincrustantes que ha demostrado su eficacia debido a la formación de una fuerte capa de hidratación mediante la interacción electrostática. Sus escasas interacciones con las proteínas del suero y bacterias además de su naturaleza no tóxica los convierten en candidatos ideales dada su compatibilidad con la sangre y su citocompatibilidad que son requisitos fundamentales de los biomateriales en contacto con la sangre para aplicaciones biomédicas[373].

Con este objetivo se llevó a cabo una funcionalización en dos pasos de las cuatro composiciones recogidas en la **Tabla 10**. Con este objetivo se ancló el 2-metacriloiloxietilfosforilcolina (MPC), una molécula zwitteriónica caracterizada por presentar en el extremo terminal una amina cuaternaria cargada positivamente y unida a ella un fosfato cargado negativamente generando una carga total

cero. Para anclar dicha molécula a la superficie de los MBG es necesario utilizar un intermediario, en este caso fue el aminopropiltrietoxisilano (APTS), un aminosilano de fácil anclaje a la superficie de los MBG mediante a un proceso de condensación. (**Figura 25**).

Una vez llevado a término el proceso de funcionalización se realizó una caracterización a fin de corroborar que el anclaje de los mismos. Para ello se realizaron ATG y FTIR antes y después de las funcionalizaciones de cada uno de los pasos del proceso (**Figura 26**). Los resultados mostraron que los MBG sin funcionalizar (**Figura 25.A**) perdían alrededor de un 3-4% de masa, como consecuencia de la pérdida de agua fisisorbida en la superficie del material. Tras la funcionalización con APTS (**Figura 26.B**) se apreció la perdida de alrededor un 8-11% de masa, teniendo en cuenta la pérdida de masa a partir de 150ºC, descartando de esta forma la humedad contenida dentro del MBG. Los materiales funcionalizados con APTS+MPC (**Figura 26.C**) perdieron hasta un 10-15% de masa. Estos resultados confirman la ganancia de masa con cada proceso de funcionalización, lo que indica el anclaje sucesivo y zwitterionización de la superficie del MBG.

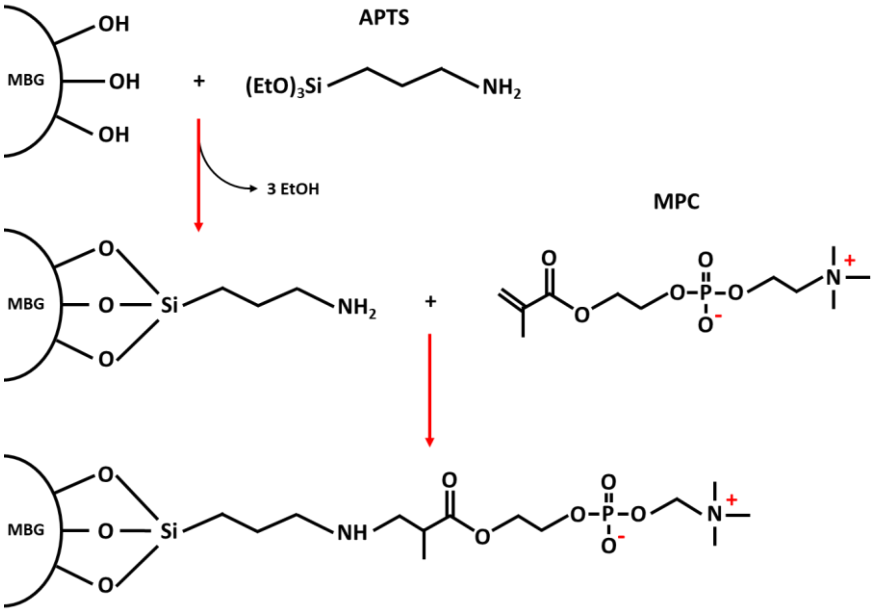


Figura 25. Esquema del proceso de funcionalización en dos pasos para el anclaje de MPC en la superficie de un MBG.

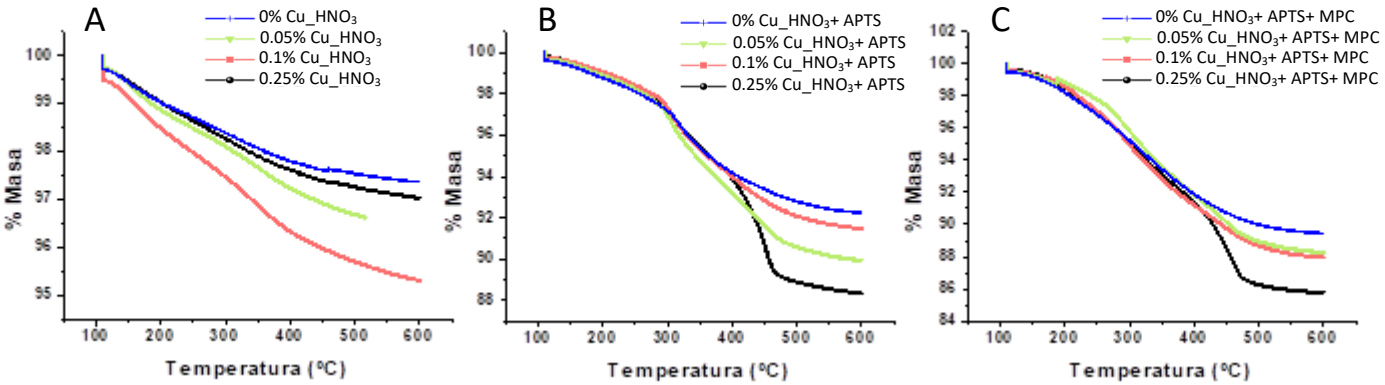
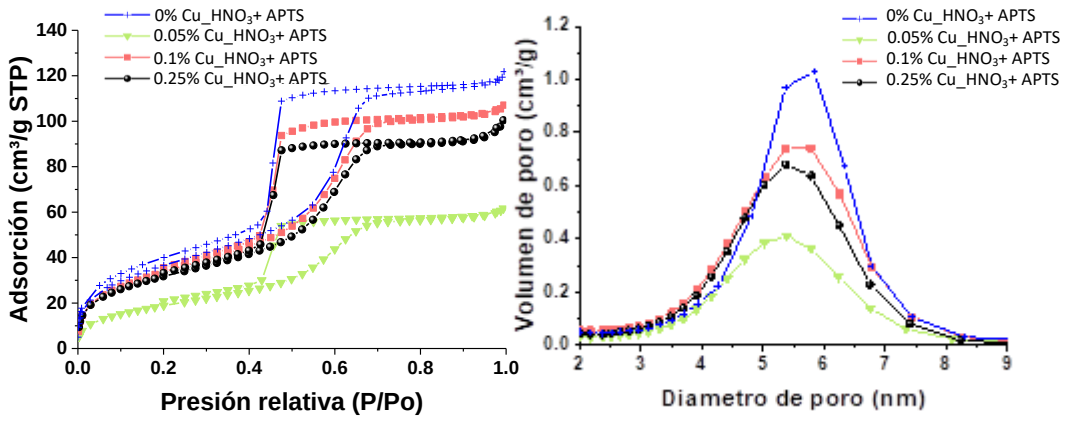


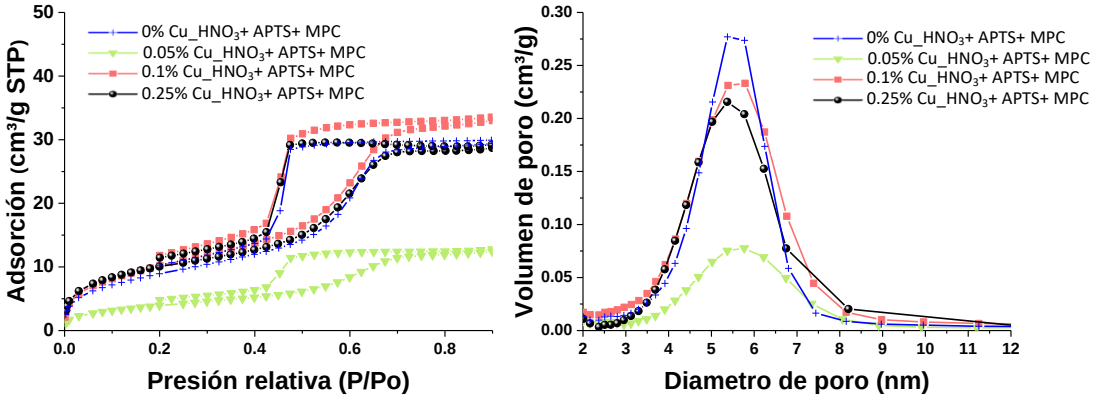
Figura 26. Análisis termogravimétrico de los 0, 0.05, 0.1 y 0.25% Cu_HNO_3 sin funcionalizar (**A**), funcionalizados con APTS (**B**) y con APTS+MPC (**C**).

Se realizaron análisis por adsorción de nitrógeno, comparando la perdida de propiedades texturales a medida que los agentes funcionalizantes van cubriendo la superficie del MBG (**Figura 27**). Como puede observarse tras cada adición se produce una pérdida considerable de la superficie específica de las composiciones de alrededor del 56% tras la funcionalización con APTS y un 75% tras la funcionalización con MPC indicando el anclaje de los funcionalizantes en los MBG. Esta pérdida se experimentó también para el volumen de poro de los MBG, sin embargo, el diámetro de poro no se vio alterado.

Por otra parte, la **Figura 28** muestra la evolución del potencial ζ tras cada uno de los pasos de funcionalización de los MBG. Los MBG se encuentran densamente poblados por grupos silanoles (-Si-O^-) que aportan carga negativa de alrededor -30 mV. Una vez se funcionaliza con APTS, la carga negativa disminuye hasta -15 mV aproximadamente, como consecuencia de la adición de un grupo amino que a pH=7.4 aporta carga positiva. Posteriormente, la adición de la molécula de MPC aporta una carga eléctrica cercana a 0 mV debido a que las cargas positivas de los aminos y negativa de los fosfatos anclados al aminosilano. Estos resultados indican la funcionalización de la superficie de los MBG.



Material	S_{BET} (m^2/g)	V_{poro} (cm^3/g)	Tamaño de poro (nm)
0% Cu_HNO_3+ APTS	135	0,18	5,8
0.05% Cu_HNO_3+ APTS	71	0,10	5,4
0.1% Cu_HNO_3+ APTS	127	0,16	5,8
0.25% Cu_HNO_3+ APTS	118	0,14	5,4



Material	S_{BET} (m^2/g)	V_{poro} (cm^3/g)	Tamaño de poro (nm)
0% Cu_HNO_3+ APTS + MPC	34	0,05	5,4
0.05% Cu_HNO_3+ APTS + MPC	15	0,02	5,8
0.1% Cu_HNO_3+ APTS + MPC	38	0,05	5,8
0.25% Cu_HNO_3+ APTS + MPC	37	0,04	5,4

Figura 27. Propiedades texturales de los materiales funcionalizados. Isotermas adsorción-desorción de nitrógeno, distribución de tamaños de poro y cuantificación de las propiedades texturales (S_{Bet}: superficie específica, V_p: volumen de poro, D_p: Diámetro de poro.

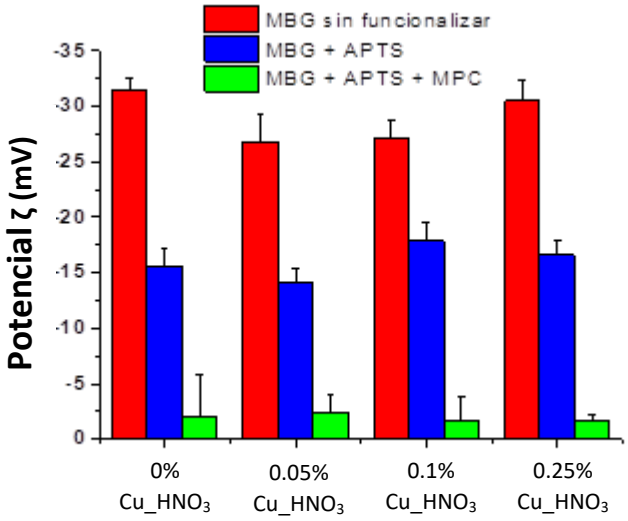


Figura 28. Histograma del potencial ζ de los MBG antes y después de funcionalizar con APTS y MPC.

Finalmente, se caracterizaron por espectroscopia FTIR para analizar la presencia de la funcionalización en los MBG (**Figura 29**). Los resultados muestran para todas las composiciones las bandas de vibración pertenecientes a los enlaces O-Si, O-Si-O y Si-OH característicos de los MBG entre el 1100-1040 cm^{-1} y 478-441 cm^{-1}. Tras la funcionalización con APTS y MPC aparecen bandas correspondientes a los grupos carbonilo (C=O) en el 1600 cm^{-1}, fosfato (P=O) en el 1200 cm^{-1} y aminas (NH_3^+), así como los enlaces N-H, C-H y C-N alrededor del 1600 y 3000 cm^{-1}.

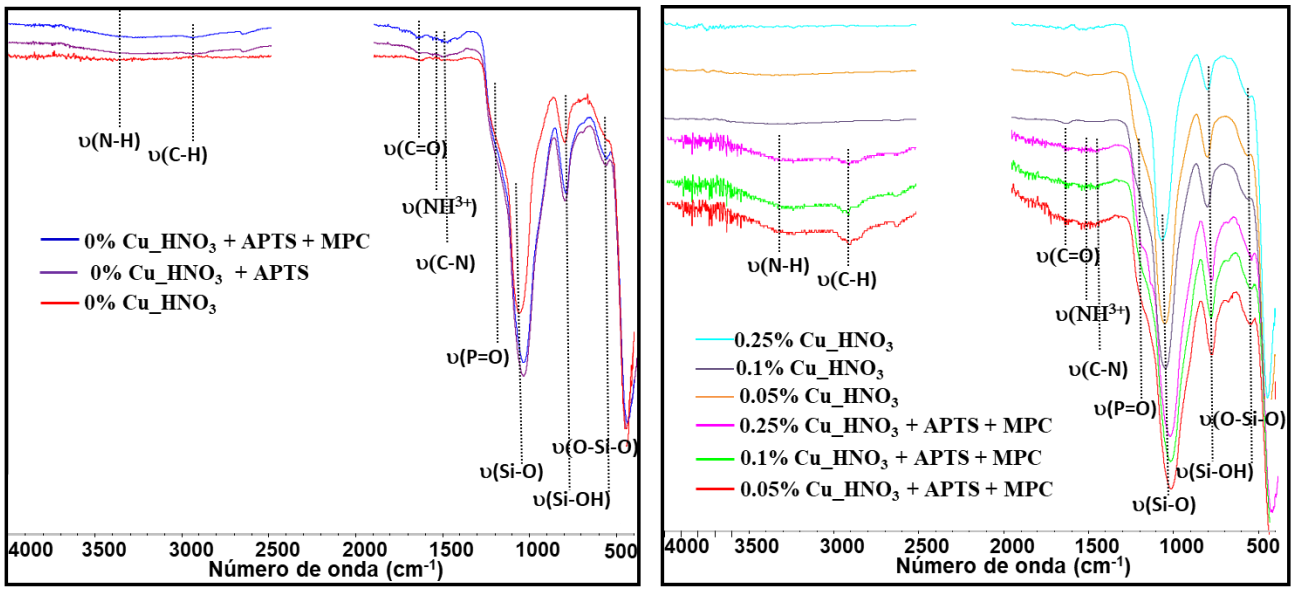


Figura 29. Espectros infrarrojos de los MBG antes y después de las funcionalizaciones con APTS y MPC.

Con estos resultados presentados podemos confirmar la presencia de APTS y MPC en los MBG estudiados.

III.1.4.3 Ensayo de Citocompatibilidad: Elección del MBG más adecuado

Para evaluar la citocompatibilidad de los MBG sintetizados con y sin cobre se realizó un ensayo de proliferación in vitro. Para ello se elaboraron discos densos a partir de una pasta resultante de mezclar

MBG, de las composiciones (0.05, 0.1 y 0.25% Cu_HNO_3), y PVA, tal como se describe en la elaboración de la pasta en el trabajo "*Strontium-Modified Scaffolds Based on Mesoporous Bioactive Glasses/Polyvinyl Alcohol Composites for Bone Regeneration"* y extruyéndolo a través de una jeringa sin boquilla en un molde (**Figura 30**).

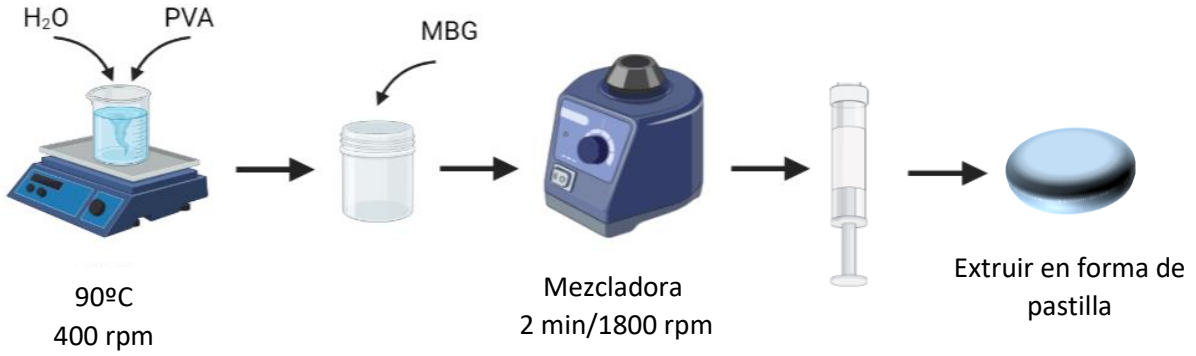


Figura 30. Procedimiento para la obtención de discos densos a partir de pasta de MBG/PVA.

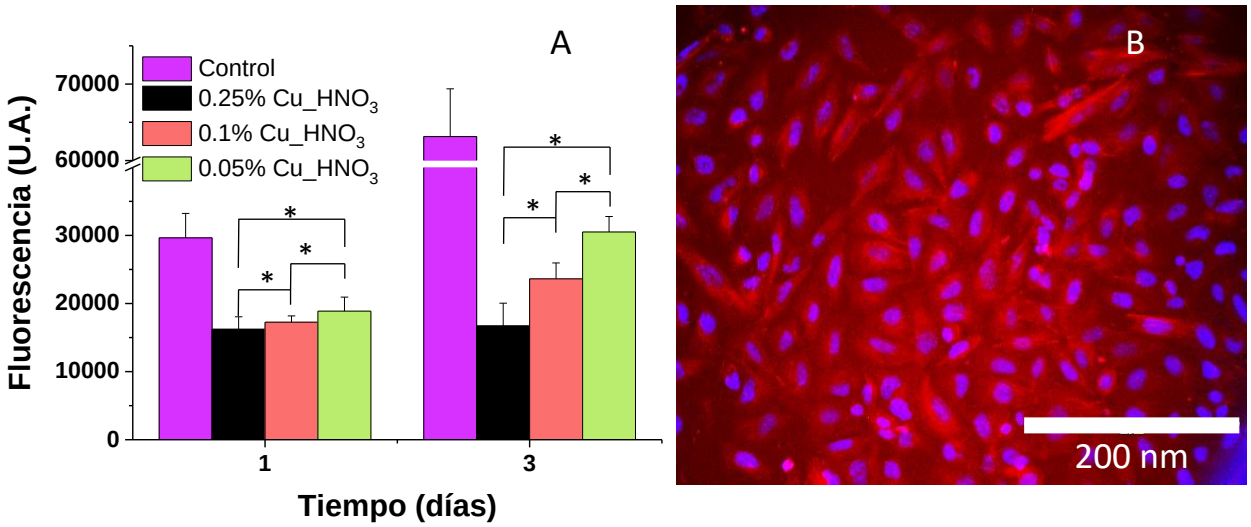


Figura 31. Ensayo de citotoxicidad tras poner en contacto discos densos MBG/PVA durante 3 días (**A**). Morfología de las células pre-ósteoblasticas tras 3 días en contacto con la pastilla de 0.05% Cu_HNO_3/PVA. Citoesqueleto marcado en rojo (Faloidina), núcleo celular marcado en azul (DAPI) (**B**). El (*) indica diferencias significativas entre las muestras ($p<0,05$).

Estos discos densos se pusieron en contacto con células pre-osteoblásticas MC3T3-E1, con el objetivo de elegir la composición con cobre más idónea. La **Figura 31** muestra los resultados obtenidos tras el contacto de los discos densos con las células pre-osteoblásticas durante 3 días.

Como puede observarse en la **Figura 31.A**, la composición 0.05% Cu_HNO_3 fue la que presentó mayores valores de fluorescencia, seguido de la composición 0.1% Cu_HNO_3 y 0.25% Cu_HNO_3. Estos resultados indican que aquellas composiciones con menor cantidad de cobre son las que muestran una mayor citocompatibilidad y proliferación en esta línea celular. En la **Figura 31.B**, se puede observar el fenotipo de las células tras 3 días de exposición a los discos densos, mostrando una morfología poligonal, conocida como *Wild type*. Cabe destacar que las diferencias observadas de citocompatibilidad obtenida entre la composición 0.05% Cu_HNO_3 y el control de células no son comparables, pues en el

caso de las células, crecen en condiciones óptimas en un medio rico de nutrientes, mientras que en presencia de la pastilla las células pueden quedar dañadas por la fricción de la pastilla al llevar a cabo el ensayo y no a causa de los productos de degradación de los discos densos.

En vista de estos resultados se continuó los ensayos exclusivamente con las composiciones 0 y 0.05% Cu_HNO_3, con y sin funcionalización para la elaboración de andamios tridimensionales.

III.1.4.4 Ensayo de citocompatibilidad con andamios 3D de MBG-APTS-MPC/PVA

Se realizó el conformado de andamios tridimensionales mediante robocasting a partir de una pasta formada por MBG de las composiciones 0 y 0.05% Cu_HNO_3 con y sin funcionalización con APTS+MPC, además del biopolímero aglutinante, PVA.

Por último, se llevó a cabo un ensayo de citocompatibilidad y colonización celular en los andamios tridimensionales MBG-APTS+MPC/PVA. La **Figura 32** recoge los resultados obtenidos.

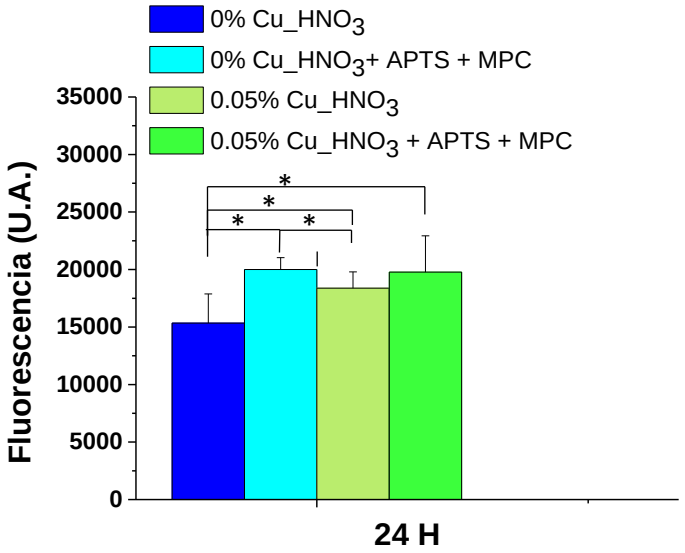


Figura 32. Ensayo de Citocompatibilidad a 24 h en los andamios obtenidos a partir de las composiciones 0 y 0.05% Cu_HNO_3, con y sin funcionalizar. El (*) indica diferencias significativas entre las muestras ($p<0,05$).

Como puede observarse en la **Figura 32**, la citocompatibilidad al cabo de 24 h fue superior significativamente para aquellos andamios MBG zwitterión con y sin cobre. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre la citocompatibilidad entre ambos andamios MBG zwitterión con y sin cobre. Esto indica que la presencia de cobre en los andamios MBG la relación molar 0.05% CuO además de ser citocompatible podrían tener la capacidad de ejercer el efecto terapéutico de los iones cobre contenidos en su estructura química.

III.1.4.5. Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1- Se ha optimizado el porcentaje atómico (% mol) de CuO en 0.05 para un MBG, perteneciente al sistema SiO_2─P_2O_5─CaO, como la cantidad idónea para estimular la proliferación en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1.

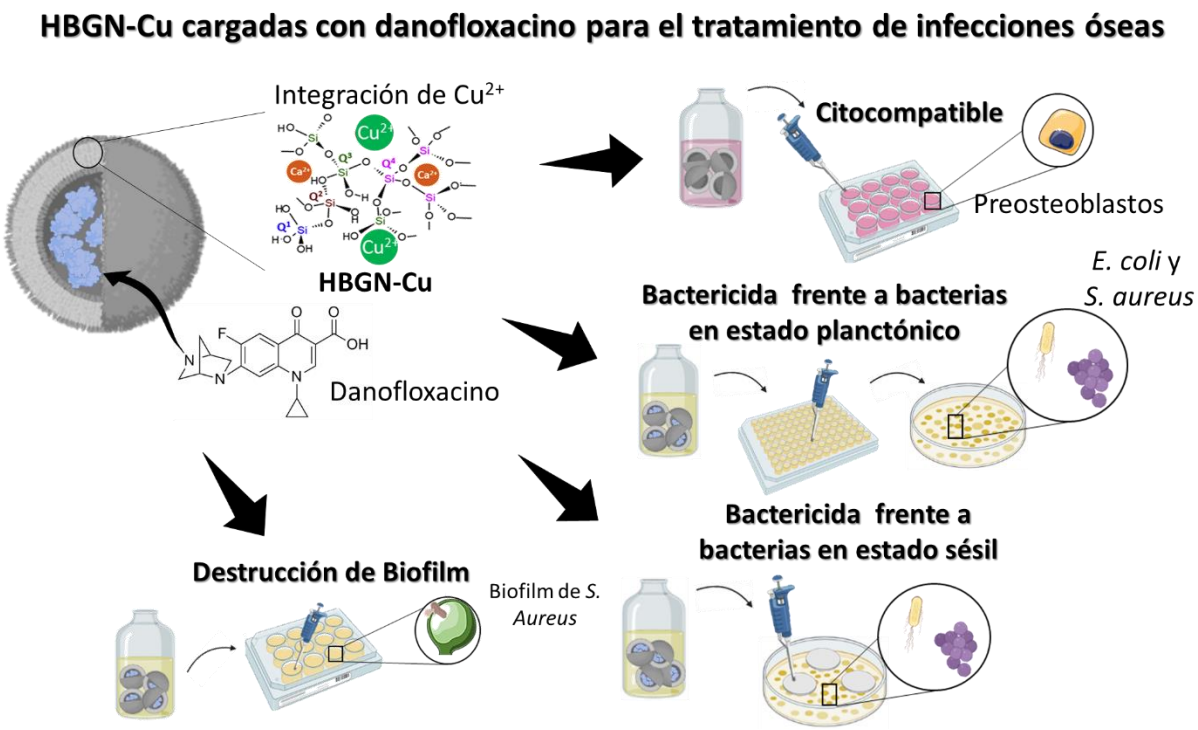
2- Se realizó la funcionalización de los MBG con grupos APTS y MPC consiguiendo superficies zwitterión en los MBG con y sin cobre en su estructura.

3- La composición 0.05% CuO_HNO_3+APTS+MPC mostró valores de proliferación celular in vitro similares a la composición 0% CuO_HNO_3+APTS+MPC y superiores al resto de los MBG sin funcionalizar.

III.2. Nanopartículas Huecas de Vidrio Bioactivo para el Tratamiento y prevención de Osteomielitis

III.2.1 Cu-doped hollow bioactive glass nanoparticles for bone infection treatment

III.2.1.1 Introducción



Esquema 5. Resumen gráfico del trabajo "Cu-doped hollow bioactive glass nanoparticles for bone infection treatment".

El procedimiento actual para tratar la osteomielitis crónica consiste en el desbridamiento, y la aplicación de un tratamiento combinado de distintos fármacos, con el fin de erradicar la población bacteriana en el defecto óseo. Sin embargo, esta estrategia no es eficaz debido a la falta de irrigación que provoca el establecimiento de una infección en un tejido que debido a su arquitectura ya posee poca irrigación vascular. No se está teniendo en cuenta que para estimular la regeneración del hueso es necesario reactivar la irrigación vascular de forma que se habilite la respuesta del sistema inmune. En muchos casos, también se debe a la presencia de una extensa capa de exopolisacáridos que aíslan a una población de bacterias del medio circundante, permitiendo incluso el desarrollo de resistencias frente a fármacos.

Ante este problema han surgido multitud de tratamientos alternativos como el empleo de plataformas de liberación local de fármacos, como por ejemplo perlas de PMMA impregnadas en antibióticos [166–169], materiales compuestos formados a partir de MBG y un polímero cargadas de antibiótico [415] y nanopartículas de sílice mesoporosa [372]. Entre los nanosistemas que más atención están atrayendo se encuentran las HBGN. Estos materiales además de presentar todas las ventajas de los MBG, presentan propiedades intrínsecas favorables debidos a su estructura en coraza y núcleo, y su escala

nanométrica. De hecho, existen numerosos estudios donde se comprueba que el mismo material en diferentes escalas desencadena una distinta respuesta celular, siendo más favorable la obtenida en presencia de materiales nanométricos [287,288]. Entre los parámetros superiores de las HBGN respecto a sus homólogos MBG nanométricos, podemos destacar la elevada superficie específica [286], permitiendo la carga de moléculas distintas en sus dos compartimentos y la liberación de estas moléculas siguiendo dos dinámicas de liberación [290], la tasa de intercambio de iones potenciada, favoreciendo el efecto terapéutico de los iones contenidos en su estructura química, así como la reactividad de la superficie del material [262], la posibilidad de aplicar un tratamiento con dicho material por vía parenteral y dirigir su localización por medio de la funcionalización de su superficie reactiva [366].

Siguiendo la misma estrategia que la empleada con los MBG, se planteó el desarrollo de HBGN enriquecido con iones cobre debido a amplio abanico de aplicaciones terapéuticas, entre las que destacamos su capacidad de promover la angiogénesis [327–329], la osteoblastogénesis e inhibir la osteoclastogénesis [330,331] y su potente efecto bactericida [336–338].

Con el objetivo de garantizar las propiedades bactericidas del nanosistema las nanopartículas se cargaron con un potente antibiótico de amplio espectro. Para ello se realizó una búsqueda de fármacos que se caracterizara por un tamaño relativamente pequeño de molécula capaz de cargarse en el interior de los poros, efectivo frente a especies bacterianas Gram + y Gram-, soluble en agua y que presentara una MIC reducida. Teniendo en mente estas características se centró la búsqueda en un antibiótico de la familia de las fluoroquinolonas**.** Teniendo en cuenta la estructura química óptima de esta familia de fármacos (**Figura 33)**, se eligió el danofloxacino (**Figura 34**).

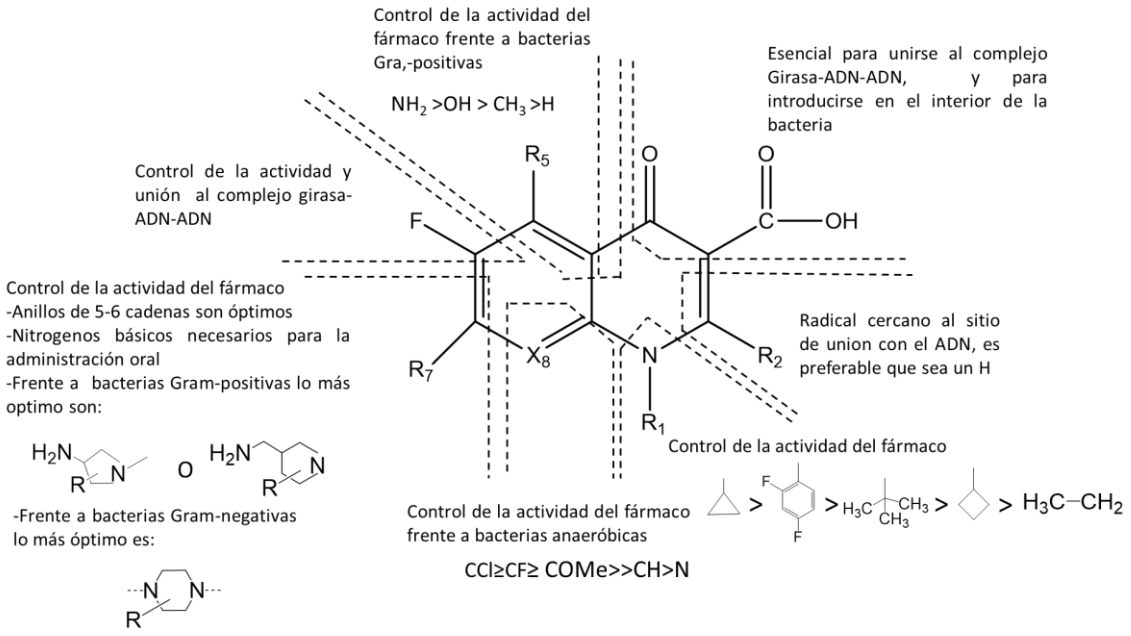


Figura 33. Estructura química de una fluoroquinolona genérica. La estructura química aparece segmentada detallando el papel que juega cada parte en su mecanismo de acción [416].

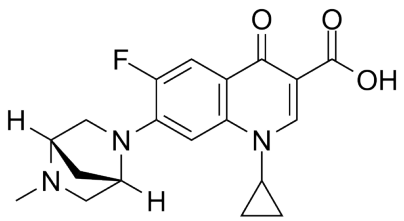


Figura 34. Estructura química del danofloxacino.

Como ocurre con las demás fluoroquinolonas, el danofloxacino posee efecto de amplio espectro, especialmente frente a *E.coli* y particularmente buena efectividad frente al género *Staphilococcus*. Este fármaco de pequeño tamaño tiene una vida media de entre 3 y 6 horas. Tiene una excelente penetración en tejidos rápida y distribución amplia [417]. Su administración local mediante una plataforma de liberación de biomoléculas como los vidrios bioactivos supone una doble ventaja al no exponer a todos los tejidos a concentraciones mucho más elevadas de las necesarias para alcanzar la MIC en la región deseada y permite minimizar los efectos secundarios de una administración parenteral.

Dado que este abordaje ha resultado una estrategia eficaz y prometedora en materiales similares con antibióticos de la misma familia [372,418,419], se estudió su efecto combinado con el efecto proporcionado por los iones Cu^{2+} liberados desde una HBGN como nanotransporte.

III.2.1.2 Resumen

En este trabajo se sintetizaron tres composiciones de HBGN con concentraciones molares crecientes de CuO (**Tabla 11**) empleando la metodología descrita por Li *et al* [275], basado en una modificación del método Stöber [273]. Dicha síntesis consiste en la formación de microemulsiones de dos surfactantes CTAB y PS-b-PAA, en una disolución acuosa catalizada por una base, a la que se le añaden los precursores de SiO_2, P_2O_5, CaO y CuO.

Tabla 11. Nomenclatura y composición (%mol) de HBGN desarrolladas.

Nomenclatura	Composición (% mol)
0% Cu-HBGN	$79.5SiO_2$─$2.5P_2O_5$─18CaO
2.5% Cu-HBGN	$79.5SiO_2$─$2.5P_2O_5$─15.5CaO─**2.5CuO**
5% Cu-HBGN	$79.5SiO_2$─$2.5P_2O_5$─13CaO─**5CuO**

Las HBGN se caracterizaron mediante TEM y EDS. Las micrografías revelaron la obtención de nanopartículas esféricas de alrededor 190 nm con una estructura de coraza y núcleo hueca, con dos tipos y tamaños de poro, un poro radial en la coraza y uno más grande en el núcleo, en las tres

composiciones. El análisis por EDS indicó que la composición atómica de las HBGN presentó un valor cercano al nominal calculado para su síntesis.

Se realizó una caracterización por adsorción de nitrógeno, que reveló isotermas de tipo IV para las tres composiciones, propias de los materiales mesoporosos y ciclos de histéresis irregulares indicando la presencia de al menos dos tipos de poros. Estos ciclos se pueden clasificar dentro del tipo H2, característicos de poros con forma de tintero.

A partir de las isotermas, se obtuvieron los valores de superficie específica y la distribución de tamaño de poro. La superficie específica más elevada se obtuvo para la composición sin dopa (825 m^2g^{-1}), como era de esperar por la participación del Cu como modificador de red. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre la superficie específica obtenida entre ambas composiciones enriquecidas con Cu (731 y 739 m^2g^{-1}). La distribución de tamaño de poros mostró la presencia de tres tipos de poros: un poro de alrededor de 1 nm, producido posiblemente por la interacción entre ambos surfactantes, poros de alrededor 2.6 nm correspondientes a los producidos por CTAB y la cavidad interior conocida como núcleo que varió de tamaño dependiendo de la composición (125-132 nm), siendo la mayor la de la composición 0% Cu-HBGN.

Los análisis por potencial ζ mostraron un entorno eléctrico de entre -28 y -13 mV, debido a la presencia de grupos silanoles presentes en la superficie del material.

Se estudió la capacidad de carga de danofloxacino en las HBGN, por medio de TG/DTA. Los resultados de termogravimetría señalaron que las composiciones con Cu, integraron mayor porcentaje de antibiótico, probablemente por una interacción entre los átomos de Cu y el danofloxacino, como se ha señalado en la bibliografía [350].

El estudio de la cinética de liberación de danofloxacino, reveló que las tres composiciones siguieron una cinética de liberación de primer orden, mostrando una liberación explosiva en el caso de la muestra 0% Cu-HBGN, mientras que las composiciones 2.5 y 5% Cu-HBGN, mostraron una liberación mucho más lenta y sostenida en el tiempo. A pesar de que las composiciones enriquecidas se cargaron de mayor cantidad de antibiótico, su liberación fue hasta 3 veces inferior que la obtenida por 0% Cu-HBGN. Estos resultados volvieron a señalar la posibilidad de una interacción entre los átomos de Cu y el danofloxacino como ya se había señalado entre los iones Cu^{2+} y miembros de la familia de las fluoroquinolonas [349].

Por otro lado, se llevó a cabo un ensayo de liberación de iones en medio α-MEM. Los resultados revelaron que las tres composiciones liberaban cantidades de Ca^{2+} y Cu^{2+} efectivas, sin resultar citotóxicas, siendo la liberación de Cu^{2+}el doble para la muestra 5% Cu-HBGN que la obtenida por 2.5% Cu-HBGN.

Seguidamente, se realizó un ensayo de citotoxicidad utilizando dos concentraciones (200 y 300 µg/mL) a 24 y 72 h, utilizando como modelo células MC3T3-E1. Este estudio mostró que el máximo tolerable de estas células era la presencia de 200 µg de HBGN, siendo más favorable la muestra 2.5% Cu-HBGN que la 5% Cu-HBGN.

Por otra parte, se estudió el fenotipo de las células tras estar en presencia con las HBGN, así como la localización de dichas HBGN en el interior citoplasmático. Con independencia de la composición, las células mostraron un fenotipo sano (*wild type*), con HBGN marcadas en su interior, ubicadas en la región perinuclear, al igual que ocurre con otras nanopartículas en la bibliografía [420,421].

Una vez determinada cuanta es la concentración máxima empleable de nanopartículas, se llevó a cabo un estudio por citometría de flujo para investigar el comportamiento celular en respuesta a la presencia de nanopartículas a largo plazo, empleando concentraciones de trabajo. Los resultados mostraron que las células a los 3 días mostraban una complejidad por encima de las mostradas por las células control, indicativo de la presencia de HBGN en el interior celular. También se analizaron los niveles de viabilidad y porcentaje de ROS, mostrando niveles comparables con las células sin tratar con HBGN. Sin embargo, si se mostraron niveles de intensidad de ROS, significativamente más elevados para aquellas células en contacto con HBGN, siendo el valor más elevado para el obtenido para la muestra 5% Cu-HBGN. Dado que los valores de viabilidad y porcentaje de ROS fueron similares al control de células, podemos afirmar que no está resultando citotóxico, pero si vemos un estrés metabólico en las células como consecuencia de la presencia de las nanopartículas, pudiendo señalar que se está produciendo un efecto de proliferación en dichas células.

El siguiente paso consistió en ensayar distintas concentraciones de HBGN, con y sin danofloxacino en un ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano en estado planctónico, utilizando como modelo bacteriano cepas de *E. coli* y *S. aureus* como representantes de bacterias Gram- y Gram +. No se observó disminución alguna en las bacterias expuestas a HBGN sin antibiótico, pues a las concentraciones empleadas la liberación de Cu^{2+}no alcanzó los valores de MIC. No obstante, cuando las nanopartículas fueron cargadas con danofloxacino, se observó una reducción de hasta el 99.9% de la población bacteriana de *E. coli* con tan solo 10 µg/mL y 20 µg/mL frente a *S. aureus*.

Por otra parte, se llevó a cabo un ensayo de inhibición del crecimiento en estado sésil frente a las mismas especies bacterianas. Nuevamente, las composiciones sin cargar con danofloxacino no mostraron halo de inhibición alguno. Frente a *E. coli* todas las composiciones cargadas, formaron halo. Sin embargo, frente a *S. aureus*, solo mostraron halo de inhibición aquellas HBGN cargadas con danofloxacino y enriquecidas con iones Cu^{2+}, indicando un efecto sinérgico entre el antibiótico y los iones Cu^{2+}.

Finalmente se testaron las HBGN cargadas con danofloxacino en un biofilm preformado de *S. aureus*. Tras una exposición de 24h a las nanopartículas, se observó una degradación cada vez más acentuada del biofilm, así como, en los niveles de bacterias destruidas conforme se incrementó el porcentaje molar de Cu en las HBGN, alcanzando una reducción de hasta un 52% respecto al biofilm control.

Estos resultados ponen de manifiesto varios puntos clave del trabajo. En primer lugar, la composición 0% Cu-HBGN, cargó menor cantidad de antibiótico, pero liberó mayores niveles de danofloxacino que las composiciones 2.5 y 5% Cu-HBGN. Estos niveles de danofloxacino, no fueron suficientes para formar halos de inhibición, ni producir una degradación tan pronunciada en el biofilm preformado de *S. aureus* como la obtenida por las composiciones con Cu en su estructura, a pesar de que las HBGN con Cu,

liberaron hasta 3 veces menos cantidad de antibiótico. Con estos resultados podemos afirmar que la liberación de Cu^{2+}mostro un efecto sinérgico dosis dependiente de la efectividad del danofloxacino frente a cepas *S.aureus*.

Teniendo en cuenta que los ensayos de citotoxicidad posicionaron a la composición 2.5% Cu-HBGN como la composición con Cu más citocompatible, y una de las más efectivas en la eliminación de poblaciones bacterianas, los autores consideran que la composición 2.5% Cu-HBGN es el candidato óptimo como nanosistema de liberación de fármacos para el tratamiento de infecciones en el tejido óseo.

pharmaceutics

MDPI

Article

Cu-Doped Hollow Bioactive Glass Nanoparticles for Bone Infection Treatment

Javier Jiménez-Holguín [1], Sandra Sánchez-Salcedo [1,2,*], Mónica Cicuéndez [1], María Vallet-Regí [1,2] and Antonio J. Salinas [1,2,*]

[1] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, UCM, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Imas12, 28040 Madrid, Spain; javiej03@ucm.es (J.J.-H.); mcicuendez@farm.ucm.es (M.C.); vallet@ucm.es (M.V.-R.)

[2] Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: sansanch@ucm.es (S.S.-S.); salinas@ucm.es (A.J.S.)

Abstract: In search of new approaches to treat bone infection and prevent drug resistance development, a nanosystem based on hollow bioactive glass nanoparticles (HBGN) of composition 79.5SiO_2-(18-x)CaO-2.5P_2O_5-xCuO (x = 0, 2.5 or 5 mol-% CuO) was developed. The objective of the study was to evaluate the capacity of the HBGN to be used as a nanocarrier of the broad-spectrum antibiotic danofloxacin and source of bactericidal Cu^{2+} ions. Core-shell nanoparticles with specific surface areas close to 800 m^2/g and pore volumes around 1 cm^3/g were obtained by using hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) and poly(styrene)-block-poly(acrylic acid) (PS-b-PAA) as structure-directing agents. Flow cytometry studies showed the cytocompatibility of the nanoparticles in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cell cultures. Ion release studies confirmed the release of non-cytotoxic concentrations of Cu^{2+} ions within the therapeutic range. Moreover, it was shown that the inclusion of copper in the system resulted in a more gradual release of danofloxacin that was extended over one week. The bactericidal activity of the nanosystem was evaluated with *E. coli* and *S. aureus* strains. Nanoparticles with copper were not able to reduce bacterial viability by themselves and Cu-free HBGN failed to reduce bacterial growth, despite releasing higher antibiotic concentrations. However, HBGN enriched with copper and danofloxacin drastically reduced bacterial growth in sessile, planktonic and biofilm states, which was attributed to a synergistic effect between the action of Cu^{2+} ions and danofloxacin. Therefore, the nanosystem here investigated is a promising candidate as an alternative for the local treatment of bone infections.

Keywords: hollow nanoparticles; mesoporous glasses; copper; antibacterial; infection; pre-osteoblasts

check for updates

Citation: Jiménez-Holguín, J.; Sánchez-Salcedo, S.; Cicuéndez, M.; Vallet-Regí, M.; Salinas, A.J. Cu-Doped Hollow Bioactive Glass Nanoparticles for Bone Infection Treatment. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 845. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040845

Academic Editor: Helena Tomás

Received: 31 March 2022
Accepted: 11 April 2022
Published: 12 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The self-healing capacity of the skeletal system is impaired in certain clinical situa-tions, for instance, in bone defects greater than 50% of the diameter of bone (1–2 cm) [1] or when there is not an adequate osteoblast/osteoclast balance [2]. The situation worsens when the bone tissue is exposed to the environment as the result of an open wound. In those cases, bacterial infections may occur, caused in most cases by Gram-positive cocci. Indeed, more than 60% of cases are due to the Staphylococci genus [3]. Once bacterial colonization in bone occurs there are three possible outcomes: the resolution of the infection, the conversion of the bacteria to a quiescent phenotype, or the formation of a chronic infection [4]. In the latter case, the usual procedure consists of treatment with several bactericidal drugs for a prolonged period of time either parenterally or orally, reaching very high systemic concentrations to achieve the minimum inhibitory concentration in bone [5–8]. In 20% of cases, treatment fails [9], due to: (i) the formation of a dense layer of exopolysaccharides generated by bacteria, known as biofilm, which provides protection against the effect of antibiotics [10,11], (ii) the formation of small variant colonies (SCVs) with low metabolism

that elude the effect of antibiotics [12–14] and (iii) the emergence of antibiotic-resistant strains as a consequence of the selective pressure in the natural environment [15]. Due to the difficult access to the infected tissue inside, surgeries are often used in which the necrotic tissue must be removed and, when the bone defect that occurs is large, a bioactive material must be applied to support and promote healing, such as a scaffold or a bioactive glass-based paste [16]. In severe cases, is necessary to remove the limb to prevent the infection from spreading [17].

Bioactive glasses, discovered in 1971, are characterized by binding strongly to bone without the fibrous capsule formed being detected when non-bioactive materials are implanted. Indeed, such capsules cause the failure of many implants [18]. Later on, bioactive glasses with improved properties for bone regeneration were obtained by using wet synthesis methods, such as sol–gel processing. When surfactants were included to act as templates, the so-called mesoporous bioactive glasses (MBG) were obtained, most of them in the SiO_2-CaO-P_2O_5 system [19]. One of the latest advances in this field includes the development of hollow bioactive glass nanoparticles (HBGN) that exhibit additional capabilities compared with MBG including parenteral administration, increased textural properties, low toxicity and easy excretion [20]. These nanoparticles have a structure composed of the shell and a core hat that is achieved by employing two structure-directing agents: hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) used to obtain the radial mesoporous order and poly(styrene)-block-poly(acrylic acid) (PS-b-PAA) to obtain the core and the internal porosity [21]. The HBGN's structure results in a high specific surface area and pore volume that enables it to transport biomolecules and release them in a sustained manner in aqueous media [22–24]. Bioactive SiO_2-CaO-P_2O_5 glasses have a reactive surface that, when in contact with body fluids, leads to nucleation and formation of a hydroxycarbonate apatite (HCA) phase [25,26] similar to the mineral component of bone, thus favoring its binding to bone. The release of ions from these glasses promotes the proliferation and differentiation of the cells involved in osteogenesis [25]. The surface of these materials has plenty of silanol groups that allow functionalization with organosilanes accompanied by different functional groups (amine, carboxyl, thiol, etc.) and, thus, modify their surface properties and increase their therapeutical applications [27,28].

Another characteristic of the glasses is the possibility of incorporating in their structure metals with therapeutic capabilities, such as silver [29], zinc [30], cobalt [31] or copper [32], among others. It is well known in the literature the ability of copper to induce angiogenesis by stimulating the production of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) [33] and vascular endothelial growth factor (VEGF) [34,35]. Moreover, copper ions have the ability to increase the differentiation of mesenchymal cells towards osteogenic lines [36] and to inhibit osteoclast activity [37]. Copper ions also participate in the crosslinking of the collagen fibers necessary for bone ossification [38,39]. In addition, the bactericidal activity of copper against *E. coli*, *B. subtilis* and *S. aureus* has been described in the literature [40,41]. Although the mechanisms of action are still under discussion, it has been reported that Cu^{2+} ions bind to the bacterial cell wall by electrostatic attraction, due to the fact that the bacterial wall is densely populated by negatively charged peptidoglycan molecules, the attraction being greater for Gram-negative bacteria [42]. This leads to a solidification of the structural proteins that compose it, irreversibly damaging it [43,44]. The damage may be mediated by the production of reactive hydroxyl radicals that are known to be involved in numerous reactions detrimental to proper cell development, such as oxidation of proteins and lipids [45].

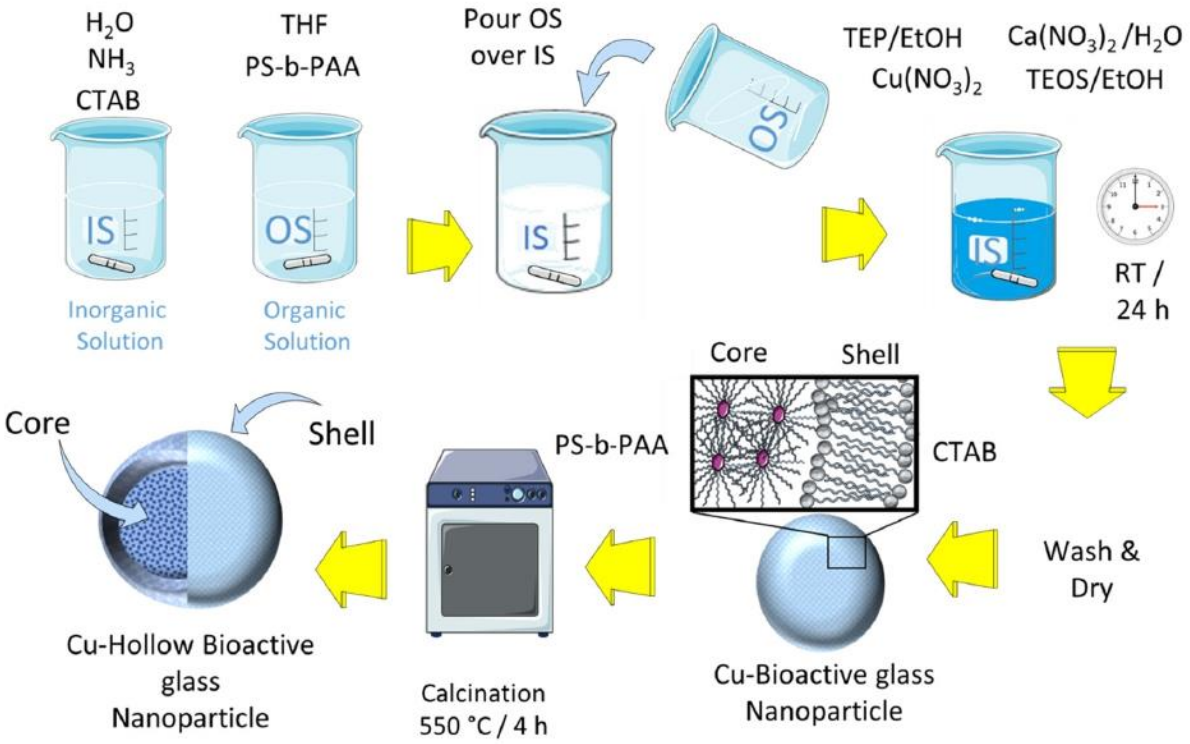
The present work is focused on the development of HBGN within the SiO_2-CaO-P_2O_5 system enriched with CuO (0, 2.5 or 5 mol-%). Their cytocompatibility with MC3T3-E1 osteoprogenitor cells will be studied. Moreover, the antibacterial efficacy of the three nanosystems before and after loading with danofloxacin will be evaluated. Danofloxacin is an antibiotic of the family of fluoroquinolones actives against most of the Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella*, and *Salmonella*, as well as some Gram-positive ones, including *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* [46]. Danofloxacin

was selected due to its small size, broad spectrum effect and low minimal inhibitory concentration (MIC) [47]. Finally, the antibacterial efficacy of our nanosystem loaded with danofloxacin against *E. coli* and *S. aureus*, as the Gram-negative and -positive bacteria models, respectively, in sessile and planktonic states will be investigated. The global aim of this study is the search of alternative therapies for the treatment of acute and chronic bone infections.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of the Nanoparticles

Three HBGN compositions were synthesized with increasing amounts of copper within the 79.5SiO_2-(18-x) CaO-2.5P_2O_5-xCuO (x = 0, 2.5, 5 mol-% CuO) system using the protocol described by Li et al. [21]. This methodology consists of preparing an emulsion of an organic/aqueous solution in which two structure directing agents are dissolved: CTAB and PS-b-PAA of an average molecular weight, M_n 38,000 Da, 20 wt-% PAA. On the one hand, an inorganic solution (IS) was prepared by dissolving CTAB and concentrated NH_3 in distilled water, while in another container an organic solution (OS) was prepared by dissolving PS-b-PAA in tetrahydrofuran (THF), keeping both mixtures under stirring at 37 °C for 30 min to later pour, abruptly, the OS over the IS, leaving it under stirring for 20 min. Subsequently, the appropriate amounts of triethyl phosphate (TEP), $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $Cu(NO_3)_2 \cdot 2.5H_2O$ and tetraethyl orthosilicate (TEOS), previously dissolved in ethanol, for TEP and TEOS, or water, for $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, were added sequentially and spaced in time by 20 min. The mixture was kept stirring for 24 h at 37 °C and covered with Parafilm to avoid evaporation. The resulting product was centrifuged at 12,000 rpm for 12 min at 4 °C and washed once with H_2O and twice with H_2O/ethanol (50%). After 24 h of drying at 30 °C, the samples were calcined 4 h at 550 °C using a ramp of 1 °C/m. The steps carried out during the synthesis process are shown in Scheme 1 and the amounts of reactants used are shown in Table 1. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).



Scheme 1. Synthesis procedure of the Cu-doped hollow bioactive glass nanoparticles (HBGN).

Table 1. Quantities of reagents used. TEP and TEOS were previously dissolved in 1.4 mL of ethanol, while Ca $(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ was dissolved in 1.4 mL of water.

Samples	H_2O (mL)	CTAB (mg)	NH_3 (mL)	THF (mL)	PS-b-PAA (mg)	TEP (µL)	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (mg)	$Cu(NO_3)_2 \cdot 2.5H_2O$ (mg)	TEOS (µL)
0% Cu-HBGN	64.75	140	2.1	14	70	22	109	-	455
2.5% Cu-HBGN	64.75	140	2.1	14	70	22	93	14	455
5% Cu-HBGN	64.75	140	2.1	14	70	22	77	29	455

2.2. Physicochemical Characterization

To evaluate the textural characteristics of the materials and verify their suitability for this study, they were characterized by nitrogen adsorption-desorption using a Micromeritics 3 Flex (Norcross, GA, USA) that allows the specific surface, S_{BET}, to be obtained by the Brunauer–Emmett–Teller method (BET) [48] and pore size distribution using the Barret–Joyner–Halenda method (BJH) [49]. The structure of the nanoparticles could be analyzed using transmission electron microscope (TEM) micrographs in a JEM-1400 JEOL operating between 40 and 120 kV (Tokyo, Japan). Energy dispersive X-ray fluorescence (EDS) was carried out with a CCD camera (KeenVIEW) operating at 120 kV in combination with TEM to determine the atomic composition of the samples. The intensity of the static electric field of the nanoparticles was determined using a Zetasizer Nano-ZS dynamic light scattering device (DLS) (Malvern Instruments, Malvern, UK).

2.3. Ion Release Assay

Ion release assay was performed in α-MEM at 37 °C. A 12 transwell plate with two different compartments (sample and analysis) was employed for the experiment. Both compartments are separated by a membrane (12 kDa molecular weight) that only allows the diffusion of antibiotic and medium. A sample of 4.15 mg of each HBGN composition was suspended in 0.5 mL of α-MEM and was placed in the sample compartment, and 2 mL of fresh α-MEM was placed in the analysis compartment. An aliquot of α-MEM located in the analysis compartment was extracted and refilled at 2, 24, 48, 72 and 144 h. The cumulative concentrations of Ca^{2+}, and Cu^{2+} in the culture medium were obtained by inductively coupled plasma/optical spectrometry (ICP/OES) using an OPTIMA 3300 DV device (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Three measurements were made on each of the two replicates per composition examined.

2.4. Loading and Release of Danofloxacin

The three HBGN compositions were loaded with danofloxacin (5 mg of HBN and 0.6 mg of danofloxacin in 10 mL of pure ethanol) for 24 h at 4 °C under stirring and darkness. The resulting product was centrifuged at 10,000 rpm at 4 °C for 10 min. After this, it was washed twice with 5 mL of pure ethanol, allowed to dry at 30 °C for 24 h. The amount of danofloxacin loaded was determined by thermogravimetric studies and differential thermal analysis (TG/DTA) in a dynamic air atmosphere between 110 °C and 600 °C with a ramp of 5 °C/min, air flow: 100 mL/min) in a Perkin Elmer Pyris Diamond system (Waltham, MA, USA).

The danofloxacin release was carried out in phosphate-buffered saline (PBS) medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) at 37 °C and physiological pH of 7.4. A 12 transwell plate was employed for the experiment. A measure of 0.5 mL of a suspension of HBGN loaded in PBS (2 mg/mL) was placed in the sample compartment and 1.5 mL of fresh PBS in the analysis compartment. PBS placed in the analysis compartment were collected and refilled every 30 min the first day until 6 h, then every hour the second day, every 2 h the third day and go on, up to 6 d. Collected samples were measured by fluorescence spectroscopy using a Biotek Powerwave XS fluorimeter (version 1.00.14 of the Gen5 program). For danofloxacin, λ_{ex} = 280 nm and λ_{em} = 430 nm were used

in the fluorimeter. Three measurements were made on each of the two replicates per composition examined.

2.5. In Vitro Assays in Pre-Osteoblastic Mammalian Cells

All the tests were carried out under sterility, for this, the nanoparticles were irradiated with ultraviolet light for 20 min. Pre-osteoblastic cells from MC3T3-E1 mice (subclone 4, CRL-2593; ETCC, Manassas, VA, USA) were used for these tests. Cells were cultured in a supplemented culture medium, α-MEM with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), 1% penicillin-streptomycin and 5 mM L-glutamine (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) with a saturation of 5% CO_2 at 37 °C. Cells were washed with PBS, pH 7.4, and harvested with 5 mL of 0.25% trypsin-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The cell suspension was centrifuged for 10 min at 1200 rpm. The resulting cells were resuspended with fresh supplemented media.

2.5.1. Cytotoxicity Assays in Pre-Osteoblastic Mammalian Cells

For this test, three replicates were arranged for the control and three for each material. The 1×10^4 cells/mL MC3T3-E1 were exposed to two concentrations of nanoparticles (200 µg/mL and 300 µg/mL) for 2 h at 37 °C and in an atmosphere with 5% CO_2. After this period, the cells were washed with PBS and were incubated again with fresh supplemented medium for 24 and 72 h. The cytotoxicity of the material was evaluated by means of cell proliferation, for this the MTS methodology (CellTiter 96 AQueous Assay (Promega, Madison, WI, USA) based on the reduction of compound 3[4,5-dimethylthiazole- 2-yl]-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) by mitochondrial NADH using an intermediate electron acceptor, phenazine ethyl sulphate (PES) [50].

For this purpose, the culture medium was removed, the cells were washed with PBS, 100 µL of supplemented culture medium, 20 µL of MTS solution were added and the cells were incubated for 3 h at 37 °C and 5% CO_2. After this incubation, the resulting product was collected for analysis on the Helios Zeta UV–Vis spectrophotometer at a wavelength of 490 nm.

2.5.2. Internalization of HBGN and Morphology Studies

To observe the location of the HBGN inside the cells, HBGN labelled with fluorescein-5-isothiocyanate (FTIC) were synthesized. For this, 2.2 µL of (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTS) was mixed with 2 mg of FTIC previously dissolved in 200 µL of ethanol and incubated under shaking and darkness for 2 h. After this incubation, 2.4 µL of this resulting solution was mixed with 1.38 µL of ethanol and 455 µL of TEOS. This mixture was added during the HBGN synthesis described in Section 2.1, performing the remaining synthesis process in the dark. To remove the surfactant, 50 mg of HBGN labelled with FTIC were mixed with 20 mL of extractor solution (20 g of NH_4NO_3 dissolved in 1 L of ethanol) and 20 mL of ethanol, under reflux and dark at 85 °C for 4 h. The resulting product was centrifuged at 12,000 rpm at 15 °C for 10 min, to later carry out one wash with ethanol, two with THF and finally, one wash with ethanol. The resulting material was left to dry at 60 °C for 24 h for its later use.

HBGN samples labelled with FTIC were put in contact with 5×10^4 cells of the MC3T3-E1 line at a concentration of 200 µg/mL for 2 h at 37 °C and 5% CO_2. After this time, the cells were washed with PBS and incubated 24 h at 37 °C and 5% CO_2. The next step consisted of fixing with ethanol (75% purity) for 2 min at 37 °C, then Phalloidin-ATTO 565 (1:40 dilution, Molecular Probes) was added for 10 min in the dark. The medium was re-removed for Fluoroshield staining with 2- (4-amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride (DAPI) (1:1000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min in the dark. Finally, each well was washed twice and kept in PBS until microscopic analysis. The images were obtained with an EVOS FL Cell Imaging System inverted optical microscope equipped with three types of led light (IEX (nm); IEM (nm)): DAPI (357/44; 447/60), GFP

(470/22; 525/50), RFP (531/40; 593/40) from AMG (Advance Microscopy Group, Bothell, WA, USA). The red channel was used to observe the cytoskeleton, blue, to observe the cell nucleus and the green to see HBGN.

2.5.3. Flow Cytometry Assays

For this tests, 2.5×10^4 MC3T3-E1 cells were seeded with 2 mL of supplemented medium per well. Three replicas for sample were employed, whereas four replicas of control cells were used, one for each assay condition. At 24 h after the seeding, cells were washed with PBS and 50 µg/mL of each HBGN composition, dispersed in supplemented medium, were added for 3 d. A total of 10^5 cells were analyzed in each sample in order to ensure a correct statistical significance. Analysis were carried out in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

2.5.4. Cell Size and Complexity Analysis

Cell size and complexity in presence of each HBGN composition were researched. For that, forward-scatter angle (FSC) and side-scatter angle (SSC) were analyzed.

2.5.5. Cell Viability, Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) Content

ROS intracellular content was determined by addition of 100 µM 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCFH/DA) at 37 °C for 40 min. Cell viability was evaluated by adding 0.005% (wt/vol) propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS into the samples to stain the dead cells. DCF fluorescence was excited at 488 nm and measured with a 530/30 nm band pass filter, meanwhile PI fluorescence was excited at 488 nm and the emission was measured with a 670 nm LP.

2.6. In Vitro Microbiology Assays

For these studies, Gram-negative Escherichia coli (ATCC25922) and Gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) were used as bacteria models. To work with them, lysogeny broth media (LB) and Todd Hewitt Broth medium (THB) were used, as well as LB agar plates and tryptone-soy agar (TSA), respectively. With the help of a seeding loop, a colony of each species was inoculated into 20 mL of their respective culture medium to incubate them for 24 h at 37 °C while shaking. The resulting suspension was diluted 1/10 in fresh medium and incubated again at 37 °C until obtaining an optical density (OD) of 0.4 at 600 nm, thus estimating a concentration of 2×10^8 colony forming units (CFUs)/mL with which to perform the rest of the tests.

2.6.1. Bacterial Growth Inhibition Tests in the Planktonic State

The HBGN without loading and loaded with danofloxacin, were diluted to different concentrations in 96-well plates, arranging 3 replicates per material in such a way that 200, 100 and 10 µg/mL were tested: and 260, 130 and 20 µg/mL for *E. coli* and *S. aureus*, respectively, with a final concentration of 7.1×10^5 CFUs/mL for both bacterial strains. The bacteria were kept in culture at 37 °C and under shaking conditions while aliquots were extracted at 24 h. These aliquots were serially diluted until obtaining 10^{-10} dilutions in the case of controls and unloaded samples; and up to 10^{-4} in the samples loaded with danofloxacin, to finally sow 4 drops of 10 µL per dilution on agar plates that were kept in static incubation at 37 °C for 24 h. Once this period had passed, the number of CFUs were counted and the dilution factor was applied. Minimum bactericidal concentration (MBC) was determined by the lowest concentration of antibacterial agent that reduces the viability of the initial bacterial inoculum by 99.9%.

2.6.2. Halo Inhibition Assays

The unloaded and danofloxacin-loaded HBGN were introduced into PBS at concentrations of 300, 200 and 100 µg/mL in a 12-well plate, using 3 replicates per control and samples. At 6 and 24 h of incubation at 37 °C, 50 µL aliquots were loaded with sponges, in

the form of 9 mm discs, which were placed on agar plates pre-seeded with the bacterial strains *S. aureus* or *E. coli*. After addition, these plates were statically incubated at 37 °C for 24 h. Subsequently, the diameters of the bacterial growth inhibition halos from the sponge used were analyzed.

2.6.3. Biofilm Degradation Assay

Measures of 2 × 10^8 CFUs/mL of *S. aureus* were seeded in 12-well plates with a circular glass slide and cultured with THB enriched with 4% sucrose at 37 °C under shaking (100 rpm) for 24 h. Afterwards, this medium was replaced with fresh medium without sucrose and it was kept for another 24 h until the biofilm was obtained. The slides with the biofilm were transferred to 12-well plates with transwell and 200 µg/mL of the three danofloxacin-loaded HBGN compositions. After 24 h of incubation with shaking at 37 °C, the biofilms were extracted and stained using the BacLight bacterial viability kit (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, USA). Images were obtained by means of an OLYMPUS FV1200 laser confocal microscope (OLYMPUS, Tokyo, Japan), using 60× FLUOR immersion lenses in water (NA = 1.0). The micrographs were obtained using the 3D Imaris software that was used to convert each of the 2D images into 3D micrographs, using the Z sections and an algorithm that shows the maximum pixel value of each 1 mm Z cut. Live bacteria were observed in green (SYTO 9), dead ones in red (PI) and the biofilm matrix in blue (Calcofluor).

2.7. Statistical Analysis

The results were expressed as a measure of mean standard deviation (SEM). Statistical analysis was performed with the non-parametric Kruskal–Wallis test and Dunn's post hoc test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of the Microstructure of the Nanoparticles

The thermogravimetric analysis confirmed the complete elimination of both surfactants (CTAB and PS-b-PAA) from the three HBGN compositions (results not shown), which during the article will be named as 0%, 2.5% and 5% Cu-HBGN.

The nanoparticles were physicochemically characterized. TEM analysis allowed us to verify their nanostructure and EDS to find out if the copper ions were incorporated into the glass structure. The TEM micrographs depicted in Figure 1 show non-aggregated hollow nanospheres with a diameter of 190 ± 65 nm. Table 2 includes the values for each case showing that no significant differences were observed between the sizes obtained from the different compositions. As can be seen in the figure, HBGN are compartmentalized in what is known as "core" and "shell" nanostructures. The images show that the core occupies between 60–70% of the size of the nanoparticles. Moreover, radial pores can be observed in the shell, the formation of which was attributed to the use of CTAB in their syntheses whereas the core was formed by the presence of the second surfactant, that is, PS-b-PAA.

Table 2. Physicochemical properties of HBGN obtained by TEM, DLS, ζ potential, N_2 adsorption, TG/DTA and EDS. The error of the mean values represents a coefficient of variation of <7% for each experimental value in the table.

Samples	TEM (nm)	ζ Potential (mV)	S_{BET} (m^2 g^{-1})	V_P (cm^3 g^{-1})	D_P (nm)	Danofloxacin Loaded (wt-%)	Atomic Composition (EDS) (wt)%			
							Si	P	Ca	Cu
0% Cu-HBGN	193 ± 65	−22.1 ± 4.8	826	1.22	2.4	4.2 ± 2.9	87.5 (75.5)	0.3 (2.5)	12.1 (18)	0
2.5% Cu-HBGN	188 ± 24	−23.5 ± 4.9	731	0.85	2.6	5.4 ± 2.6	90.5 (79.5)	0 (2.5)	7.1 (15.5)	2.6 (2.5)
5% Cu-HBGN	204 ± 48	−22.8 ± 4.8	739	0.75	2.6	5.0 ± 0.5	86.3 (79.5)	0.1 (2.5)	8.8 (13)	4.8 (5)

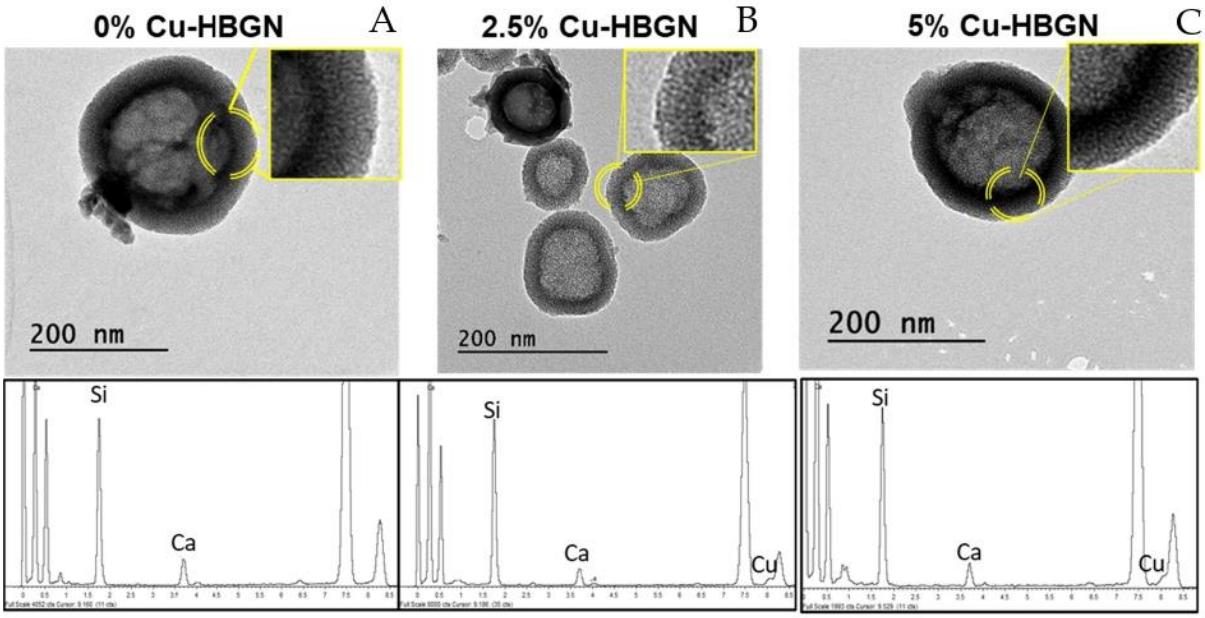


Figure 1. TEM micrographs and the corresponding EDS spectra of 0 (**A**), 2.5 (**B**) and 5% Cu-HBGN (**C**). A magnification of the shell-core zone shows pores with two different morphologies, consequences of the two surfactants used in the synthesis.

Furthermore, EDS analysis allowed us to determine the atomic percentage of copper incorporated into the HBGN structure. The results are gathered in Table 2, obtaining values very close to the nominal calculated. It should be noted that the incorporation of phosphorus was so low that it is below the detection limits of the technique. Phosphorus integration is usually reduced due to the slow hydrolysis rate of the phosphorus precursor TEP [51]. Despite the low incorporation rate also observed in other works [52,53], it was decided to keep the addition of TEP as it allows a higher incorporation of calcium into the nanoparticles [53].

Figure 2A shows the isotherms obtained from the N_2 adsorption. The three HBGN compositions are characterized by an adsorption isotherm type IV characteristic of mesoporous materials, and irregularly shaped hysteresis cycles revealing the presence of at least two types of pores. These cycles can be classified as H2 types, characteristic of inkwell-shaped pores [54]. Probably, the pores located inside the nucleus are connected with the radial pores located in the "shell", as previously indicated in the bibliography [21,55]. All three HBGN compositions exhibited a specific surface area of more than 700 $m^2\ g^{-1}$ (Table 2). The highest specific surface area was obtained for the Cu-free composition 825 $m^2\ g^{-1}$, as opposed to the Cu-enriched compositions that present 731 and 739 $m^2\ g^{-1}$. These results show that HBGN-Cu shows superior textural properties to the other nanoparticles [56–58], nanoparticles doped with other therapeutic ions [59–62], and even other hollow nanoparticles [63–65]. The same occurred with the pore volume, which decreased from 1.22 to 0.75 $cm^3\ g^{-1}$. The slight decrease in textural properties is an expected result, considering previous work in the literature in which metal ions were included as modifiers in the silica network [30,31,66,67]. Furthermore, pore size, increased slightly. However, the textural properties obtained between the Cu-doped and undoped compositions were similar, and their difference does not represent a significant loss in their potential application. Figure 2B shows the presence of three maxima: a maximum of about 1 nm in the three compositions that can be attributed to a type of pore produced by the interaction between the two surfactants; the maximum around 2.6 nm corresponding to the pore produced by CTAB; and a third maximum that varies depending on the composition due to the inner cavity called "core". This last cavity was larger in the Cu-free composition.

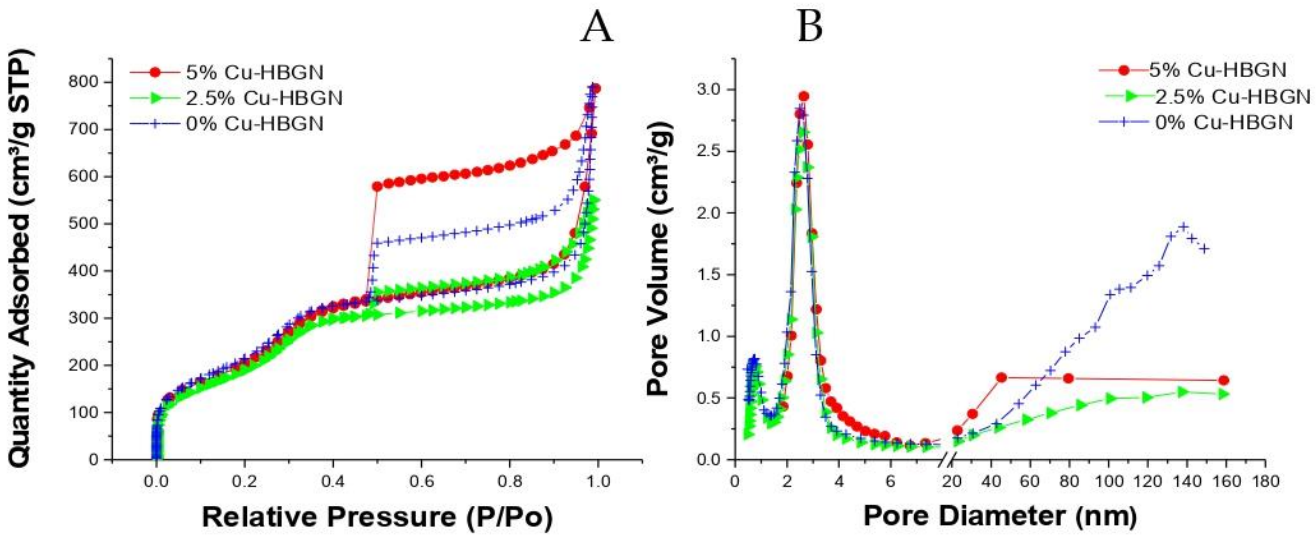


Figure 2. (**A**) Nitrogen adsorption-desorption isotherms and (**B**) pore size distribution of 0, 2.5 and 5% Cu-HBGN.

The electrical environment of the HBGN, was studied by ζ potential. The three compositions revealed a negative charge of between −28.4 and −17.3 mV, a characteristic that has been shown to increase proliferation and the rate of bone formation [68,69]. Surface silanol groups are responsible for said negative charge, a typical characteristic of bioglasses, which allows for the possibility of functionalizing the said material to increase its therapeutic applications [70].

To investigate the adsorption capacity of the HBGN and their use as a nanocarrier, HBGN were loaded with danofloxacin. The amount loaded in the HBGN was determined by TG/DTA. Table 2 shows the amount of danofloxacin loaded inside the HBGN. As can be seen, the adsorption of danofloxacin is similar in the three compositions, being slightly higher in those doped with Cu. In the literature, it is described that the incorporation of Cu into the MBG increases the loading capacity of certain drugs [71]. In our case, this may be due to the interaction between the Cu^{2+} ions present in the silica network with danofloxacin, in the same way as occurs with other fluoroquinolones [72].

3.2. Ions Release Assay

Results of sample ion release are depicted in Figure 3. As shown below, the release profile of Ca is typical of mesoporous bioactive glasses with two differentiate stages: a quick release of ion products and followed by a release–precipitation equilibrium. The three samples released similar amounts of Ca^{2+} ions independently of the percentage of Cu content, reaching values of 72.7 ± 2 mg/L at 6 d. Maeno et al. [73] showed that concentrations exceeding 10 mM (40,078 mg/L) of calcium were cytotoxic to osteoblasts. Those results indicate Ca^{2+} release from the three HBGN belong to the cytocompatible range. As can be seen in the Cu-doped compositions, the release of Cu^{2+} ions continued even after 7 d, but the amount of Cu^{2+} released decreased after the third day, reaching a cumulative amount maximum of 31.6 ± 2 and 9.8 ± 0.1 mg/L for the 5 and 2.5% Cu-HBGN compositions, respectively. Both amounts are below the cytotoxicity threshold, 152 mg/L [74]. The ion release for the three compositions are promising when reaching active concentrations without becoming cytotoxic.

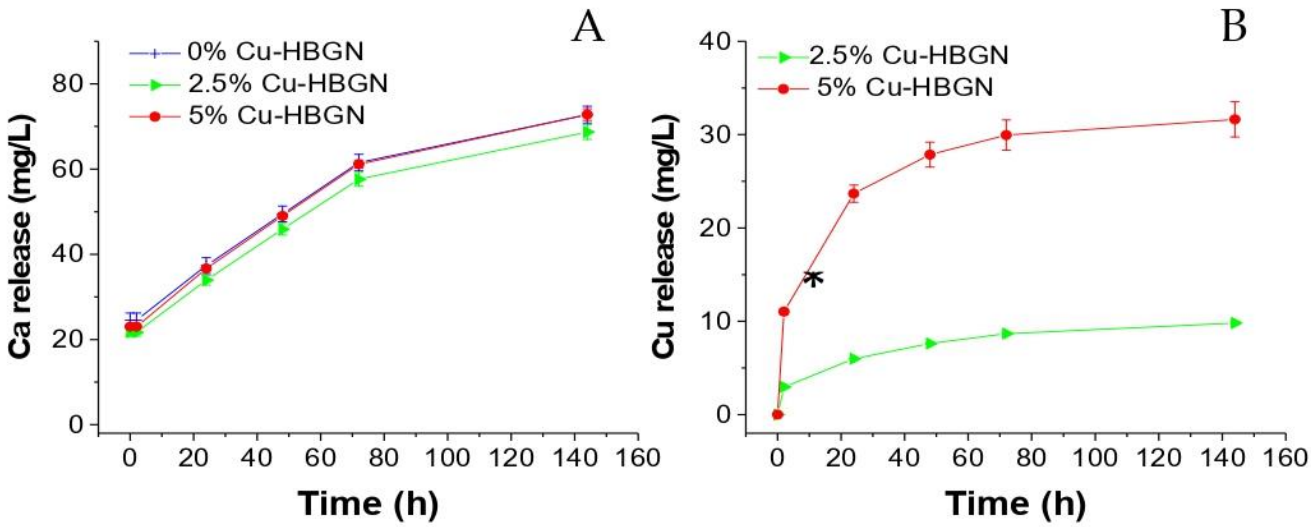


Figure 3. Cumulative release of calcium (**A**) and copper (**B**) from HBGN up to 6 d soaked in α-MEM. Data standardized to a release of 1 mg/mL of HBGN. * Significant differences between 2.5 and 5% Cu-HBGN ($p < 0.05$).

3.3. Danofloxacin Release Assay

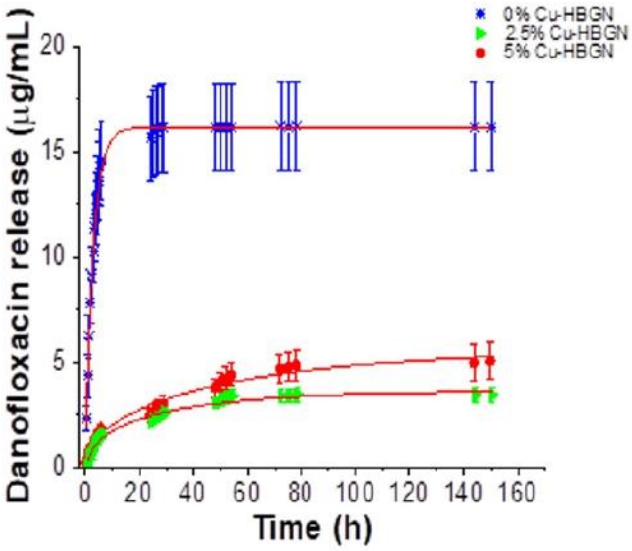
The cumulative release of danofloxacin from each composition and the parameters of the danofloxacin release kinetics from HBGN samples are collected in Figure 4. Antibiotic release kinetics from HBGN were evaluated according to first-order kinetics model (1) with an empirical non-ideality factor (δ) [75].

$$\frac{W_t}{W_0} = \left(\frac{W_t}{W_0}\right)_{\max} \left(1 - e^{k_1 t}\right)^{\delta} \quad (1)$$

where W_t/W_0 is the percentage of antibiotic released at time t and k_1, the release constant. δ values are 1 for first-order kinetic material. δ gives an approximation of the degree of fidelity of the proposed model to the theoretical first-order kinetic. The release profile of danofloxacin from the 0% Cu-HBGN composition was characterized by a rapid release in the first 8 h. After 24 h, a slower and sustained release is observed until 3 d, at which time the amount of danofloxacin released decreased considerably, reaching a maximum value of 16 µg/mL. Figure 4 shows that this release represented 77% of the total amount of danofloxacin loaded, which means that another 23% remained, hypothetically, inside the core of the nanoparticles. These data corroborate those obtained by Li [21], in which a two-step release is described: a rapid and abrupt release from the radial pore of the shell, and a slow and sustained release from the core.

Regarding Cu-doped samples, that samples exhibited a slower release but without depleting the amount of copper released, in fact, the trend indicates that the release continued after 7 d. As expected from their textural properties, there were no significant differences in the release obtained between the 2.5 and 5% Cu-HBGN compositions, reaching maximum values of 3 and 5 µg/mL. However, an upward trend was observed for the release of danofloxacin obtained by the 5% Cu-HBGN composition. A remarkable aspect was that the copper-doped compositions released 12 and 20% of the total danofloxacin loaded, which means that the Cu incorporation was affecting the release of danofloxacin. That interaction is taking place between Cu^{2+} cations with danofloxacin, in the same way that it occurs between said cations with different fluoroquinolones, that is, antibiotics of the same family as danofloxacin [72]. All compositions released enough amounts of antibiotic to exceed the MIC of 0.03 and 0.12 µg/mL for *E. coli* and *S. aureus*, respectively [47], in less than 8 h. However, the concentrations obtained above the MIC were maintained until 25 h for 0% Cu-HBGN, 50 h for 2.5% Cu-HBGN and 72 h for 5% Cu-HBGN. This interaction is far from being a problem, it guarantees that a burst release does not occur as if it is occurring

with 0% Cu-HBGN. Instead, it is more advantageous to obtain a sustained release and sufficiently concentrated to overcome the MIC for a longer time, managing to eliminate the entire bacterial population and thus avoid the appearance of resistant strains.



Samples	W_o	$(W_t/W_o)_{max}$ (%)	K_1 ($10^3 h^{-1}$)	δ	R
0% Cu-HBGN	4.2	77	0.38	1.05	0.99
2.5% Cu-HBGN	5.4	12	0.02	0.48	0.98
5% Cu-HBGN	5.0	20	0.01	0.5	0.98

Figure 4. Cumulative release of danofloxacin from HBGN up to 6 d soaked in PBS and parameters of danofloxacin release kinetics from nanoparticles. Wo: initial loaded mass (% of antibiotic loaded); $(W_t/W_o)_{max}$: maximum relative release; K_1: constant of Chapman model release rate; δ: non-ideality factor in Chapman model and R: goodness of fit.

3.4. Cells Assays

3.4.1. Cytotoxicity Assays in Pre-Osteoblastic Mammalian Cells

Once the samples were characterized, cell assays were carried out to study whether these materials could affect the cellular proliferation process of the pre-osteoblastic line MC3T3-E1 cells. Cell proliferation is a biological parameter widely used to test the cytocompatibility of HBGN since it reflects the growth capacity of cells in the presence of such nanomaterials. In order to study which was the maximum concentration tolerable by the cells, HBGN samples without antibiotic loading were tested at 200 and 300 μg/mL loading.

The proliferation of pre-osteoblasts 24 h after exposure to 200 and 300 μg/mL of all compositions was similar to that obtained by cells cultured in the absence of HBGN (Figure 5). However, this proliferation significantly decreased after exposure to all the copper-enriched compositions over 72 h, the reduction being greater in pre-osteoblasts cultured with the higher concentration of Cu-HBGN samples. These results indicate that the decreased proliferation is more closely related to the total amount of copper than to the HBGN per se, as the proliferation values of pre-osteoblasts exposed to 200 μg/mL of the 5% Cu-HBGN sample were similar to those obtained when exposed to 300 μg/mL of the 2.5% Cu-HBGN sample. These values indicate that the synthesized HBGN are cytocompatible and useful for our proposal.

3.4.2. Internalization of HBGN and Morphology Results in MC3T3-E1 Cells

The use of HBGN for different biomedical applications such as bone infection treatment, among others, requires that such nanomaterials have to be incorporated by the cells close to the infection without provoking structural and functional cell alterations. Once the maximum concentration of HBGN tolerable by this cell line was known, the morphology cellular and the intracellular localization of the HBGN was evaluated by fluorescence microscopy. As seen in Figure 6, the cells showed a natural phenotype, also known as Wild type, in the presence of HBGN. The images also show that these HBGN are preferentially

localized in the perinuclear area as previously observed in literature [76,77], clearly outside of the nucleus and no apparent signs of nuclear shrinkage (pyknosis) was observed.

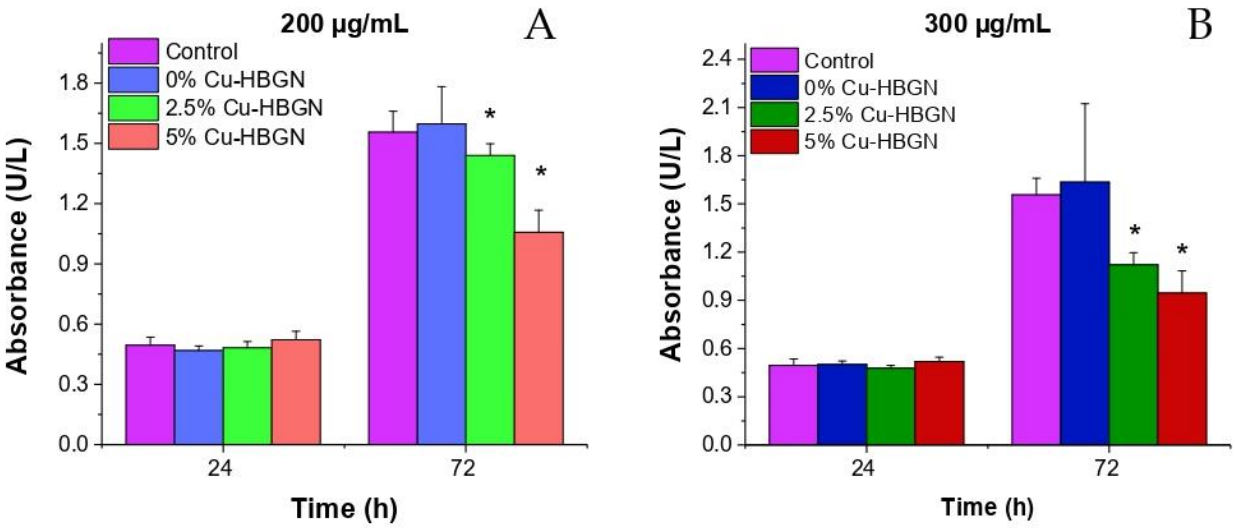


Figure 5. MC3T3-E1 cell proliferation after 1 and 3 d of exposure to (**A**) 200 µg/mL and (**B**) 300 µg/mL of HBGN. Significant differences with respect to control cells (absence of HBGN) are marked with an asterisk. Significance $p < 0.05$.

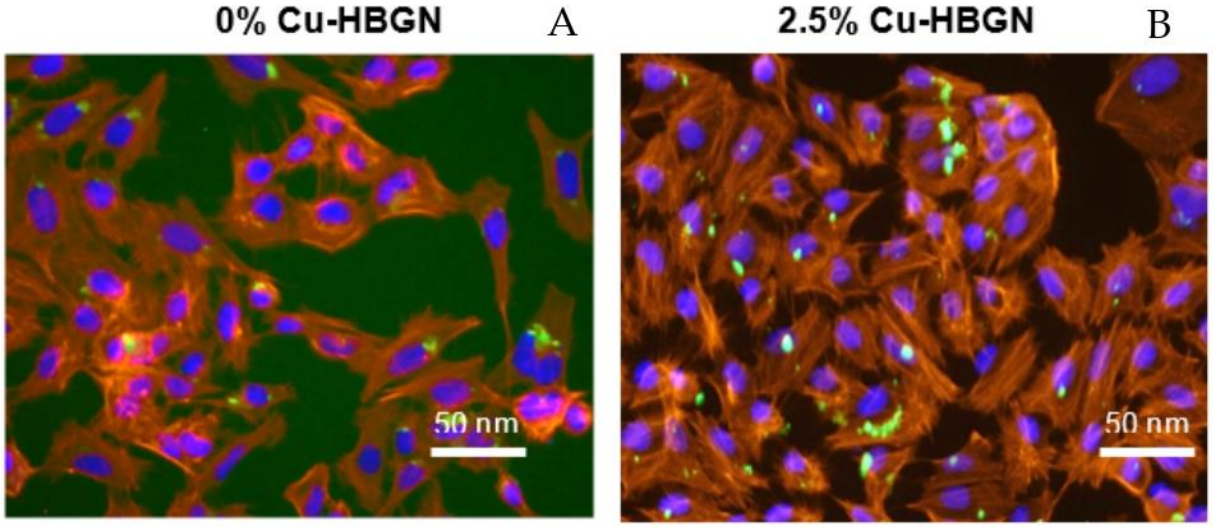


Figure 6. Representative images of 0% (**A**) and 2.5% Cu-HBGN (**B**) internalized inside MC3T3-E1 cells. The cytoskeleton of the cells is seen in red, the cell nucleus in blue and the FTIC-labelled HBGN in green.

Similar images were obtained for all compositions tested. Various studies have postulated that it is an endocytosis process that can have three outcomes: nanoparticles are internalized by endocytic vesicles and a large part of them are excreted into the extracellular environment; a fraction of these endocytic vesicles travel to the cytosol where they fuse with a secondary endosome and this in turn ends up fusing with the lysosome to digest the nanoparticles; and a small number of nanoparticles escape from the endolysosome to remain in the cytosol and release the charged molecules in the nanoparticles as well as the ions that are the product of their degradation [78].

3.4.3. Flow Cytometry Studies

With the aim of investigating the response of MC3T3-E1 cells to continuous exposure to HBGN for 3 d, the cell uptake process was evaluated through the intracellular complexity parameter, as well as the viability, and the ROS intracellular production by flow cytometry.

In this study, we quantitatively evaluated the incorporation of HBGN by MC3T3-E1 pre-osteoblasts by means of flow cytometry. This method is widely used to evaluate the incorporation of nanomaterials by mammalian cells through the evaluation of changes in the flow cytometric side-scatter intensity. Figure 7A shows the internal complexity of the pre-osteoblasts after exposure to the HBGN samples for 3 d. In flow cytometry, light scattering at a 90° dispersion angle is called side-scatter light (SSC), determined in part by the cellular cytoplasm, mitochondria, and pinocytic vesicles [79], phagocytosis of foreign bodies as well as the internalization of nanoparticles [80,81], its intensity being proportional to the intracellular complexity. The results revealed significant differences in the SSC parameters of pre-osteoblasts when exposed to the different HBGN samples with respect to those shown by control cells. However, no significant differences were observed between the different compositions. These results confirm the internalization of all HBGN compositions, and it is concluded that the internalization of the HBGN is independent of the atomic percentage of Cu doped in the material, as had already been observed in the internalization of the FTIC-labelled HBGN (Figure 6). In view of the results, it can be hypothesized that the following results obtained are mainly due to the degradation of the HBGN inside cells. Cell viability is an important biological parameter related to the integrity of the cell membrane, which allows the evaluation of the biocompatibility of the nanomaterials. In fact, the interaction of HBGN with cell membranes has been reported as one of the major causes of their cytotoxicity. Figure 7B shows the viability of the cells and as can be seen, there are no significant differences in the cell viability of pre-osteoblast after exposure to the different HBGN samples with respect to the control cells or between the different HBGN, so that the exposure of HBGN to a concentration of 50 µg/mL for 3 d does not affect viability in the MC3T3-E1 cell line. These results do not conflict with those obtained using MTS, since they served to establish the limits of the concentration to which this cell line could be exposed without leading to a drastic decrease in proliferation, while this test aims to see the effect of long-term viability without removing the HBGN from the well at a lower concentration.

A cell biomarker related to cell cytotoxicity caused by nanomaterials involves mostly free-radical mechanisms, the most important one being oxidative stress mediated by ROS production. Overproduction of ROS can induce an imbalance between the excessive generation of ROS and the limited antioxidant defense capacity of cells leading to adverse biological effects such as membrane lipid peroxidation, protein denaturation, mitochondrial dysfunction and DNA changes. Figure 7C shows the percentage of the population of pre-osteoblasts with ROS intracellular content. After exposure of this cell type to the different HBGN, no significant differences were obtained with respect to control cells or between the different HBGN samples. These results indicate that the cell uptake of these HBGN nanomaterials does not affect the ROS population percentage. Figure 7D shows the intracellular content of ROS (intensity, arbitrary units (A.U.)) of pre-osteoblasts after exposure to the different samples. Thus, a significant increase in the ROS intensity can be observed in the cells treated with HBGN, the highest being that of the sample with 5% Cu-HBGN (more than double) that obtained by the other HBGN compositions. However, the intensity between compositions 0 and 2.5% Cu-HBGN did not reveal significant differences. Since the only difference between the compositions is the atomic percentage of copper in HBGN, we can attribute the increase observed to the effect that Cu^{2+} cations have inside the cell. Despite these intense DCFH values, a decrease in cell viability was not obtained (Figure 7B), which may suggest that the concentrations of HBGN tested in this study are not cytotoxic. These ROS values do not necessarily correspond to a cytotoxic response to the material, most cell lines maintain a basal expression as a consequence of the mitochondrial electron transport chain necessary to catabolize carbohydrates, fatty

acids and amino acids [82]. These ROS values increased during the proliferation process as a consequence of the bioenergetic requirement necessary for cell cycle progression and entry into mitosis. [83]. In view of these results, it can be hypothesized that copper release (Figure 3) at this concentration does not trigger a cytotoxic response but is effective in promoting proliferation as observed in our results (Figure 7).

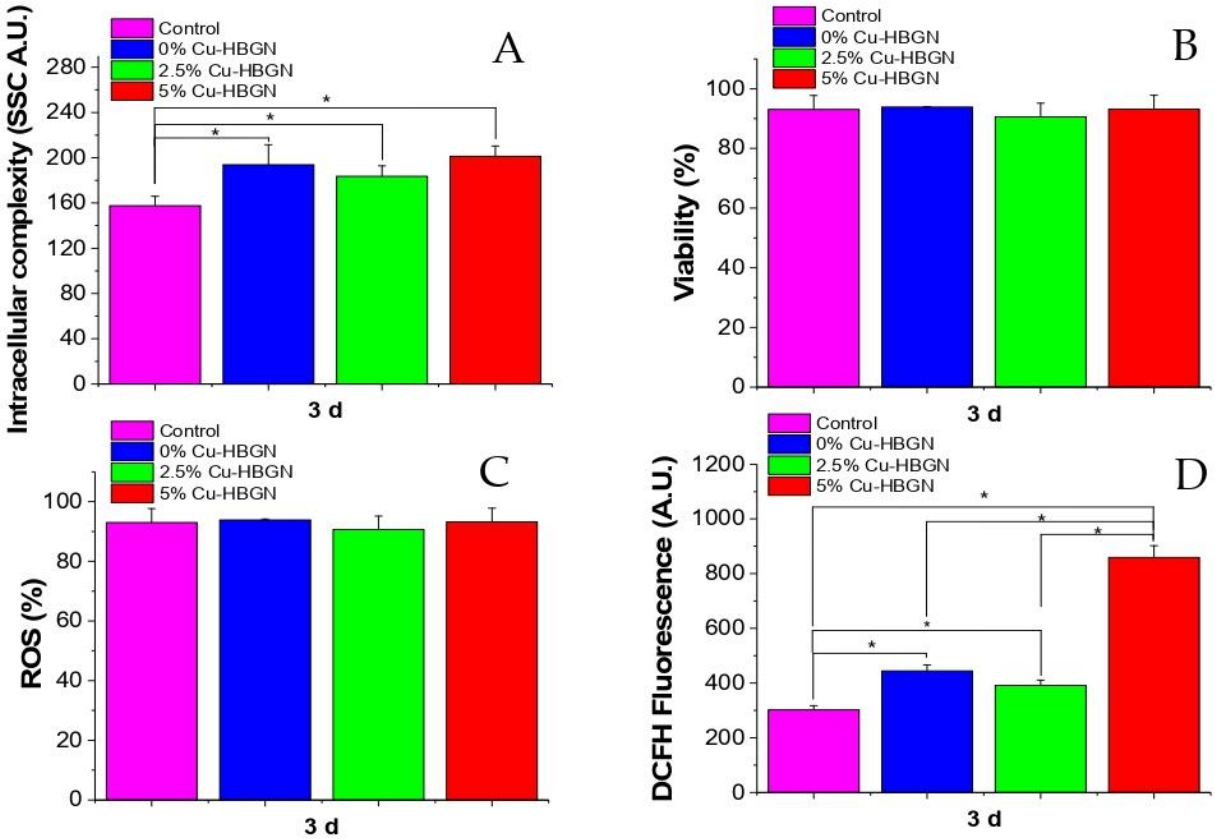


Figure 7. MC3T3-E1 pre-osteoblast exposure to HBGN for 3 d: (**A**) HBGN internalization obtained by intracellular complexity values (SSC), (**B**) viability evaluated by the exclusion of PI positive cells, (**C**) pre-osteoblast populations with ROS intracellular content (%) and (**D**) intensity of DCFH fluorescence, indicative of intracellular ROS content. * Indicates significant differences when emphp value < 0.05 was obtained.

3.5. Bacterial Assays

3.5.1. Bacterial Growth Inhibition Tests in the Planktonic State

HBGN loaded and unloaded with danofloxacin were tested at 200, 100 and 10 µg/mL for *E. coli* and 260, 130 and 20 µg/mL for *S. aureus*. No decrease in bacterial proliferation was obtained in samples without antibiotic loading for *E. coli* or *S. aureus* at the concentrations used (data not shown). These results are to be expected given that the literature reports effective Cu^{2+} concentrations of around 230 and 600 mg/L for *E. coli* and *S. aureus*, respectively [84]. However, the authors have observed the efficacy of the bactericidal capacity of copper when concentrations of 2 mg/mL of nanoparticles Cu doped are used [63].

As can be seen in Figure 8A, the nanosystem was shown to be an effective strategy, by inhibiting bacterial growth by 100% against *E. coli* at concentrations equal to or greater than 10 µg/mL. Figure 8B shows the results obtained against *S. aureus*. It was observed that a concentration of 20 µg/mL was sufficient to obtain a 99.9% reduction in bacterial growth with respect to the control, for all HBGN compositions loaded with danofloxacin. No significant differences were obtained between the different compositions. These results allow us to conclude that the MBC with this nanosystem is 10 µg/mL for *E. coli* and

20 µg/mL for *S. aureus*, concentrations much lower than those used by other similar nanosystems described in the literature [61,63].

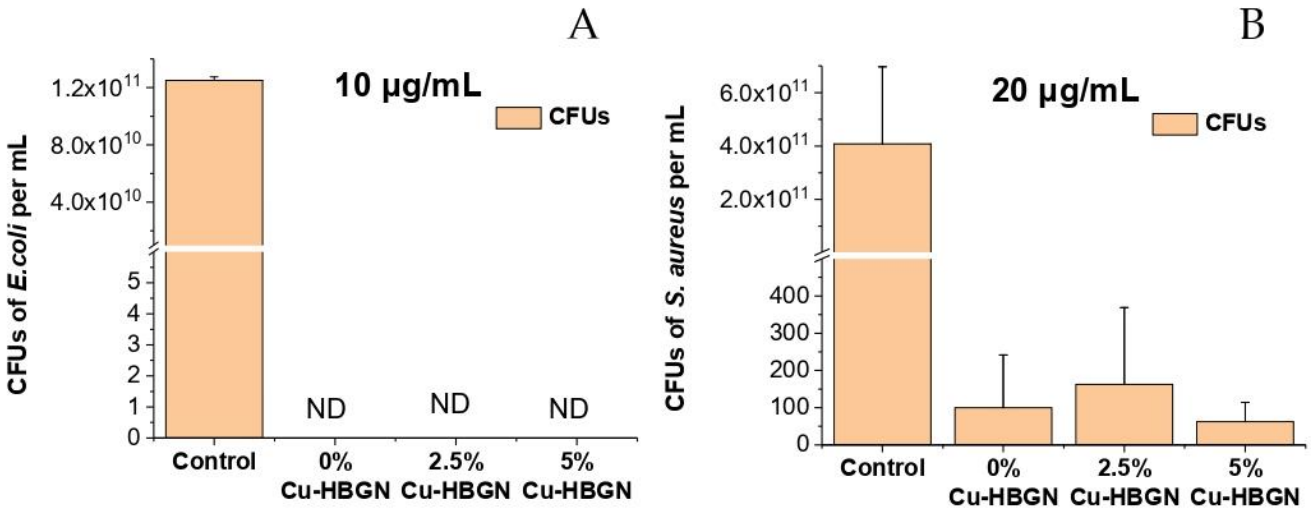


Figure 8. Results obtained from the bacterial growth inhibition test in the planktonic state using (**A**) 10 µg/mL of HBGN against *E. coli* and (**B**) 20 µg/mL of HBGN against *S. aureus*. Non-detected CFUs are marked as ND.

3.5.2. Halo Inhibition Assays

Assays were carried out using the Kirby–Bauer methodology, testing 300, 200 and 100 µg/mL of each composition loaded or not-loaded with danofloxacin using *E. coli* and *S. aureus* as bacteria models.

Compositions not loaded with danofloxacin did not produce any growth inhibition halo for *E. coli* or *S. aureus* (results not shown). As shown in Figure 9A, halos were observed at 6 h for each HBGN composition loaded with danofloxacin at all three compositions used. Similar results were obtained at 24 h of exposure to each HBGN compositions (Figure 9B). No significant differences were observed between the three samples at each concentration used at 6 h or 24 h. Figure 9C,D shows the efficacy of the nanosystem loaded with danofloxacin against *S. aureus*. The 2.5% Cu-HBGN at 300 micrograms and 5% Cu-HBGN at 200 micrograms were effective in inhibiting the growth of *E. coli*.

These results indicate that for this type of assay the copper activity is not sufficient to produce any inhibition halo for *E. coli* or for *S. aureus*. However, against *S. aureus*, a possible synergistic effect between the copper ions and danofloxacin could be observed, as inhibition halos were obtained only in the Cu-doped compositions at 300 µg/mL for the 2.5% Cu-HBGN composition and 200 and 300 µg/mL for 5% Cu-HBGN. The difference in the efficacy of the nanosystem in this test compared to the bacterial growth inhibition test in the planktonic state is explained below.

Bacteria in a sessile state are faced with a more aggressive environment with limited moisture and nutrients, which is why they form aggregates and change their physiology, becoming metabolically slower but more resistant. However, bacteria in a planktonic state have a quantity of richer and more accessible nutrients drastically increasing metabolism and motility, thus exposing them more to the effect of antibiotics [85–87], so it is common that the concentrations of antibiotics needed to kill the same bacteria in a sessile state compared to planktonic bacteria are typically in the order of a thousand times higher [88].

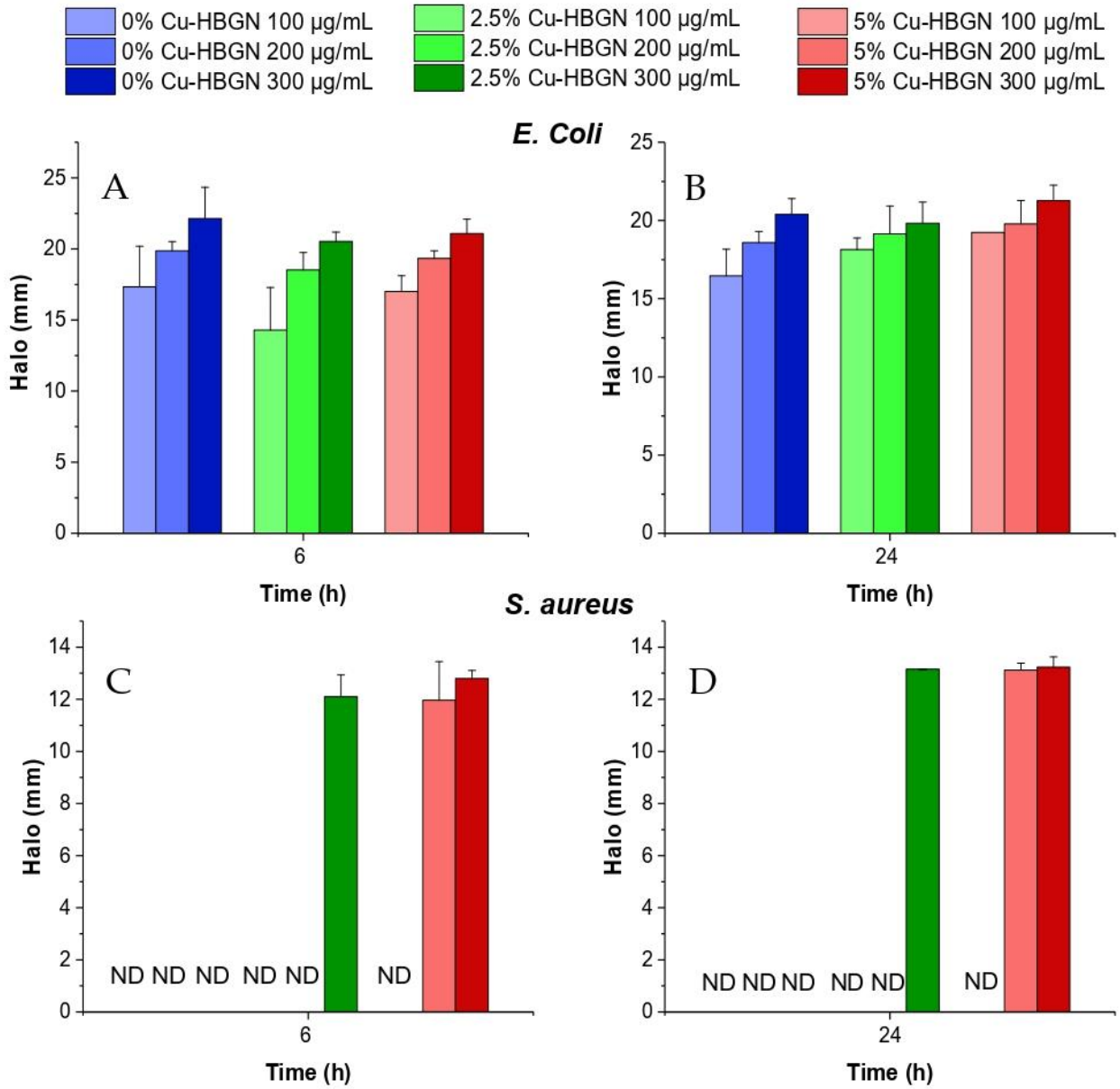


Figure 9. Inhibition halos obtained from the contact of HBGN loaded with danofloxacin, at different concentrations, times, and bacterial species: (**A**) *E. coli* at 6 h, (**B**) *E. coli* at 24 h, (**C**) *S. aureus* at 6 h and (**D**) *S. aureus* at 24 h. Non-detected halos are marked as ND.

It is remarkable that, although the 2.5 and 5% Cu-HBGN compositions released less danofloxacin than 0% Cu-HBGN, they were more effective in inhibiting bacterial growth in *E. coli* and *S. aureus*. In fact, this strategy is more effective than using high concentrations of Cu^{2+} [84], as observed in microbiological assays where neither a decrease in viability in the planktonic state nor halos in the sessile state were obtained, and high concentrations of antibiotic, as in the case of 0% Cu-HBGN, which released higher amounts of danofloxacin, and was even more efficient than other systems where larger quantities of material are needed [62,63,66,74].

3.5.3. Biofilm Degradation Assay

Finally, to verify the ability of the nanosystem to degrade a biofilm, the preformed biofilm of *S. aureus* was used as a model due to its greater resistance than that formed by *E. coli*. For this test, 200 µg/mL of each composition loaded with danofloxacin was used at the maximum cytocompatible concentration. The results of this test are shown in Figure 10.

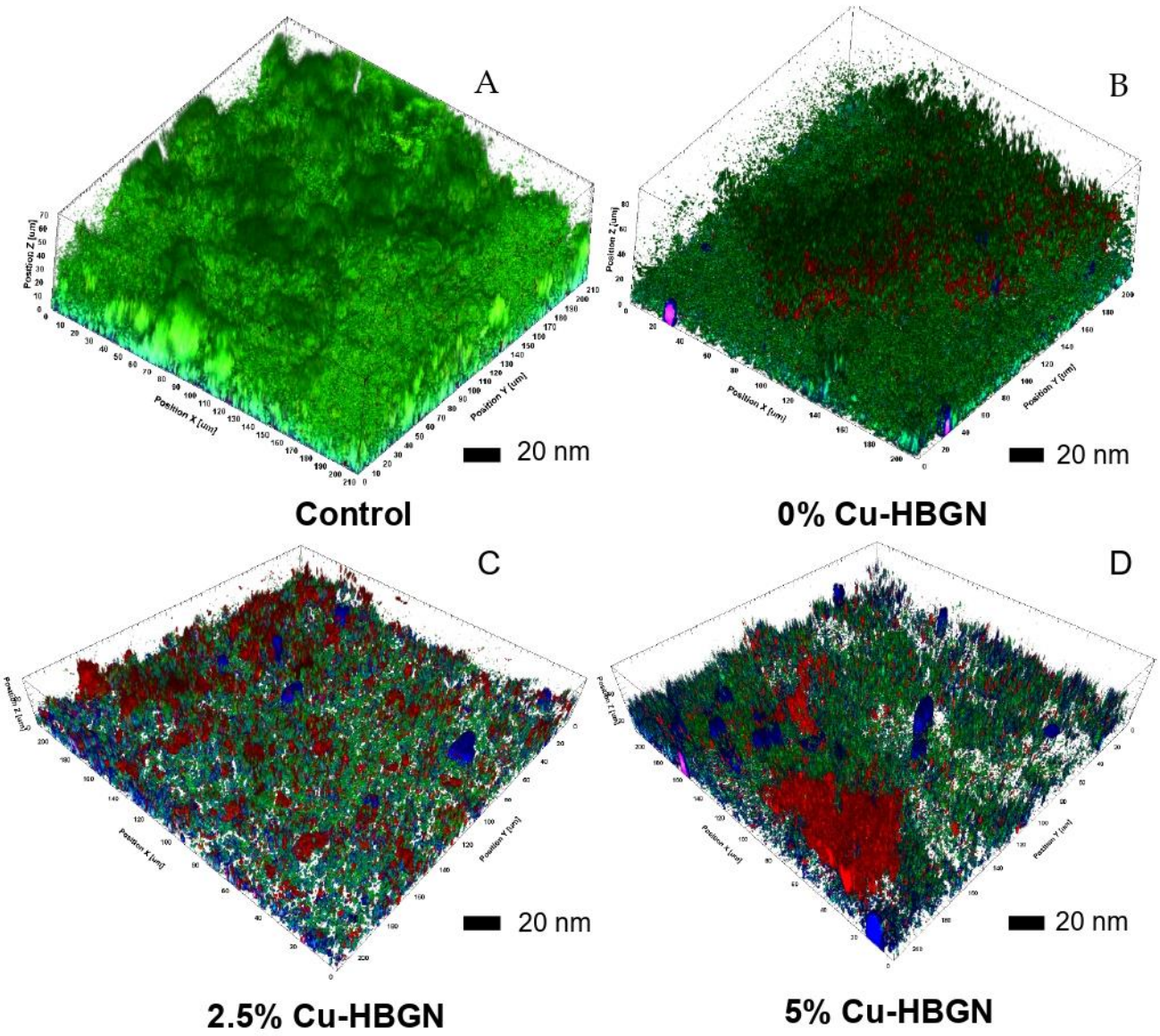


Figure 10. Preformed biofilm of *S. aureus* stained with BacLight bacteria viability kit. (**A**) Biofilm control. Biofilm treated 24 h of exposure with different compositions loaded with danofloxacin: (**B**) 0% Cu-HBGN, (**C**) 2.5% Cu-HBGN and (**D**) 5% Cu-HBGN.

The control (Figure 10A) showed a dense biofilm layer throughout the field with a thickness of approximately 70 nm, no bacterial death was observed. The Cu-free HBGN loaded (Figure 10B), reduced the thickness of the biofilm by approximately 16% ± 8 with respect to the control, and a darkening of the image could be observed due to the appearance of red pixels corresponding to bacterial death. The exopolysaccharide matrix could not yet be seen in the image due to the huge bacterial population that remained alive after exposure to this composition. Figure 10C,D show the effects of treatment with 2.5% and 5% Cu-HBGN loaded with danofloxacin. There is clear evidence of a reduction in biofilm thickness of approximately 52 ± 18% with respect to the control, obtained with both compositions. For the sample 2.5% Cu-HBGN (Figure 10C), an increase in bacterial death and loss of extracellular matrix was observed, marked in red and blue respectively. Finally, Figure 10D shows the biofilm treated with 5% Cu-HBGN with danofloxacin. Although the biofilm reduction obtained by the 5% Cu-HBGN is similar to that obtained by the 2.5% Cu-HBGN composition, fields of high bacterial death are observed, as well as total loss of biofilm in certain regions of the field.

These results indicate, once again, that compositions enriched with a greater amount of copper trigger greater bacterial death and greater degradation of the biofilm pre-formed by *S. aureus*, depending on the amount of copper released.

As already observed in the danofloxacin release study (Figure 4), the Cu-free composition released more danofloxacin and in less time, while the Cu-doped HBGN released less and more slowly the danofloxacin contained inside. This shows that the degradation of the biofilm is not due to a release of danofloxacin at higher concentrations than the other compositions. However, it does suggest that the lethality of the nanosystem is dependent on the amount of copper being released into the surrounding medium, as was also observed in the growth inhibition and halo inhibition assays (Figures 8 and 9).

The joint action of the antibiotic and copper ion release is able to overcome the individual action of the copper ions and the antibiotic at concentrations well above those required by the joint nanosystem, possibly due to the formation of coordination complexes in which the antibiotic activity is enhanced as suggested in literature [89].

The results obtained from the microbiological assays meet several objectives at the same time since they are not cytotoxic with mammalian cells (Figures 5–7) while they are effective against the inhibition of bacterial growth and the degradation of a biofilm (Figures 8–10), at the same or lower concentration of HBGN samples, in two of the bacterial strains which cause the majority of bone infections.

Moreover, this work opens up the possibility of using functionalizing agents that provide further applications by anchoring functionally active groups to the reactive surface of the material. In this respect, it should be explored whether the nanosystem can be further improved, or whether even more effective interactions between copper ions and antibiotics of the danofloxacin family can be produced. Further research is needed to demonstrate the full potential of this nanosystem for the treatment of bone infections.

4. Conclusions

A nanosystem based on hollow bioactive glass nanoparticles in the SiO_2-P_2O_5-CaO-CuO system loaded with danofloxacin was synthesized and characterized to be used for the local treatment of bone infections.

- The three compositions investigated containing 0, 2.5 or 5% of CuO showed high values of specific surface area and pore volume and two different sizes of pores which made them versatile for loading with diverse biomolecules and drugs.
- The nanosystem was able to release biologically effective amounts of therapeutic inorganic ions and danofloxacin. The Cu-loading of the HBGN produced more gradual release of danofloxacin that was extended for over one week.
- Assays with MC3T3-E1 pre-osteoblasts showed a biocompatible behavior after 3 d of contact of the nanoparticles with cells.
- Microbiological assays showed that copper ions enhanced the bactericidal effect of danofloxacin against *E. coli* and *S. aureus* in both planktonic and sessile state. Moreover, the nanosystem was able to degrade a biofilm preformed of *S. aureus* at minimal concentration, suggesting its suitability as a bactericide agent.

The results shown in this study demonstrate that the amount of antibiotic danofloxacin and copper ions needed to eliminate a bacterial population is drastically reduced when a nanosystem that effectively combines both strategies is employed. Consequently, we can conclude that HBGN-based nanosystems are promising alternatives in the fight against bone infections.

Author Contributions: Conceptualization, J.J.-H., S.S.-S. and A.J.S.; methodology, J.J.-H., S.S.-S. and M.C.; software J.J.-H. and S.S.-S.; validation, J.J.-H., S.S.-S., M.C., M.V.-R. and A.J.S.; formal analysis, S.S.-S. and A.J.S.; investigation, J.J.-H., S.S.-S. and M.C.; resources, M.V.-R.; data curation, J.J.-H., S.S.-S. and A.J.S.; writing—original draft preparation, J.J.-H.; writing—review and editing, J.J.-H., S.S.-S. and A.J.S.; visualization, J.J.-H., S.S.-S. and A.J.S.; supervision, S.S.-S. and A.J.S.; project administration,

M.V.-R.; funding acquisition, M.V.-R., S.S.-S. and A.J.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Instituto de Salud Carlos III, grant number PI20/01384, co-funded with European Union FEDER funds and by the European Research Council, Advanced Grant Verdi-Proposal No. 694160 (ERC-2015-AdG).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge funding provided by the Instituto de Salud Carlos III, grant number PI20/01384, co-funded with European Union FEDER funds and by European Research Council, Advanced Grant Verdi-Proposal No. 694160 (ERC-2015-AdG).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Keating, J.F.; Simpson, A.H.R.W.; Robinson, C.M. The management of fractures with bone loss. *J. Bone Jt. Surg.* **2005**, *87*, 142–150. [CrossRef] [PubMed]
2. Böker, K.O.; Richter, K.; Jäckle, K.; Taheri, S.; Grunwald, I.; Borcherding, K.; von Byern, J.; Hartwig, A.; Wildemann, B.; Schilling, A.F.; et al. Current State of Bone Adhesives—Necessities and Hurdles. *Materials* **2019**, *12*, 3975. [CrossRef] [PubMed]
3. Zimmerli, W. *Bone and Joint Infections: From Microbiology to Diagnostics and Treatment*; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 2015; pp. 1–393. [CrossRef]
4. Brady, R.A.; Leid, J.G.; Costerton, J.W.; Shirtliff, M.E. Osteomyelitis: Clinical overview and mechanisms of infection persistence. *Clin. Microbiol. Newsl.* **2006**, *28*, 65–72. [CrossRef]
5. Spellberg, B.; Lipsky, B.A. Systemic Antibiotic Therapy for Chronic Osteomyelitis in Adults. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54*, 393–407. [CrossRef]
6. Waldvogel, F.A.; Medoff, G.; Swartz, M.N. Osteomyelitis: A review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. *N. Engl. J. Med.* **1970**, *282*, 198–206. [CrossRef]
7. Waldvogel, F.A.; Medoff, G.; Swartz, M.N. Osteomyelitis: A review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects (second of three parts). *N. Engl. J. Med.* **1970**, *282*, 260–266. [CrossRef]
8. Waldvogel, F.A.; Medoff, G.; Swartz, M.N. Osteomyelitis: A review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. 3. Osteomyelitis associated with vascular insufficiency. *N. Engl. J. Med.* **1970**, *282*, 316–322. [CrossRef]
9. Conterno, L.O.; Turchi, M.D. Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2013**, *6*, CD004439. [CrossRef]
10. Costerton, W.; Veeh, R.; Shirtliff, M.; Pasmore, M.; Post, C.; Ehrlich, G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 1466. [CrossRef]
11. Smeltzer, M.S.; Gillaspy, A.F. Molecular Pathogenesis of Staphylcoccal Osteomyelitis. *Poult. Sci.* **2000**, *79*, 1042–1049. [CrossRef]
12. Proctor, R.A.; von Eiff, C.; Kahl, B.C.; Becker, K.; McNamara, P.; Herrmann, M.; Peters, G. Small colony variants: A pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 295–305. [CrossRef] [PubMed]
13. Garcia, L.G.; Lemaire, S.; Kahl, B.C.; Becker, K.; Proctor, R.A.; Denis, O.; Tulkens, P.M.; Van Bambeke, F. Antibiotic activity against small-colony variants of Staphylococcus aureus: Review of in vitro, animal and clinical data. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 1455–1464. [CrossRef] [PubMed]
14. Balaban, N.Q.; Merrin, J.; Chait, R.; Kowalik, L.; Leibler, S. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science* **2004**, *305*, 1622–1625. [CrossRef] [PubMed]
15. Davies, J.; Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417. [CrossRef]
16. Vallet-Regí, M. Evolution of Biomaterials. *Front. Mater.* **2022**, *9*, 864016. [CrossRef]
17. Lew, P.D.P.; Waldvogel, P.F.A. Osteomyelitis. *Lancet* **2004**, *364*, 369–379. [CrossRef]
18. Hench, L.L.; Splinter, R.J.; Allen, W.C.; Greenlee, T.K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* **1971**, *5*, 117–141. [CrossRef]
19. Izquierdo-Barba, I.; Salinas, A.J.; Vallet-Regí, M. Bioactive Glasses: From Macro to Nano. *Int. J. Appl. Glas. Sci.* **2013**, *4*, 149–161. [CrossRef]
20. Sui, B.; Zhong, G.; Sun, J. Drug-loadable Mesoporous Bioactive Glass Nanospheres: Biodistribution, Clearance, BRL Cellular Location and Systemic Risk Assessment via ^{45}Ca Labelling and Histological Analysis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–12. [CrossRef]
21. Li, Y.; Bastakoti, B.P.; Yamauchi, Y. Smart soft-templating synthesis of hollow mesoporous bioactive glass spheres. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 8038–8042. [CrossRef]
22. Zhu, Y.; Kaskel, S. Microporous and Mesoporous Materials Comparison of the in vitro bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses (MBGs) and bioactive glasses (BGs) scaffolds. *Micropor. Mesopor. Mater.* **2009**, *118*, 176–182. [CrossRef]

23. Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. Mesoporous bioactive glasses: Relevance of their porous structure compared to that of classical bioglasses. *Biomed. Glasses* **2015**, *1*, 140–150. [CrossRef]
24. Wu, C.; Chang, J. Mesoporous bioactive glasses: Structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. *Interface Focus* **2012**, *2*, 292–306. [CrossRef] [PubMed]
25. García, A.; Cabañas, M.V.; Peña, J.; Sánchez-Salcedo, S. Design of 3D Scaffolds for Hard Tissue Engineering: From Apatites to Silicon Mesoporous Materials. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1981. [CrossRef]
26. Salinas, A.J.; Esbrit, P. Mesoporous Bioglasses Enriched with Bioactive Agents for Bone Repair, with a Special Highlight of María Vallet-Regí's Contribution. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 202. [CrossRef]
27. Vallet-Regí, M.; Salinas, A.J. Mesoporous bioactive glasses for regenerative medicine. *Mater. Today Bio.* **2021**, *11*, 100121. [CrossRef]
28. Colilla, M.; Martínez-Carmona, M.; Sánchez-Salcedo, S.; Ruiz-González, M.L.; González-Calbet, J.M.; Vallet-Regí, M. A novel zwitterionic bioceramic with dual antibacterial capability. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 5639–5651. [CrossRef]
29. Palza, H.; Escobar, B.; Bejarano, J.; Bravo, D.; Diaz-Dosque, M.; Perez, J. Designing antimicrobial bioactive glass materials with embedded metal ions synthesized by the sol–gel method. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 3795–3801. [CrossRef]
30. Heras, C.; Sanchez-Salcedo, S.; Lozano, D.; Peña, J.; Esbrit, P.; Vallet-Regi, M.; Salinas, A.J. Osteostatin potentiates the bioactivity of mesoporous glass scaffolds containing Zn^{2+} ions in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* **2019**, *89*, 359–371. [CrossRef]
31. Wu, C.; Zhou, Y.; Fan, W.; Han, P.; Chang, J.; Yuen, J.; Zhang, M.; Xiao, Y. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2012**, *33*, 2076–2085. [CrossRef]
32. Jiménez-Holguín, J.; Sánchez-Salcedo, S.; Vallet-Regí, M.; Salinas, A.J. Development and evaluation of copper-containing mesoporous bioactive glasses for bone defects therapy. *Micropor. Mesopor. Mater.* **2020**, *308*, 110454. [CrossRef] [PubMed]
33. Gérard, C.; Bordeleau, L.J.; Barralet, J.; Doillon, C.J. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials* **2010**, *31*, 824–831. [CrossRef] [PubMed]
34. Sen, C.K.; Khanna, S.; Venojarvi, M.; Trikha, P.; Christopher Ellison, E.; Hunt, T.K.; Roy, S. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am. J. Physiol.-Hear. Circ. Physiol.* **2002**, *282*, 1821–1827. [CrossRef] [PubMed]
35. Hu, G.F. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J. Cell. Biochem.* **1998**, *69*, 326–335. [CrossRef]
36. Rodríguez, J.P.; Ríos, S.; González, M. Modulation of the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells by copper. *J. Cell. Biochem.* **2002**, *85*, 92–100. [CrossRef] [PubMed]
37. Zhang, J.; Huang, J.; Xu, S.; Wang, K.; Yu, S. Effects of Cu^{2+} and pH on osteoclastic bone resorption in vitro. *Prog. Nat. Sci.* **2003**, *13*, 266–270. [CrossRef]
38. Nojiri, H.; Saita, Y.; Morikawa, D.; Kobayashi, K.; Tsuda, C.; Miyazaki, T.; Saito, M.; Marumo, K.; Yonezawa, I.; Kaneko, K.; et al. Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking. *J. Bone Miner. Res.* **2011**, *26*, 2682–2694. [CrossRef]
39. Opsahl, W.; Zeronian, H.; Ellison, M.; Lewis, D.; Rucker, R.B.; Riggins, R.S. Role of Copper in Collagen Cross-linking and Its Influence on Selected Mechanical Properties of Chick Bone and Tendon. *J. Nutr.* **1982**, *112*, 708–716. [CrossRef]
40. Ruparelia, J.P.; Chatterjee, A.K.; Duttagupta, S.P.; Mukherji, S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 707–716. [CrossRef]
41. Yoon, K.Y.; Hoon Byeon, J.; Park, J.H.; Hwang, J. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. *Sci. Total Environ.* **2007**, *373*, 572–575. [CrossRef]
42. Koch, A.L. Growth and form of the bacterial cell wall. *Am. Sci.* **1990**, *78*, 327–341. Available online: https://www.jstor.org/stable/29774119 (accessed on 9 April 2022).
43. Ohsumi, Y.; Kitamoto, K.; Anraku, Y. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 2676–2682. [CrossRef] [PubMed]
44. Dan, Z.G.; Ni, H.W.; Xu, B.F.; Xiong, J.; Xiong, P.Y. Microstructure and antibacterial properties of AISI 420 stainless steel implanted by copper ions. *Thin Solid Films* **2005**, *492*, 93–100. [CrossRef]
45. Yoshida, Y.; Furuta, S.; Niki, E. Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1210*, 81–88. [CrossRef]
46. Ural, M.N.; Uney, K. Pharmacokinetic Behavior and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Integration of Danofloxacin Following Single or Co-Administration with Meloxicam in Healthy Lambs and Lambs with Respiratory Infections. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1190. [CrossRef] [PubMed]
47. Grobbel, M.; Lübke-Becker, A.; Wieler, L.H.; Froyman, R.; Friederichs, S.; Filios, S. Comparative quantification of the in vitro activity of veterinary fluoroquinolones. *Vet. Microbiol.* **2007**, *124*, 73–81. [CrossRef]
48. Brunauer, S.; Emmett, P.H.; Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309–319. [CrossRef]
49. Barrett, E.P.; Joyner, L.G.; Halenda, P.P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373–380. [CrossRef]
50. Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Duellman, S.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L. Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*; Markossian, S., Grossman, A., Brimacombe, K., Arkin, M., Auld, D., Austin, C.P., Baell, C., Chung, T.D.Y., Coussens, N.P., Dahlin, J.L., et al., Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Science: Bethesda, MD, USA, 2004.

51. Zheng, K.; Taccardi, N.; Beltrán, A.M.; Sui, B.; Zhou, T.; Marthala, V.R.R.; Hartmann, M.; Boccaccini, A.R. Timing of calcium nitrate addition affects morphology, dispersity and composition of bioactive glass nanoparticles. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 95101–95111. [CrossRef]
52. Xie, W.; Chen, X.; Li, Y.; Miao, G.; Wang, G.; Tian, T.; Zeng, L.; Chen, X. Facile synthesis and in vitro bioactivity of radial mesoporous bioactive glass with high phosphorus and calcium content. *Adv. Powder Technol.* **2020**, *31*, 3307–3317. [CrossRef]
53. Casarrubios, L.; Gómez-Cerezo, N.; Feito, M.J.; Vallet-Regí, M.; Arcos, D.; Portolés, M.T. Incorporation and effects of mesoporous SiO_2-CaO nanospheres loaded with ipriflavone on osteoblast/osteoclast cocultures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *133*, 258–268. [CrossRef] [PubMed]
54. ALOthman, Z.A. Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials. *Materials* **2012**, *5*, 2874–2902. [CrossRef]
55. Casarrubios, L.; Gómez-Cerezo, N.; Feito, M.J.; Vallet-Regí, M.; Arcos, D.; Portolés, M.T. Ipriflavone-Loaded Mesoporous Nanospheres with Potential Applications for Periodontal Treatment. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 2573. [CrossRef] [PubMed]
56. Zhu, L.; Li, J.; Dong, Y. Effect of mesoporous bioactive glass on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *PeerJ* **2021**, *9*, e12421. [CrossRef]
57. Liang, Q.; Hu, Q.; Miao, G.; Yuan, B.; Chen, X. A facile synthesis of novel mesoporous bioactive glass nanoparticles with various morphologies and tunable mesostructure by sacrificial liquid template method. *Mater. Lett.* **2015**, *148*, 45–49. [CrossRef]
58. Min, Z.; Huixue, W.; Yujie, Z.; Lixin, J.; Hai, H.; Yufang, Z. Synthesis of monodispersed mesoporous bioactive glass nanospheres for bone repair. *Mater. Lett.* **2016**, *171*, 259–262. [CrossRef]
59. Tabia, Z.; El Mabrouk, K.; Bricha, M.; Nouneh, K. Mesoporous bioactive glass nanoparticles doped with magnesium: Drug delivery and acellular in vitro bioactivity. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 12232–12246. [CrossRef]
60. Neščáková, Z.; Zheng, K.; Liverani, L.; Nawaz, Q.; Galusková, D.; Kaňková, H.; Michálek, M.; Galusek, D.; Boccaccini, A.R. Multifunctional zinc ion doped sol—Gel derived mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications. *Bioact. Mater.* **2019**, *4*, 312–321. [CrossRef]
61. Kurtuldu, F.; Mutlu, N.; Michálek, M.; Zheng, K.; Masar, M.; Liverani, L.; Chen, S.; Galusek, D.; Boccaccini, A.R. Cerium and gallium containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for bone regeneration: Bioactivity, biocompatibility and antibacterial activity. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *124*, 112050. [CrossRef]
62. El-Kady, A.M.; Ali, A.F.; Rizk, R.A.; Ahmed, M.M. Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles. *Ceram. Int.* **2012**, *38*, 177–188. [CrossRef]
63. Bari, A.; Bloise, N.; Fiorilli, S.; Novajra, G.; Vallet-Regí, M.; Bruni, G.; Torres-Pardo, A.; González-Calbet, J.M.; Visai, L.; Vitale-Brovarone, C. Copper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent for bone regeneration. *Acta Biomater.* **2017**, *55*, 493–504. [CrossRef] [PubMed]
64. Chen, F.; Song, Z.; Gao, L.; Hong, H.; Liu, C. Hierarchically macroporous/mesoporous POC composite scaffolds with IBU-loaded hollow SiO_2 microspheres for repairing infected bone defects. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 4198–4205. [CrossRef] [PubMed]
65. Mutlu, N.; Beltrán, A.M.; Nawaz, Q.; Michálek, M.; Boccaccini, A.R.; Zheng, K. Combination of Selective Etching and Impregnation Toward Hollow Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1846. [CrossRef] [PubMed]
66. Ye, J.; He, J.; Wang, C.; Yao, K.; Gou, Z. Copper-containing mesoporous bioactive glass coatings on orbital implants for improving drug delivery capacity and antibacterial activity. *Biotechnol. Lett.* **2014**, *36*, 961–968. [CrossRef]
67. Jiménez-Holguín, J.; López-Hidalgo, A.; Sánchez-Salcedo, S.; Peña, J.; Vallet-Regí, M.; Salinas, A.J. Strontium-Modified Scaffolds Based on Mesoporous Bioactive Glasses/Polyvinyl Alcohol Composites for Bone Regeneration. *Materials* **2020**, *13*, 5526. [CrossRef]
68. Doostmohammadi, A.; Monshi, A.; Fathi, M.H.; Braissant, O. A comparative physico-chemical study of bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite. *Ceram. Int.* **2011**, *37*, 1601–1607. [CrossRef]
69. Smeets, R.; Kolk, A.; Gerressen, M.; Driemel, O.; Maciejewski, O.; Hermanns-Sachweh, B.; Riediger, D.; Stein, J.M. A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation. *Head Face Med.* **2009**, *5*, 13. [CrossRef]
70. Vallet-Regí, M.; Izquierdo-Barba, I.; Colilla, M. Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2012**, *370*, 1400–1421. [CrossRef]
71. Sharifi, E.; Bigham, A.; Yousefiasl, S.; Trovato, M.; Ghomi, M.; Esmaeili, Y.; Samadi, P.; Zarrabi, A.; Ashrafizadeh, M.; Sharifi, S.; et al. Mesoporous Bioactive Glasses in Cancer Diagnosis and Therapy: Stimuli-Responsive, Toxicity, Immunogenicity, and Clinical Translation. *Adv. Sci.* **2021**, *9*, 2102678. [CrossRef]
72. Seedher, N.; Agarwal, P. Effect of metal ions on some pharmacologically relevant interactions involving fluoroquinolone antibiotics. *Drug Metab. Drug Interact.* **2010**, *25*, 17–24. [CrossRef]
73. Maeno, S.; Niki, Y.; Matsumoto, H.; Morioka, H.; Yatabe, T.; Funayama, A.; Toyama, Y.; Taguchi, T.; Tanaka, J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4847–4855. [CrossRef] [PubMed]
74. Wu, C.; Zhou, Y.; Xu, M.; Han, P.; Chen, L.; Chang, J.; Xiao, Y. Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. *Biomaterials* **2013**, *34*, 5227–5237. [CrossRef] [PubMed]
75. Nieto, A.; Balas, F.; Colilla, M.; Manzano, M.; Vallet-Regí, M. Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate sodium alendronate dosage. *Micropor. Mesopor. Mater.* **2008**, *116*, 4–13. [CrossRef]

76. Ekkapongpisit, M.; Giovia, A.; Follo, C.; Caputo, G.; Isidoro, C. Biocompatibility, endocytosis, and intracellular trafficking of mesoporous silica and polystyrene nanoparticles in ovarian cancer cells: Effects of size and surface charge groups. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 4147. [CrossRef]
77. Popara, J.; Accomasso, L.; Vitale, E.; Gallina, C.; Roggio, D.; Iannuzzi, A.; Raimondo, S.; Rastaldo, R.; Alberto, G.; Catalano, F.; et al. Silica nanoparticles actively engage with mesenchymal stem cells in improving acute functional cardiac integration. *Nanomedicine* **2018**, *13*, 1121–1138. [CrossRef]
78. Vivero-Escoto, J.L.; Slowing, I.I.; Trewyn, B.G.; Lin, V.S.-Y. Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery. *Small* **2010**, *6*, 1952–1967. [CrossRef]
79. Udall, J.N.; Moscicki, R.A.; Preffer, F.I.; Ariniello, P.D.; Carter, E.A.; Bhan, A.K.; Bloch, K.J. Flow Cytometry: A New Approach to the Isolation and Characterization of Kupffer Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1987**, *216 A*, 821–827. [CrossRef]
80. Wu, Y.; Ali, M.R.K.; Dansby, K.; El-Sayed, M.A. Improving the Flow Cytometry-based Detection of the Cellular Uptake of Gold Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 14261–14267. [CrossRef]
81. Shin, H.R.; Kwak, M.; Lee, T.G.; Lee, J.Y. Quantifying the level of nanoparticle uptake in mammalian cells using flow cytometry. *Nanoscale* **2020**, *12*, 15743–15751. [CrossRef]
82. Andreyev, A.Y.; Kushnareva, Y.E.; Starkov, A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* **2005**, *70*, 200–214. [CrossRef]
83. Schieke, S.M.; McCoy, J.P.; Finkel, T. Coordination of mitochondrial bioenergetics with G1 phase cell cycle progression. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1782. [CrossRef] [PubMed]
84. Benhalima, L.; Amri, S.; Bensouilah, M.; Ouzrout, R. Antibacterial effect of copper sulfate against multi-drug resistant nosocomial pathogens isolated from clinical samples. *Pakistan J. Med. Sci.* **2019**, *35*, 1322. [CrossRef] [PubMed]
85. Mah, T.F.C.; O'Toole, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 34–39. [CrossRef]
86. Prosser, B.L.; Taylor, D.; Dix, B.A.; Cleeland, R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 1502. [CrossRef] [PubMed]
87. Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318–1322. [CrossRef]
88. Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D.E.; Korber, D.R.; Lappin-Scott, H.M. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *49*, 711–745. [CrossRef]
89. Krasnovskaya, O.; Naumov, A.; Guk, D.; Gorelkin, P.; Erofeev, A.; Beloglazkina, E.; Majouga, A. Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3965. [CrossRef]

CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

Los materiales investigados son vidrios mesoporosos del sistema **SiO_2-CaO-P_2O_5** con contenidos de SiO_2 entre el 79.5 y el 85%

Secciones	Composiciones (%)	Conclusiones	Publicación
III.1.1.3	85-XSiO_2─5P_2O_5─10CaO─X(**SrO**) (X=0, 2.5 y 5)	Obtención de andamios meso-macroporosos de MBG enriquecidos con SrO y polivinil alcohol mediante plantilla sacrificable de ácido poliláctico. La composición enriquecida con 2.5% SrO promueve la proliferación y la osteogénesis.	Materials 2020
III.1.2.3	86,4─XSiO_2─5P_2O_5─10CaO─X(**ZnO**) (X=0 y 4,2)	Los andamios meso-macroporosos de MBG dopados con ZnO obtenidos por robocasting, recubiertos con gelatina y cargados con antibióticos muestran un potente efecto sinérgico entre la actividad bactericida de los iones Zn^{2+} y los fármacos, reduciendo la cantidad necesaria de estos últimos.	Acta Biomaterialia 2020
III.1.3.3	85─XSiO_2─5P_2O_5─10CaO─X(**CuO**) (X=0, 2.5 y 5)	Las condiciones de síntesis de los MBG decorados con CuO, afecta a la forma en la que el cobre se integra en la red vitrea. Si el catalizador es HCl, se integra Cu^{2+} en la estructura del vidrio. Si en su lugar es HNO_3 se integra como nanopartículas de cobre metálico, siendo estos últimos los materiales con una respuesta bioactiva más rápida.	Micropor. Mesopor. Mater. 2020
III.1.4.5	85─XSiO_2─5P_2O_5─10CaO─X(**CuO**) (X=0, 0.05, 0.1 y 0.25)	Se optimizó el porcentaje de CuO en MBG enriquecidos con 0.05 % mol CuO para promover la proliferación celular. Se han obtenido andamios meso-macroporosos zwitterionicos de MBG obtenidos por robocasting, dopados con 0.05% CuO y polivinil alcohol citocompatibles.	En preparación
III.2.1.3	79.9─XSiO_2─5P_2O_5─10CaO─X(**CuO**) (X=0, 2.5 y 5)	Se han sintetizado HBGN de tamaño homogéneo, con hasta 5%mol CuO. Se ha demostrado un potente efecto sinérgico entre la actividad de los iones Cu^{2+} y el danofloxacino frente a bacterias en estado planctónico, sésil y en biofilm.	Enviado a Pharmaceutics

ANEXO I: METODOLOGÍA, EQUIPOS Y TÉCNICAS

V. ANEXO I: METODOLOGÍA Y TÉCNICAS EMPLEADAS

V.1. Metodología

Este anexo tiene como finalidad explicar la metodología y las técnicas de caracterización empleadas durante el periodo de aprendizaje de la tesis doctoral y que no aparecen descritas en las publicaciones presentadas.

Funcionalización con APTS

La superficie de los MBG se funcionalizó para proveer de grupos amino que permitirán un subsiguiente anclaje de MPC. Para la obtención de un MBG-APTS, 1 g MBG seco se dispersó en 80 mL de tolueno anhidro (99.8%) bajo condiciones de N_2. Después de dispersarlo vigorosamente durante 90 min a 40ºC, se añadió una solución de 1,6 mL de APTS en 10 mL tolueno anhidro. Esta reacción se mantuvo a 80ºC en condiciones de N_2 y refrigeración a reflujo durante 24 h.

El producto resultante se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4ºC. Seguidamente se lavó una vez con propanol anhidro, después con ethanol y finalmente con metanol. El MBG-APTS se dejó secar a 80ºC durante 24 h antes de poder trabajar con el.

Funcionalización con MPC

Esta funcionalización se llevó a cabo para añadir una molécula terminada por un grupo fosfato y seguidamente una amina terciaria, dando lugar a una superficie *zwitteriónica* (carga neutra).

Para ello se disolvió 0,4 g de MPC en 90 mL de acetonitrilo a 80ºC durante 2 bajo condiciones de N_2 y en agitación Tras esto, todo el volumen se pasó a otro matraz con 0,8 g de MBG-APTS seco, manteniendo dicha reacción a 85ºC en condiciones de N_2 y a reflujo durante 24 h.

Finalmente, el producto se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4ºC. Seguidamente se lavó una vez con acetonitrilo y después con dos lavados con ethanol. El MBG-APTS-MPC se dejó secar a 80ºC durante 24 h.

Extracción de RNA mensajero

Se extrajerón muestras de RNA de células que estuvieron al menos 10 días en contacto con un material de los anteriormente descritos y fueron cultivadas en placas de 6 pocillos, es decir, en pocillos con un area de 10 cm^2.

Para realizar la extracción, se retiró el medio de cultivo y se lavó una vez con PBS. Se añadió 1 mL de Trizol (Invitrogen, Groningen, Paises Bajos) a cada pocillo y se dejó reaccionar durante 10 minutos a 25ºC. Tras este tiempo se recogen con cuidado de levantar las células del pocillo y se trasladan a eppendorf de 2 mL. A cada muestra se le añade 200 µL de cloroformo y se agitan al vortex durante 15 s., tras la agitación se deja reposar 15 min a 25ºC., para favorecer la separación de fases.

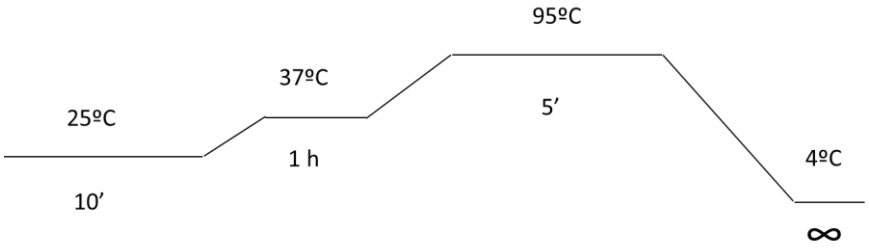
Seguidamente, se centrifugan las muestras a 10.000 rpm durante 15 min a 4ºC. El producto resultante constará de una fase compuesta por DNA/RNA y una fase inferior con el resto de componentes celulares. Recogemos la fase superior y le añadimos 500 µL de isopropanol. Se invierten los tuvos varias veces y se deja reposar 10 min a 25ºC. Tras esto, se centrifuga a 10.000 rpms a 4ºC , dando lugar de esta forma a un pellet de RNA y un sobrenadante de DNA. Se retira el sobrenadante de DNA por decantación y el pellet de RNA se resuspende en 1 mL de ethanol absoluto para guardarlo 24 h a 4ºC. Tras el tiempo de espera, se centrifugan las muestras a 6000 rpm 7 min a 4ºC. El sobrenadante se descarta y se resuspende el pellet nuevamente en 30 µL de agua libre de RNAsas, en este punto las muestras se guardan a -20ºC hasta su procesamiento.

Retrotranscripción a DNA complementario (DNAc)

Para poder realizar la PCR a tiempo real es necesario llevar a cabo un procesamiento del RNA mensajero y transformarlo a DNA para que la DNA polimerasa se capaz de llevar a cabo la reacción de síntesis.

Antes de retrotranscribir el RNA se realizó una valoración de su pureza mediante su análisis al espectrofotómetro midiendo su absorbancia a 280 y 260 nm. En una reacción tipo, se prepara una solución con 2 µg, 9 µL de agua libre de RNAasa , 10 µL de RT Buffer MIXC 2X (Applied biosystems) y 1 µL de RT Enzyme Mix 20X (Applied biosystems) tal como se describe por la casa comercial (Applied Biosystems-Thermo Scientific,Foster City, CA, USA).

Tras esto las muestras se colocan en el equipo (QuantuStudio5) que lleva a cabo que lleva a cabo un ciclo de temperatura necesario para que se produzca la reacción de polimerización del DNAc (**Esquema 6**)



Esquema 6. Rampas de temperatura necesaria para la síntesis de DNAc a partir de RNA mensajero.

Una vez obtenido el DNAc, se diluyen las muestras con 100 µl de agua libre de RNAsas y se guardan a -20ºC.

PCR a tiempo real

Para llevar a cabo la cuantificación se llevo a cabo una reacción en la que se añadió 3 µL de DNAc, 0,5 µL de los primers específicos de ratón con sondas TaqMan MGB específicas de: Runx2, ALP y GAPDH (gen housekeeping) (assay-by-DesignSM; Applied Biosystems), 6,5µL de agua libre de RNAasa, y 10 µL de TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied biosystems). Tras una incubación inicial de 2 minutos a 50ºC y 10 min a 95ºC, las muestras se sometieron a 50 ciclos de: 95ºC durante 15 s y 60ºC

durante 60 s. Se calculó el número de pasos de la amplificación necesarios para alcanzar uin Ct arbritario del gen en estudio. La expresión relativa de los genes se represento mediante la ecuación $2^{-\Delta\,\Delta Ct}$, donde $\Delta\,\Delta Ct = \Delta C_{Tratamiento} - \Delta C_{Control}$.

Caliración de la bioimpresora Biotplotter™

Para la formación de los andamaios BL y 4ZN, se utilizó la impresora 3D Bioplotter™ (EvinsionTEC, Gladbeck, Alemania). Antes de realizar una impresión, se precisó de calibrar una serie de paramatros cruciales para la obtención de un andamio robusto pero a la vez con canales para facilitar su hidratación y el intercambio de iones.

En primer lugar se diseño la estructura del andamio a través de ficheros CAD. Dichos ficheros permiten dibujar la arquitectura del andamio en dos dimensiones (**Figura 35**). El equipo se encargará de dibujar el patrón diseñado sucesivas veces hasta construir una altura específica.

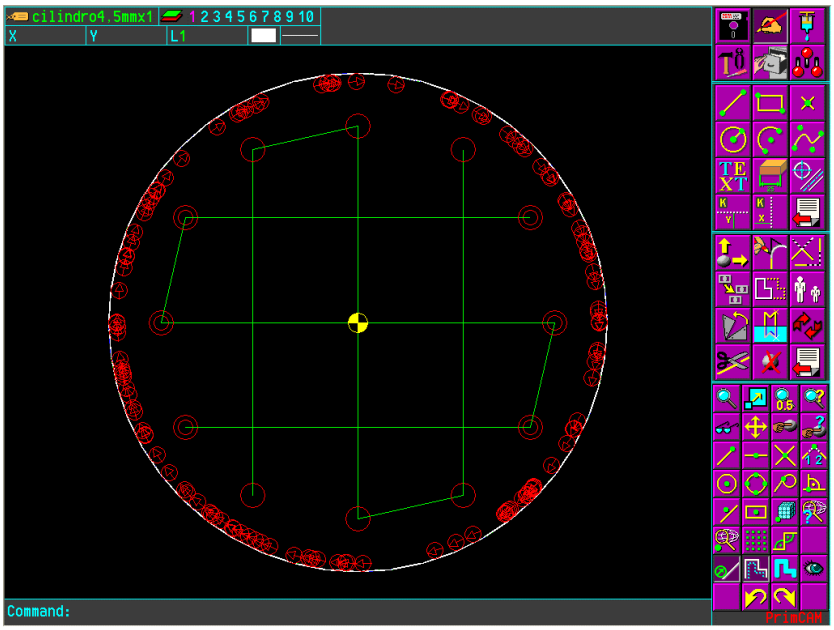


Figura 35. Archivo CAD con la arquitectura 2D de un andamio cilíndrico de muestra.

El siguiente paso consiste en calibrar el eje Z. Para ello, empleamos un cartucho de polietileno y una punta de 0,54 mm e introducimos la altura deseada. (**Figura 36**).

Figura 36. Cartucho de polietileno con capacidad para 50 mL de pasta y punta metálica de 0,54 mm (morada).

Tras esto el siguiente paso consiste en introducir los distintos parametros para que el equipo lleve a cabo la impresión. Dichos parametros incluyen la presión con la que se extruye la pasta, la velocidad con la que se dibuja el andamio, el ángulo de repetición del diseño 2D y la temperatura de la plataforma (**Tabla 12**).

Tabla 12 Parametros óptimos para la impresión de MBG funcionalizados con la impresora 3D Biotplotter™.

Parámetros	Valor óptimo
Presión de extrusión	100-200 MPa
Velocidad de dibujo	300-50 mm/min
Tamaño de capa	7 mmx 5 mm
Espaciado interior	1,2 mm
Temperatura de la plataforma	25ºC
Ángulo de repetición	45º

Finalmente la pasta previamente elaborada se carga en el cartucho, se homogeiniza y se coloca en el brazo mecanico para que comience la impresión de la pasta.

Calibración de la bioimpresora REG4LIFE

Para la elaboración de los andamios trimensionales de las composiciones 0, 0.05, 0.1, 0.25% Cu_HNO_3 se empleo una impresora REGE4LIFE (**Figura 37.A**) perteneciente a la marca española Regemat3D® empleando el software REGEMAT3D Designer. Al igual que para el Bioplotter, se requirió poner a punto una serie de parametros a fin de obtener con mayor reproducibilidad el diseño de andamios.

Para comenzar el proceso de calibración, se debe empezar por calibrar la altura la plataforma de cristal por medio de unos muelles en cada esquina (**Figura 37.B**) de la plataforma cuadrada. Para comprobar que la calibración se ha llevado con éxito se comprueba que los laseres en dos de las esquinas inciden completamente en el sensor situado en los extremos opuestos a los láseres. Seguido de esto, se lleva a cabo la calibración con la punta a fin de comprobar que efectivamente la plataforma dispone de la misma altura en cada esquina. Con ayuda de una hoja de papel, se puede comprobar si se encuentra lo suficientemente cerca el extremo de la punta con la superficie de la plataforma. El siguiente paso consiste en realizar una calibración automática en la que el equipo comenzara a barrer campos en los distintos ejes hasta interrumpir el haz del laser. Finalmente, se realiza una calibración fina de forma manual (**Figura 37.C**), que tambien con ayuda de una hoja servirá para afinar la altura de la jeringa una vez comience a extruir la pasta.

Para imprimir en este equipo se empleó puntas metálicas rectas de 0.84 nm de diametro a diferencia de las empleadas en el bioplotter de 0.51 mm (**Figura 37.D**), y una jeringa de plástico de 5 mL.

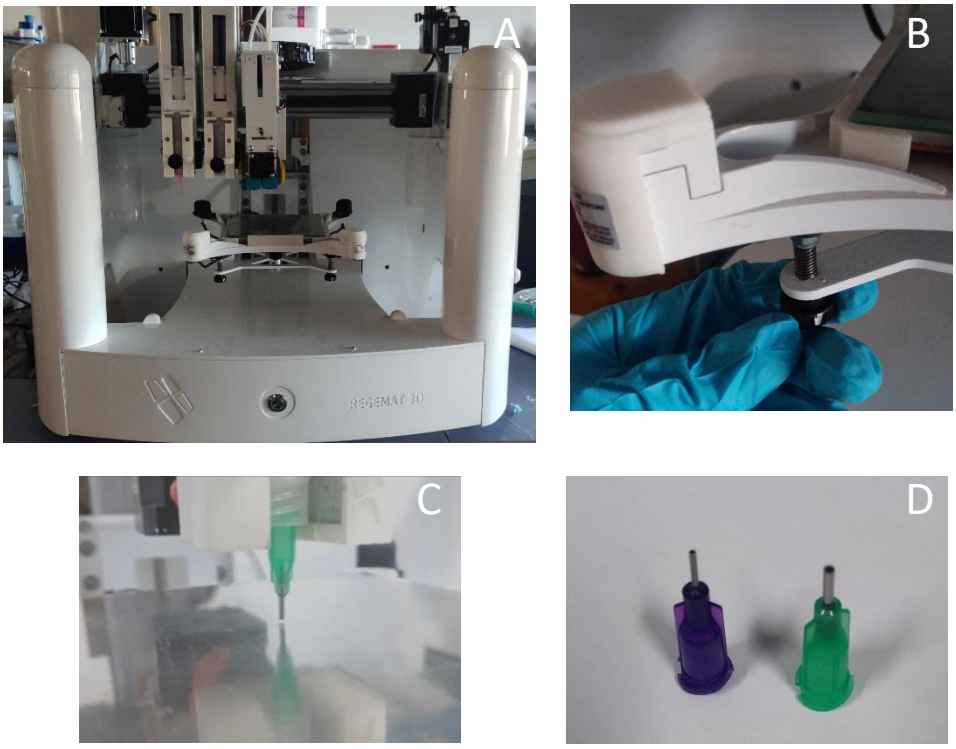


Figura 37. Equipo de impresión REGE4LIFE (**A**). Calibración de la plataforma por medio del ajuste de los muelles (**B**). Calibración fina del eje Z con una punta de 0,84 mm. Comparativa de tamaños entre una punta de 0,51 mm (morada) y una de 0,84 mm (verde).

También fue necesario la optimización de determinados parámetros de forma experimental como son la velocidad de relleno, velocidad de flujo, tamaño de la pieza a desarrollar, tamaño de los canales interiores y la temperatura de la plataforma cuadrada (**Tabla 13**).

Tabla 13. Parametros óptimos para la impresión de MBG funcionalizados con la impresora 3D REGE4LIFE.

Parámetros	Valor óptimo
Velocidad de relleno	4 mm/s
Velocidad de flujo	4 mm/s
Tamaño	15 x 15 x 15
Tamaño de los canales	2 mm
Temperatura de la plataforma	50ºC

V.2. Equipos y técnicas empleadas

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

Esta técnica se basa en el empleo de un haz de radiación infrarroja sobre la muestra problema y medir la radiación incidente absorbida. El análisis viene determinado por la frecuencia de vibración de los enlaces que forman las estructuras moleculares. De esta forma, es posible analizar la composición de grupos que conforman una muestra problema, así como los grupos funcionales que hayamos decidido anclar al material.

La fortaleza de los enlaces, la masa de los átomos implicados, la simetría de la molécula y vibración característica son factores que definen las absorciones activas. Esto significa que el espectro de infrarrojo es característico de cada compuesto analizado.

Esta técnica ha resultado fundamental a la hora de evaluar la presencia de enlaces químicos tanto del esqueleto inorgánico de los vidrios mesoporosos bioactivos como de los grupos orgánicos anclados a la superficie del material, así como, la evolución de la capa superficial al entrar en contacto con fluidos biológicos simulados.

Termogravimetría y análisis térmico diferencial (TG/ DTA)

Esta técnica evalúa los cambios en las propiedades físicas y químicas ante un aumento constante de temperatura. Este análisis permite obtener la pérdida de masa del material conforme la temperatura aumenta con el tiempo, por lo que acudiendo a la bibliografía podemos estipular que materia orgánica se está eliminando cuando observamos un descenso de la masa del material a una temperatura dada.

Durante la realización de este trabajo se utilizó para corroborar la eliminación total de los agentes directores de síntesis, mediante el método estándar de extracción del surfactante por calcinación. Esta técnica, también se empleó para realizar una cuantificación aproximada de la cantidad de grupos silanol presentes en la superficie de los materiales y poder establecer las cantidades apropiadas de grupo funcionalizante necesarias para su conjugación. Mediante un análisis TG podemos comparar la pérdida de un material básico, frente a la pérdida del mismo material tras haberlo conjugado con un grupo funcionalizante, de forma que la pérdida de masa adicional de este último material se corresponderá con la masa del funcionalizante anclado.

Para realizar estos análisis se monitorizó la masa de las muestras a medida que la temperatura aumenta con una rampa de 10ºC/min desde 25 a 600ºC. La pérdida de masa experimentada por la muestra en el rango de temperaturas de entre 150º y 550º C es la asociada a la cantidad de materia orgánica en el material, mientras que la pérdida de masa obtenida a partir de 550ºC es a consecuencia de la condensación de los grupos silanoles.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y energía dispersiva de rayos X (EDS)

Esta técnica tiene su fundamento en la utilización de haces de electrones obtenidos mediante lentes magnéticas que se proyectan y atraviesan la muestra de estudio. Mediante las propiedades ondulatorias de los electrones se puede obtener una imagen y los diagramas de difracción. Mediante esta técnica se pueden obtener defectos planares, contraste de fases de los materiales e imágenes a escala atómica (Microscopía electrónica de alta resolución). Dado que la imagen se obtiene por medio de los electrones que atraviesan la muestra, el grosor de la muestra debe de ser fino.

También puede evaluarse la composición elemental de forma semicuantitativa. Esto se consigue mediante una señal de rayos X con la que se irradia la muestra. Este tipo de análisis se conoce como análisis EDS. Resulta especialmente útil para corroborar la obtención de un material con una composición atómica cercana a la calculada nominalmente.

Esta técnica se ha empleado para la observación del orden mesoporoso de los materiales, la evaluación de la composición atómica, el tamaño de las nanopartículas de vidrio bioactivas, así como su circularidad.

Microscopía Electrónica de barrido (SEM)

Mediante el SEM se obtienen imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra basándose en las interacciones producidas entre los electrones y el material analizado. Se incide sobre una muestra opaca con un haz de electrones, mientras se realiza un barrido de la muestra siguiendo una trayectoria de líneas paralelas al barrido para formar una imagen. Los electrones secundarios y los retrodispersados son recogidos por detectores para formar la imagen final. Estos microscopios disponen de una gran profundidad de campo que permiten enfocar gran parte de la muestra al mismo tiempo.

Al igual que en el TEM, mediante este tipo de microscopía puede obtenerse un análisis EDS, sin embargo, poder hacerlo las muestras se deben preparar las muestras para que sean conductoras. Para ello se las recubre de una fina capa de materiales conductores como grafito u oro. En este ejercicio, se han empleado los recubrimientos de grafito para obtener una imagen aproximada del material y poder realizar un análisis EDS de su composición atómica. Una vez realizado, se recubrió con oro para obtener imágenes con una mayor nitidez de los materiales estudiados. Esta técnica es especialmente útil para apreciar la evolución de la superficie de los materiales bioactivos al entrar en contacto con fluidos fisiológicos simulados, observándose la aparición de una fase apatita en su superficie.

Las imágenes obtenidas por SEM en este trabajo han sido realizadas por un microscopio electrónico JEOL JSM-7600F (Tokio, Japón) o bien un JEM-2100 JEOL (Tokio, Japón) operando con un voltaje de aceleración de 15-20 0kV respectivamente. Este microscopio se encuentra en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid. Los análisis EDS se realizaron con un sistema Oxford implementado al mismo microscopio que toma las imágenes.

Microscopia confocal de fluorescencia

La microscopia confocal de fluorescencia es un tipo de microscopia que se basa en el uso de un colimador (una apertura situada delante del fotomultiplicador) para la eliminación de la luz fuera del plano focal. Esto permite obtener imágenes de capas discretas (a escala micrométrica) del plano focal. Mediante la apilación de todos los planos pueden construirse recreaciones tridimensionales. Su uso está muy extendiendo dentro del campo de la investigación biomédica, ya que permite el seguimiento y análisis de procesos biológicos o tejidos mediante el marcaje de las biomoléculas fluorescentes.

Durante la tesis doctoral se ha empleado el equipo OLYMPUS FV 1200 (Tokio, Japón) usando una lente de inmersión en agua 60X Fluor (NA=1), para la obtención de imágenes de andamios de vidrio mesoporosos bioactivos colonizados por células pre-osteoblásticas MC3T3-E1. También se han construido imágenes tridimensionales de biofilms de *S. aureus* tratados con nanopartículas huecas de vidrio bioactivas enriquecidas con cobre y cargadas con danofloxacino.

Difracción de rayos-X (XRD)

La técnica de difracción de rayos X permite evaluar la periocidad de un material. Está técnica emplea un tipo de radiación electromagnética cuya longitud de onda se encuentra comprendida entre 1 y 100 Å.

La difracción solo se obtiene en determinados ángulos de acuerdo con la Ley de Bragg definida por la siguiente ecuación:

$$n\,\lambda = 2\mathrm{d}_{\mathrm{hkl}} sen\,\theta$$

Para dicha ecuación, n es el numero entero, λ es la longitud de onda de la radiación. D es la distancia interplanar y θ es el ángulo de incidencia. La muestra se expone a un haz de rayos X monocromático mediante un cátodo de cobre utilizándose la radiación de la línea Cu Kα (λ = 1.5418 A). Las difracciones se realizaron a bajo ángulo (2θ= 0.6- 6.5) con un tamaño de paso de 0.02º (2θ) con un tiempo de conteo de 5 segundos. La estructura cristalina se puede inferir mediante la posición de los máximos de difracción correspondientes a cada familia de planos (hkl). Mediante esta técnica se puede evaluar el orden mesoporoso del material de estudio.

Para esta tesis doctoral, se ha utilizado la difracción de rayos X a bajo ángulo para estudiar el grado de orden mesoporoso de las distintas composiciones. Aunque los vidrios mesoporosos bioactivos, están formados de vidrio amorfo a escala atómica, su mesoestructura es ordenada. Esto permite que con esta técnica se obtengan reflexiones que dan lugar a máximos de difracción a bajo ángulo cuando los poros están ordenados.

Resonancia Magnética Nuclear de ^{29}Si y ^{31}P (RMN)

Esta técnica se emplea para determinar la estructura molecular de los vidrios mesoporosos bioactivos. Su fundamento se basa en la interacción de los momentos magnéticos de los núcleos atómicos con un campo magnético externo. Los núcleos con un momento magnético distinto a 0 absorben la radiación

electromagnética en el rango de la radiofrecuencia. La frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno químico de estos núcleos irradiados, con lo que es posible determinar la estructura de las moléculas dependiendo del desplazamiento al que aparecen las señales. De esta forma, esta característica se puede emplear para determinar la estructura química de la molécula donde se encuentran estos núcleos.

La caracterización de los materiales estudiados se ha llevado a cabo mediante la caracterización por RMN de materiales sólidos, rotación de ángulo mágico (MAS-RMN) y polarización cruzada (CP-RMN). La técnica de MAS-RMN permite reducir la anchura de bandas del espectro debido a las interacciones dipolares, cuadrupolares y a las anisotropías asociada al desplazamiento químico. Mediante la técnica CP-RMN, se obtiene una mejor relación de bandas a la par que se evita el ruido de fondo del espectro de núcleos con abundancia natural baja, sin afectar a la resolución del espectro.

Los análisis que se realizaron para esta tesis doctoral fueron para los núcleos ^{29}Si y ^{31}P tanto para la polarización cruzada (CP) como para rotación de ángulo mágico (MAS). Se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AV-400-WB a 79.49 y 161.97 MHz, a una velocidad de giro de 10 kHz para el 29Si y de 6 kHz para el 31P. Para estandarizar las mediciones realizadas se empleó como control tetrametilsilano (TMS) y 85% de H_3PO_4 de ^{29}Si y ^{31}P, respectivamente. Los espectros se registraron con tiempo de contacto de 1 ms. El período de tiempo entre las sucesivas acumulaciones fue de 5 y 4 s para las medidas ^{29}Si y ^{31}P.

Mediante esta técnica se evaluó la conectividad de red de las diferentes composiciones empleadas. Además, se pudo obtener el estado de oxidación de los cationes de cobre incorporado en las distintas composiciones.

Potencial zeta (ζ)

El potencial ζ es una técnica que tiene su fundamento en la medición diferencial del potencial existente entre el medio de dispersión y la capa de fluido estacionario existente en la superficie de los materiales en dispersión. La información que nos aporta esta técnica es la magnitud de la repulsión o atracción que se produce entre las partículas cargadas electrostáticamente en dispersión. Los resultados se expresan en valores positivos o negativos del ζ de una suspensión del material en el medio en el que se encuentran. Dado que la medición depende del pH del medio, es necesario realizar la medición en el mismo medio en el cual se vayan a realizar los subsiguientes ensayos para que la información sea comparable con los resultados obtenidos por esta técnica.

Durante esta tesis doctoral, se ha empleado dicha técnica para estudiar la carga eléctrica superficial que presentaban los materiales estudiados. También resultó de especial ayuda para determinar la carga antes y después de la modificación de la superficie de los materiales y así dictaminar si se han anclado grupos funcionales. El medio de suspensión empleado ha sido PBS al 0.01%.

Dispersión de luz dinámica

La dispersión de luz dinámica (DLS) se basa en la capacidad que tiene la luz de dispersarse cuando atraviesa una fase liquida con material en dispersión. Cuando una partícula se ilumina con una fuente de luz, la luz se difumina en diferentes direcciones. El movimiento Browniano descrito por las partículas en suspensión hace que la luz se disperse en diferentes intensidades. Las fluctuaciones de intensidad se relacionan con la velocidad del movimiento Browniano y esto a su vez con el tamaño de partículas mediante la relación de Stokes-Einstein.

Con esta técnica se puede establecer el tamaño de partícula siempre que sea dentro del rango de entre 1 nm y 1 µm, por lo que es especialmente útil para la determinación del tamaño de las nanopartículas de las distintas composiciones sintetizadas.

Adsorción de nitrógeno

Mediante esta técnica se puede analizar las propiedades texturales, es decir, la superficie específica, volumen de poro y tamaño de poro. Su fundamento se basa en la interacción que se produce entre el adsorbato, en este caso el nitrógeno gas y el material de estudio (absorbente). Los resultados de esta técnica se muestran como isotermas de adsorción -desorción en los que se relaciona el volumen de gas retenido por la superficie del sólido en función de las condiciones de presión. Existen diferentes tipos de isotermas clasificados por la IUPAC, sin embargo,para los vidrios mesoporosos bioactivos, la predominante es la de tipo IV. Este tipo de isoterma se caracteriza por presentar un incremento importante de la cantidad de nitrógeno adsorbida a presiones relativas intermedias, que se produce mediante la apilación de multicapas de N_2.

Para la obtención de las propiedades texturales se han aplicado diversos modelos matemáticos:

- Brunauer-Emmett-Teller (BET): Mediante este método se ha podido obtener el parámetro de la superficie específica por unidad de masa.
- Barret-Joyner-Halenda (BJH): Con este modelo matemático se pudo obtener las medidas de tamaño de poro expresadas en nm, dentro del rango de 2-50 nm.

Si bien, para la superficie específica y el tamaño de poro es necesario aplicar un modelo matemático, para el volumen de poro no es necesario, pues se obtiene de forma directa por el volumen ocupado por el adsorbato dentro del adsorbente a una presión determinada.

En esta tesis ha sido de especial utilidad dicha técnica pues, has supuesto un requisito obligatorio para comprobar la correcta obtención de materiales mesoporosos y evaluar su idoneidad en base a sus propiedades texturales. Además, ha supuesto un análisis adicional para comprobar la funcionalización de los materiales, así como la carga de estos con diversas biomoléculas.

Espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis)

Esta técnica emplea radiación electromagnética comprendida en las regiones visibles, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético comprendido entre las longitudes de onda de 200 y 780 nm. Esta técnica permite obtener medidas de la diferencia de intensidad entre el haz de luz emitido sobre la muestra en disolución y el haz incidente. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas.

La espectroscopia UV-Vis resulta especialmente útil para determinar la concentración de biomoléculas liberadas desde los vidrios mesoporosos bioactivos.

Espectroscopia de fluorescencia y microscopía de fluorescencia

La espectrometría de fluorescencia, conocida también como fluorimetría se basa en el empleo de un haz de luz, en gran mayoría de los casos luz ultravioleta, que excita los electrones de las moléculas de ciertos compuestos. Cuando una molécula fluorescente absorbe fotones de luz puede pasar a distintos estados vibracionales del estado electrónico excitado. Las colisiones entre las moléculas causan que la molécula excita pierda energía vibracional, alcanzando así el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado. Una vez ocurrido esto, la molécula regresa al estado vibracional del estado electrónico relajado, emitiendo un fotón en el proceso con una longitud de onda distinta, a la longitud de onda con la que la molécula fluorescente fue excitada. Los fotones emitidos tendrán diferentes energías en función del estado vibracional del que desciendan, por lo que se puede determinar mediante esta técnica la estructura de los diferentes niveles de vibración.

La microscopía de fluorescencia utiliza el mismo principio físico. El microscopio de fluorescencia sirve para obtener imágenes de la fluorescencia emitida por los materiales una vez son irradiados con una luz de determinada longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda.

La espectroscopia de fluorescencia ha sido empleada en esta tesis para la determinación y cuantificación de biomoléculas en disolución acuosa, mientras que la microscopía de fluorescencia se ha empleado en la observación de nanopartículas marcadas con FTIC.

Citometría de flujo

Es una herramienta de análisis que permite discriminar partículas microscópicas o células de diferente tamaño y con distinta fluorescencia. Una suspensión se hace pasar por una serie de detectores mediante un constante flujo laminar. Las partículas pasan una a una por un capilar hasta cruzar el haz de un rayo láser. Cuando este rayo láser incide en una célula, la luz se desvía con un determinado ángulo hacia delante y los lados de la partícula. La luz dispersada hacia delante posee información sobre el tamaño, mientras que la luz dispersada hacia los lados indica la complejidad y morfología. Además, si la partícula está marcada con un fluoróforo, o es autofluorescente, la luz se procesa a través

de los distintos fotomultiplicadores, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro. El análisis se realiza a velocidades de miles de partículas/segundo, lo que permite obtener datos de elevada fiabilidad estadística, así como identificar poblaciones representadas en baja frecuencia dentro de la población global. También es importante mencionar que el análisis se realiza partícula a partícula de forma individualizada por lo que el objeto de estudio debe encontrarse en suspensión y correctamente dispersado. El inconveniente que presenta esta técnica es el tamaño de partícula que debe de presentar, pues su detección se encuentra comprendida entre 0.5-100 µm.

Esta técnica se emplea como análisis rutinario en muchos laboratorios clínicos y de investigación de células individualizadas mediante la utilización de fluorocromos y sondas fluorescentes específicas de muy diversos parámetros celulares.

En esta tesis se ha empleado esta técnica para el análisis de poblaciones celulares al tratarlas con diferentes composiciones de nanopartículas huecas de vidrio bioactivo y conocer de esta forma cambios físicos en las células como el tamaño, su complejidad y mediante sondas estudiar su citocompatibilidad en presencia de dichas nanopartículas.

Modelado molecular

El modelado molecular es una técnica de análisis que engloba tanto métodos teóricos como técnicas computacionales. Para elaborar un análisis, se emplean métodos físicos que abarcan la termodinámica, mecánica clásica, estadística, química computacional y la bioquímica. Los modelados moleculares describen los átomos como cargas puntuales con una masa asociada. Las interacciones entre los átomos son descritas por interacciones tipo oscilador armónico y por fuerzas de van der Waals, mientras que las interacciones electroestáticas son calculadas por la Ley de Coulomb. El software encargado de procesar la información sitúa los átomos en un espacio cartesiano y les asigna velocidades al realizar simulaciones dinámicas.

Este análisis permite representar estructuras moleculares y simular su comportamiento en diferentes situaciones. Mediante esta técnica se pueden obtener directamente datos moleculares que incluyen geometrías, energías, propiedades electrónicas, propiedades espectroscópicas y las propiedades del material compacto (bulk). Hoy en día se considera una de las pocas técnicas que permite obtener información de la naturaleza de los materiales a nivel molecular.

RT-PCR

Esta técnica deriva de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa clásica (PCR). El fundamento de ambas técnicas consiste en la reproducción de una hebra de DNA y replicarla hasta obtener suficiente cantidad de DNA como para poder vislumbrarlo en un gel de electroforesis. Para ello se llevan a cabo una reacción de replicación repetida de 20 a 35 ciclos que constan de 3 pasos cada uno:

1. Desnaturalización: El primer paso consiste en elevar la temperatura de la muestra lo suficiente para que se produzca la desnaturalización de la doble cadena de DNA. Generalmente suele emplearse temperaturas superiores a 90ºC.

2. Alineamiento: En esta fase, reduce la temperatura de la muestra para facilitar que se produzca el apareamiento de la muestra problema con hebras de poca longitud homólogas, conocidas como primers.

3. Elongación: La DNA polimerasa se une a los primers y comienza a sintetizar la hebra opuesta a la cadena de DNA problema, incorporando las bases opuestas a la cadena problema y gastando ATP durante el proceso.

La PCR cuantitativa difiere de la PCR clásica en que se emplea cDNA, es decir DNA que proviene de la retrotranscripción de RNA mensajero y por lo tanto el DNA carece de intrones. Por otra parte, se necesita de cebadores con sondas fluorescentes de forma que cada vez que se elongue una cadena de DNA se emita una señal de luz. El sistema cuantifica la cantidad de veces que se emite luz debido a la reacción de síntesis de la cadena para darnos aproximadamente un valor. Por último, se necesita cuantificar la expresión basal de un gen que se exprese en todos los linajes celulares, conocido como gen *housekeeping* y que sirva para comparar si el gen problema se está expresando por encima o per debajo de los niveles que se expresa el gen *housekeeping*.

ANEXO II: RESULTADOS DERIVADOS DE LA TESIS

VI. ANEXO II: RESULTADOS DERIVADOS DE LA TESIS

Publicaciones

- J.Jiménez-Holguín, A. López-Hidalgo, S. Sánchez-Salcedo, *et al*. 2020. Strontium- modified scaffolds based on mesoporous bioactive glasses / polyvinyl alcohol composites for bone regeneration. Material, 13 - 23, pp. 5526. MDPI, 03/12/2020. DOI:10.3390/ma13235526
- C. Heras; J. Jiménez-Holguín; A. L. Doadrio; *et al*. 2020. Multifunctional antibiotic and zinc containing mesoporous bioactive glass scaffolds to fight bone infection Acta Biomaterialia. 114-15, pp.395-406. DOI:10.1016/j.actbio.2020.07.044
- J. Jiménez-Holguín; S. Sánchez-Salcedo; M. Vallet-Regí; *et al*. 2020. Development and evaluation of copper-containing mesoporous bioactive glasses for bone defects therapy Microporous and Mesoporous. Materials. 308, pp.110454. DOI:10.1016/ j.micromeso.2020.110454
- J. Jiménez-Holguín; S. Sánchez-Salcedo; M. Vallet-Regí; *et al*. 2020. Development and evaluation of copper-containing mesoporous bioactive glasses for bone defects therapy Microporous and Mesoporous. Materials. 308, pp.110454. DOI:10.1016/ j.micromeso.2020.110454
- Clara Heras Rubio; Sandra Sánchez Salcedo; Javier Jiménez Holguín. Antibacterial Capability of 3D meso-macroporous scaffolds enriched with zinc and osteostatin. Abstracts: 45th ESAO Congress, 12-15 September 2018, Madrid, International Journal of Artificial Organs.41 - 9, pp. 559 - 560. Andrea Remuzzi, 07/08/2018. 10.1177/0391398818785526
- J. Jiménez-Holguín; S. Sánchez-Salcedo; M. Cicuéndez; *et al*. 2022. Cu-doped hollow bioactive glass nanoparticles for bone infection treatment----------

Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales

- S. Sánchez-Salcedo, C. Heras, J. Jiménez, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí. Antibacterial capability of 3D meso-macroporous scaffolds enriched with zinc and osteostatin. XLV ESAO 2018 Congress, Madrid, (España).
- C. Heras, J. Jiménez-Holguín, S. Sánchez-Salcedo, M. Vallet-Regí, A. J. Salinas. Porous scaffolds based on ZnO-mesoporous glasses loaded with antibiotics as antibacterial and bone regenerative materials. EUROMAT Congress 2019, Estocolmo (Suecia).
- C. Heras, J. Jimenez-Holguín, S. Sánchez-Salcedo, A. L. Doadrio, M, Vallet-Regí, A. J. Salinas. Antibacterial 3D meso-macroporous scaffolds doped with zinc and loaded with antibiotics. III Jornadas de PhDay, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, Madrid (España).

- Javier Jiménez Holguín; Sandra Sánchez Salcedo; Camino De Juan Romero; María Vallet Regí; Antonio Salinas Sánchez. Mesostructural features, bioactivity and behavior in a chicken embryo model of CuO-enriched mesoporous bioactive glasses. EUROMAT Congress 2019, Estocolmo (Suecia).

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

[1] T.D. White, M.T. Black, P.A. Folkens, Human osteology: Third edition, Hum. Osteol. Third Ed. (2011) 1–662.

[2] N.K. Lee, H. Sowa, E. Hinoi, M. Ferron, J.D. Ahn, C. Confavreux, R. Dacquin, P.J. Mee, M.D. McKee, D.Y. Jung, Z. Zhang, J.K. Kim, F. Mauvais-Jarvis, P. Ducy, G. Karsenty, Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton, Cell. 130 (2007) 456. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.05.047.

[3] B.L. Riggs, L.J. Melton III, R.A. Robb, J.J. Camp, E.J. Atkinson, L. McDaniel, S. Amin, P.A. Rouleau, S. Khosla, A Population-Based Assessment of Rates of Bone Loss at Multiple Skeletal Sites: Evidence for Substantial Trabecular Bone Loss in Young Adult Women and Men, J. Bone Miner. Res. 23 (2008) 205. https://doi.org/10.1359/JBMR.071020.

[4] R. Huiskes, R. Ruimerman, G.H. van Lenthe, J.D. Janssen, Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone, Nat. 405 (2000) 704–706. https://doi.org/10.1038/35015116.

[5] C.R. Jacobs, The mechanobiology of cancellous bone structural adaptation, Aff. J. Rehabil. Res. Dev. 37 (2000) 209–216.

[6] M.-C. Monier-Faugere, M. Chris Langub, H.H. Malluche, Bone Biopsies: A Modern Approach, Metab. Bone Dis. Clin. Relat. Disord. (1998) 237-280. https://doi.org/10.1016/B978-012068700-8/50009-8.

[7] J.P. Bilezikian, L.G. Lawrence G. Raisz, T.J., Martin, Principles of bone biology, (2008).

[8] C. Rey, Calcium Phosphates for Medical Applications, Calcium Phosphates Biol. Ind. Syst. (1998) 217–251. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5517-9_10.

[9] M. Vallet-Regí, J.M. González-Calbet, Calcium phosphates as substitution of bone tissues, Prog. Solid State Chem. 32 (2004) 1–31. https://doi.org/10.1016/J.PROGSOLIDSTCHEM.2004.07.001.

[10] M. Capulli, R. Paone, N. Rucci, Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers, Arch. Biochem. Biophys. 561 (2014) 3–12. https://doi.org/10.1016/J.ABB.2014.05.003.

[11] X. Li, L. Qin, M. Bergenstock, L.M. Bevelock, D. V. Novack, N.C. Partridge, Parathyroid Hormone Stimulates Osteoblastic Expression of MCP-1 to Recruit and Increase the Fusion of Pre/Osteoclasts, J. Biol. Chem. 282 (2007) 33098–33106. https://doi.org/10.1074/JBC.M611781200.

[12] J.T. Swarthout, R.C. D'Alonzo, N. Selvamurugan, N.C. Partridge, Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells, Gene. 282 (2002) 1–17. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00798-3.

[13] K.M. Sinha, X. Zhou, Genetic and molecular control of Osterix in skeletal formation, J. Cell. Biochem. 114 (2013) 975. https://doi.org/10.1002/JCB.24439.

[14] T. Komori, H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R.T. Bronson, Y.H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki, T. Kishimoto, Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts, Cell. 89 (1997) 755–764. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80258-5.

[15] D. Chen, M. Zhao, G.R. Mundy, Bone Morphogenetic Proteins, Growth Factors. 22 (2009) 233–241. https://doi.org/10.1080/08977190412331279890.

[16] R.L. Jilka, R.S. Weinstein, T. Bellido, A.M. Parfitt, S.C. Manolagas, Osteoblast programmed cell death (apoptosis): Modulation by growth factors and cytokines, J. Bone Miner. Res. 13 (1998) 793–802. https://doi.org/10.1359/JBMR.1998.13.5.793.

[17] T.A. Franz-Odendaal, B.K. Hall, P.E. Witten, Buried alive: How osteoblasts become osteocytes, Dev. Dyn. 235 (2006) 176–190. https://doi.org/10.1002/DVDY.20603.

[18] M.G. Mullender, D.D. Van Der Meer, R. Huiskes, P. Lips, Osteocyte density changes in aging and osteoporosis, Bone. 18 (1996) 109–113. https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00444-0.

[19] G.Y. Rochefort, S. Pallu, C.L. Benhamou, Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue, Osteoporos. Int. 21 (2010) 1457–1469. https://doi.org/10.1007/S00198-010-1194-5.

[20] L.F. Bonewald, Osteocytes as dynamic multifunctional cells, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1116 (2007) 281–290. https://doi.org/10.1196/ANNALS.1402.018.

[21] B.S. Noble, H. Stevens, N. Loveridge, J. Reeve, Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone, Bone. 20 (1997) 273–282. https://doi.org/10.1016/S8756-3282(96)00365-1.

[22] D.G. Winkler, M.K. Sutherland, J.C. Geoghegan, C. Yu, T. Hayes, J.E. Skonier, D. Shpektor, M. Jonas, B.R. Kovacevich, K. Staehling-Hampton, M. Appleby, M.E. Brunkow, J.A. Latham, Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist, EMBO J. 22 (2003) 6267–6276. https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG599.

[23] T.J. Heino, T.A. Hentunen, H. Kalervo Vnnen, Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-β: Enhancement by estrogen, J. Cell. Biochem. 85 (2002) 185–197. https://doi.org/10.1002/JCB.10109.

[24] S.C. Miller, B.M. Bowman, W.S.S. Jee, Bone Lining Cells: Structure and Function, Scanning Microsc. 3 (1989) 27.

[25] H.J. Donahue, K.J. Mcleod, C.T. Rubin, J. Andersen, E.A. Grine, E.L. Hertzberg, P.R. Brink, Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: Cell line–dependent hormonal regulation of gap junction function, J. Bone Miner. Res. 10 (1995) 881–889.

https://doi.org/10.1002/JBMR.5650100609.

[26] B.F. Boyce, D.E. Hughes, K.R. Wright, L. Xing, A. Dai, Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases., Lab. Invest. 79 (1999) 83–94. https://europepmc.org/article/med/10068197 .

[27] J. Sodek, M.D. McKee, Molecular and cellular biology of alveolar bone, Periodontol. 2000. 24 (2000) 99–126. https://doi.org/10.1034/J.1600-0757.2000.2240106.X.

[28] J. Salo, P. Lehenkari, M. Mulari, K. Metsikkö, H.K. Väänänen, Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis, Science. 276 (1997) 270–273. https://doi.org/10.1126/science.276.5310.270.

[29] C. Luxenburg, D. Geblinger, E. Klein, K. Anderson, D. Hanein, B. Geiger, L. Addadi, The Architecture of the Adhesive Apparatus of Cultured Osteoclasts: From Podosome Formation to Sealing Zone Assembly, PLoS One. 2 (2007) e179. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000179.

[30] K. Hollberg, K. Hultenby, A.R. Hayman, T.M. Cox, G. Andersson, Osteoclasts from Mice Deficient in Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Have Altered Ruffled Borders and Disturbed Intracellular Vesicular Transport, Exp. Cell Res. 279 (2002) 227–238. https://doi.org/10.1006/EXCR.2002.5612.

[31] M.J. Bossard, T.A. Tomaszek, S.K. Thompson, B.Y. Amegadzie, C.R. Hanning, C. Jones, J.T. Kurdyla, D.E. McNulty, F.H. Drake, M. Gowen, M.A. Levyi, Proteolytic Activity of Human Osteoclast Cathepsin K: expression, purification, activation, and substrate identification, J. Biol. Chem. 271 (1996) 12517–12524. https://doi.org/10.1074/JBC.271.21.12517.

[32] M.T. Engsig, Q.J. Chen, T.H. Vu, A.C. Pedersen, B. Therkidsen, L.R. Lund, K. Henriksen, T. Lenhard, N.T. Foged, Z. Werb, J.M. Delaisse, Matrix Metalloproteinase 9 and Vascular Endothelial Growth Factor Are Essential for Osteoclast Recruitment into Developing Long Bones, J. Cell Biol. 151 (2000) 879. https://doi.org/10.1083/JCB.151.4.879.

[33] M. Mulari, J. Vääräniemi, H.K. Väänänen, Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts, Microsc. Res. Tech. 61 (2003) 496–503. https://doi.org/10.1002/JEMT.10371.

[34] N. López Serna, Biología del desarrollo, Biol. Del Desarro. Cuad. Trab. (2011) 108.

[35] H.C. Anderson, Matrix vesicles and calcification, Curr. Rheumatol. Reports. 5 (2003) 222–226. https://doi.org/10.1007/S11926-003-0071-Z.

[36] B. Houston, A.J. Stewart, C. Farquharson, PHOSPHO1—A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralisation in bone and cartilage, Bone. 34 (2004) 629–637. https://doi.org/10.1016/J.BONE.2003.12.023.

[37] H.C. Anderson, The role of matrix vesicles in physiological and pathological calcification, Curr.

Opin. Orthop. 18 (2007) 428–433. https://doi.org/10.1097/BCO.0B013E3282E9AB49.

[38] R.E. Wuthier, Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles, Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab. 409 (1975) 128–143. https://doi.org/10.1016/0005-2760(75)90087-9.

[39] V.E. Arana-Chavez, A.M.V. Soares, E. Katchburian, Junctions between Early Developing Osteoblasts of Rat Calvaria as Revealed by Freeze-Fracture and Ultrathin Section Electron Microscopy, Arch. Histol. Cytol. 58 (1995) 285–292. https://doi.org/10.1679/AOHC.58.285.

[40] M.J. Glimcher, The Nature of the Mineral Phase in Bone: Biological and Clinical Implications, Metab. Bone Dis. Clin. Relat. Disord. (1998) 23-52e. https://doi.org/10.1016/B978-012068700-8/50003-7.

[41] H.C. Anderson, VESICLES ASSOCIATED WITH CALCIFICATION IN THE MATRIX OF EPIPHYSEAL CARTILAGE, J. Cell Biol. 41 (1969) 59–72. https://doi.org/10.1083/JCB.41.1.59.

[42] S.Y. Ali, S.W. Sajdera, H.C. Anderson, Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 67 (1970) 1513–1520. https://doi.org/10.1073/PNAS.67.3.1513.

[43] L.J. Raggatt, N.C. Partridge, Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling, J. Biol. Chem. 285 (2010) 25103. https://doi.org/10.1074/JBC.R109.041087.

[44] L. Cardoso, B.C. Herman, O. Verborgt, D. Laudier, R.J. Majeska, M.B. Schaffler, Osteocyte Apoptosis Controls Activation of Intracortical Resorption in Response to Bone Fatigue, J. Bone Miner. Res. 24 (2009) 597. https://doi.org/10.1359/JBMR.081210.

[45] R.J. Miron, D.D. Bosshardt, OsteoMacs: Key players around bone biomaterials, Biomaterials. 82 (2016) 1–19. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.12.017.

[46] V. Everts, J.M. Delaissié, W. Korper, D.C. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig, W. Beertsen, The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation, J. Bone Miner. Res. 17 (2002) 77–90. https://doi.org/10.1359/JBMR.2002.17.1.77.

[47] Y. Tang, X. Wu, W. Lei, L. Pang, C. Wan, Z. Shi, L. Zhao, T.R. Nagy, X. Peng, J. Hu, X. Feng, W. Van Hul, M. Wan, X. Cao, TGF-β1–induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation, Nat. Med. 15 (2009) 757–765. https://doi.org/10.1038/nm.1979.

[48] B. Fermor, T.M. Skerry, PTH/PTHrP receptor expression on osteoblasts and osteocytes but not resorbing bone surfaces in growing rats, J. Bone Miner. Res. 10 (1995) 1935–1943. https://doi.org/10.1002/JBMR.5650101213.

[49] A.G. Robling, P.J. Niziolek, L.A. Baldridge, K.W. Condon, M.R. Allen, I. Alam, S.M. Mantila, J. Gluhak-Heinrich, T.M. Bellido, S.E. Harris, C.H. Turner, Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin, J. Biol. Chem. 283 (2008) 5866–5875.

https://doi.org/10.1074/JBC.M705092200.

[50] Z. Stark, R. Savarirayan, Osteopetrosis, Orphanet J. Rare Dis. 4 (2009) 1–12. https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-5.

[51] J. Tolar, S.L. Teitelbaum, P.J. Orchard, Osteopetrosis, 351 (2009) 2839–2849. https://doi.org/10.1056/NEJMRA040952.

[52] O. of the S.G. (US), Bone Health and Osteoporosis, US Heal. Hum. Serv. (2004) 437. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45513/.

[53] B. Wharton, N. Bishop, Rickets, Lancet. 362 (2003) 1389–1400. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14636-3.

[54] R.M. Francis, P.L. Selby, Osteomalacia, Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab. 11 (1997) 145–163. https://doi.org/10.1016/S0950-351X(97)80569-1.

[55] C.J. Elder, N.J. Bishop, Rickets, Lancet. 383 (2014) 1665–1676. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61650-5.

[56] J. Sybil Biermann, D.R. Adkins, M. Agulnik, R.S. Benjamin, B. Brigman, J.E. Butrynski, D. Cheong, W. Chow, W.T. Curry, D.A. Frassica, F.J. Frassica, K.R. Hande, F.J. Hornicek, R.L. Jones, J. Mayerson, S. V. McGarry, B. McGrath, C.D. Morris, R.J. O'donnell, R. Lor Randall, V.M. Santana, R.L. Satcher, H.J. Siegel, M. Von Mehren, M.A. Bergman, H. Sundar, Bone Cancer, J. Natl. Compr. Cancer Netw. 11 (2013) 688–723. https://doi.org/10.6004/JNCCN.2013.0088.

[57] S.H. Ralston, R. Layfield, S.H. Ralston, R. Layfield, Pathogenesis of Paget Disease of Bone, Calcif. Tissue Int. 91 (2012) 97–113. https://doi.org/10.1007/S00223-012-9599-0.

[58] V. Rampal, J.L. Clément, F. Solla, Legg-Calvé-Perthes disease: classifications and prognostic factors, Clin. Cases Miner. Bone Metab. 14 (2017) 74. https://doi.org/10.11138/CCMBM/2017.14.1.074.

[59] K.N. Tu, J.D. Lie, C.K.V. Wan, M. Cameron, A.G. Austel, J.K. Nguyen, K. Van, D. Hyun, Osteoporosis: A Review of Treatment Options, Pharm. Ther. 43 (2018) 92. /pmc/articles/PMC5768298/.

[60] J.T. Lin, J.M. Lane, Osteoporosis: A review, Clin. Orthop. Relat. Res. (2004) 126–134. https://doi.org/10.1097/01.BLO.0000132404.30139.F2.

[61] F.A. Waldvogel, G. Medoff, M.N. Swartz, Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects, N. Engl. J. Med. 282 (1970) 198–206. https://doi.org/10.1056/NEJM197001222820406.

[62] E. Mylona, M. Samarkos, E. Kakalou, P. Fanourgiakis, A. Skoutelis, Pyogenic Vertebral Osteomyelitis: A Systematic Review of Clinical Characteristics, Semin. Arthritis Rheum. 39 (2009) 10–17. https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.03.002.

[63] M. Depypere, M. Morgenstern, R. Kuehl, E. Senneville, T.F. Moriarty, W.T. Obremskey, W. Zimmerli, A. Trampuz, K. Lagrou, W.J. Metsemakers, Pathogenesis and management of fracture-related infection, Clin. Microbiol. Infect. 26 (2020) 572–578. https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.08.006.

[64] A. Trampuz, W. Zimmerli, Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices, Injury. 37 (2006) S59–S66. https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.04.010.

[65] D. Wong, P. Holtom, B. Spellberg, Osteomyelitis Complicating Sacral Pressure Ulcers: Whether or Not to Treat With Antibiotic Therapy, Clin. Infect. Dis. 68 (2019) 338–342. https://doi.org/10.1093/cid/ciy559.

[66] S. Rokadiya, N.J. Malden, An implant periapical lesion leading to acute osteomyelitis with isolation of Staphylococcus aureus, Br. Dent. J. 205 (2008) 489–491. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2008.935.

[67] P.D.P. Lew, P.F.A. Waldvogel, Osteomyelitis, Lancet. 364 (2004) 369–379. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16727-5.

[68] É. Senneville, B.A. Lipsky, Z.G. Abbas, J. Aragón-Sánchez, M. Diggle, J.M. Embil, S. Kono, L.A. Lavery, M. Malone, S.A. van Asten, V. Urbančič-Rovan, E.J.G. Peters, Diagnosis of infection in the foot in diabetes: a systematic review, Diabetes. Metab. Res. Rev. 36 (2020) e3281. https://doi.org/10.1002/DMRR.3281.

[69] B.A. Lipsky, A.R. Berendt, P.B. Cornia, J.C. Pile, E.J.G. Peters, D.G. Armstrong, H.G. Deery, J.M. Embil, W.S. Joseph, A.W. Karchmer, M.S. Pinzur, E. Senneville, 2012 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections, Clin. Infect. Dis. 54 (2012) e132–e173. https://doi.org/10.1093/CID/CIS346.

[70] S. Butalia, V.A. Palda, R.J. Sargeant, A.S. Detsky, O. Mourad, Does This Patient With Diabetes Have Osteomyelitis of the Lower Extremity?, JAMA. 299 (2008) 806–813. https://doi.org/10.1001/JAMA.299.7.806.

[71] J.J. Ross, L.T. Hu, Septic arthritis of the pubic symphysis: Review of 100 cases, Medicine. 82 (2003) 340–345. https://doi.org/10.1097/01.MD.0000091180.93122.1C.

[72] D. Brtalik, M. Pariyadath, A Case Report of Infectious Sacroiliitis in an Adult Presenting to the Emergency Department with Inability to Walk, J. Emerg. Med. 52 (2017) e65–e68. https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2016.10.022.

[73] R. Dorati, A. DeTrizio, T. Modena, B. Conti, F. Benazzo, G. Gastaldi, I. Genta, Biodegradable Scaffolds for Bone Regeneration Combined with Drug-Delivery Systems in Osteomyelitis Therapy, Pharm. 10 (2017) 96. https://doi.org/10.3390/PH10040096.

[74] T. Berendt, I. Byren, Bone and joint infection, Clin. Med. 4 (2004) 510–518. https://doi.org/10.7861/CLINMEDICINE.4-6-510.

[75] F.A. Waldvogel, G. Medoff, M.N. Swartz, Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. 3. Osteomyelitis associated with vascular insufficiency, N. Engl. J. Med. 282 (1970) 316–322. https://doi.org/10.1056/NEJM197002052820606.

[76] J. Trueta, J.D. Morgan, The vascular contribution to osteogenesis. I. Studies by the injection method, J. Bone Joint Surg. Br. 42 (1960) 97–109. https://doi.org/10.1302/0301-620X.42B1.97.

[77] R.T. Morrissy, D.W. Haynes, Acute hematogenous osteomyelitis: a model with trauma as an etiology., J. Pediatr. Orthop. 9 (1989) 447–456. https://doi.org/10.1097/01241398-198907000-00013.

[78] J. Nowakowska, R. Landmann, N. Khanna, Foreign Body Infection Models to Study Host-Pathogen Response and Antimicrobial Tolerance of Bacterial Biofilm, Antibiotics. 3 (2014) 378. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS3030378.

[79] R.A. Brady, J.G. Leid, J.W. Costerton, M.E. Shirtliff, Osteomyelitis: Clinical overview and mechanisms of infection persistence, Clin. Microbiol. Newsl. 28 (2006) 65–72. https://doi.org/10.1016/J.CLINMICNEWS.2006.04.001.

[80] L.B. Regassa, R.P. Novick, M.J. Betley, Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (agr) in Staphylococcus aureus., Infect. Immun. 60 (1992) 3381. https://doi.org/10.1128/iai.60.8.3381-3388.1992.

[81] B. Dassy, T. Hogan, T.J. Foster, J.M. Fournier, Involvement of the accessory gene regulator (agr) in expression of type 5 capsular polysaccharide by Staphylococcus aureus, J. Gen. Microbiol. 139 (1993) 1301–1306. https://doi.org/10.1099/00221287-139-6-1301.

[82] M.T. Tremaine, D.K. Brockman, M.J. Betley, Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr), Infect. Immun. 61 (1993) 356–359. https://doi.org/10.1128/IAI.61.1.356-359.1993.

[83] P.K. Martin, T. Li, D. Sun, D.P. Biek, M.B. Schmid, Role in cell permeability of an essential two-component system in Staphylococcus aureus, J. Bacteriol. 181 (1999) 3666–3673. https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3666-3673.1999.

[84] A. Zecconi, F. Scali, Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases, Immunol. Lett. 150 (2013) 12–22. https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2013.01.004.

[85] J. Mainil, Escherichia coli virulence factors, Vet. Immunol. Immunopathol. 152 (2013) 2–12. https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2012.09.032.

[86] M.E. Shirtliff, J.T. Mader, Osteomyelitis, Persistent Bact. Infect. (2014) 375–396. https://doi.org/10.1128/9781555818104.CH19.

[87] R.A. Brady, J.G. Leid, J.H. Calhoun, J.W. Costerton, M.E. Shirtliff, Osteomyelitis and the role of

biofilms in chronic infection, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 52 (2008) 13–22. https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2007.00357.X.

[88] E.G. Del Pozo, J. Collazos, J.A. Cartón, D. Camporro, V. Asensi, Bacterial osteomyelitis: microbiological, clinical, therapeutic, and evolutive characteristics of 344 episodes, Rev. Española Quimioter. 31 (2018) 217. /pmc/articles/PMC6166254.

[89] L. Vemu, S. Sudhaharan, N. Mamidi, P. Chavali, Need for appropriate specimen for microbiology diagnosis of chronic osteomyelitis, J. Lab. Physicians. 10 (2018) 21. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_14_17.

[90] K.H. Schleifer, O. Kandler, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, Bacteriol. Rev. 36 (1972) 407–477. https://doi.org/10.1128/BR.36.4.407-477.1972.

[91] A. Watts, D. Ke, Q. Wang, A. Pillay, A. Nicholson-Weller, J.C. Lee, Staphylococcus aureus strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence, Infect. Immun. 73 (2005) 3502–3511. https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3502-3511.2005.

[92] P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller, Microbiología Médica., Sexta Edic, (2009).

[93] E. Cervantes-García, R. García-González, P.M. Salazar-Schettino, Características generales del Staphylococcus aureus, Rev. Mex. Patol. Clínica y Med. Lab. 61 (2014) 28–40. www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx.

[94] H.A. Verbrugh, Colonization with Staphylococcus Aureus and the Role of Colonization in Causing Infection, Staphylococci Hum. Dis. Second Ed. (2009) 253–271. https://doi.org/10.1002/9781444308464.CH12.

[95] Size Limits of Very Small Microorganisms: Proceedings of a Workshop, Size Limits Very Small Microorg. (1999). https://doi.org/10.17226/9638.

[96] M.A. Croxen, R.J. Law, R. Scholz, K.M. Keeney, M. Wlodarska, B.B. Finlay, Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli, Clin. Microbiol. Rev. 26 (2013) 822–880. https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13.

[97] J.B. Kaper, J.P. Nataro, H.L.T. Mobley, Pathogenic Escherichia coli, Nat. Rev. Microbiol. 2 (2004) 123–140. https://doi.org/10.1038/nrmicro818.

[98] M.T. Madigan, J.M. Martinko, Biology of Microorgansims, (2006) 992.

[99] S. Kargozar, M. Montazerian, S. Hamzehlou, H.W. Kim, F. Baino, Mesoporous bioactive glasses: Promising platforms for antibacterial strategies, Acta Biomater. 81 (2018) 1-19. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.052.

[100] M.J. Hill, B.S. Drasar, The normal colonic bacterial flora., Gut. 16 (1975) 318. https://doi.org/10.1136/GUT.16.4.318.

[101] A.E. Maczulak, Encyclopedia of Microbiology (Facts on File Science Library), (2011) 858. https://lib.hpu.edu.vn/handle/123456789/28081.

[102] R. Nazir, S. Rehman, M. Nisa, U. ali Baba, Exploring bacterial diversity: from cell to sequence, Freshw. Microbiol. Perspect. Bact. Dyn. Lake Ecosyst. (2019) 263–306. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00007-4.

[103] B.R. Keith, S.L. Harris, P. Walker Russell, P.E. Orndorff, Effect of type 1 piliation on in vitro killing of Escherichia coli by mouse peritoneal macrophages, Infect. Immun. 58 (1990) 3448–3454. https://doi.org/10.1128/IAI.58.10.3448-3454.1990.

[104] H. Kotecha, P.B. Poduval, Microbial lectins: Roles and applications, Adv. Biol. Sci. Res. A Pract. Approach. (2019) 135–147. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00009-4.

[105] I.R. Poxton, Teichoic Acids, Lipoteichoic Acids and Other Secondary Cell Wall and Membrane Polysaccharides of Gram-Positive Bacteria, Mol. Med. Microbiol. Second Ed. 1–3 (2015) 91–103. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00005-6.

[106] A.S. Duarte, A. Correia, A.C. Esteves, Bacterial collagenases – A review. 42 (2014) 106–126. https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.904270.

[107] W.L. Hynes, S.L. Walton, Hyaluronidases of Gram-positive bacteria, FEMS Microbiol. Lett. 183 (2000) 201–207. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2000.TB08958.X.

[108] H.T. Hua, X. Liu, Y. Chen, M. James, T. Demaria, Effect of Neuraminidase on Receptor-mediated Adherence of Streptococcus pneumoniae to Chinchilla Tracheal Epithelium. 122 (2009) 413–419. https://doi.org/10.1080/00016480260000111.

[109] M.L. Sanderson-Smith, D.M.P. De Oliveira, M. Ranson, J.D. McArthur, Bacterial Plasminogen Receptors: Mediators of a Multifaceted Relationship, J. Biomed. Biotechnol. 2012 (2012). https://doi.org/10.1155/2012/272148.

[110] S.J. Kornfeld, A.G. Plaut, Secretory immunity and the bacterial IgA proteases, Rev. Infect. Dis. 3 (1981) 521–534. https://doi.org/10.1093/CLINIDS/3.3.521.

[111] S. Ram, A.K. Sharma, S.D. Simpson, S. Gulati, D.P. McQuillen, M.K. Pangburn, P.A. Rice, A Novel Sialic Acid Binding Site on Factor H Mediates Serum Resistance of Sialylated Neisseria gonorrhoeae, J. Exp. Med. 187 (1998) 743. https://doi.org/10.1084/JEM.187.5.743.

[112] A.L. Genestier, M.C. Michallet, G. Prévost, G. Bellot, L. Chalabreysse, S. Peyrol, F. Thivolet, J. Etienne, G. Lina, F.M. Vallette, F. Vandenesch, L. Genestier, Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils, J. Clin. Invest. 115 (2005) 3117. https://doi.org/10.1172/JCI22684.

[113] E.P. Thi, U. Lambertz, N.E. Reiner, Sleeping with the Enemy: How Intracellular Pathogens Cope with a Macrophage Lifestyle, PLoS Pathog. 8 (2012) e1002551.

https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002551.

[114] J.E. Alouf, H. Müller-Alouf, Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects, Int. J. Med. Microbiol. 292 (2003) 429–440. https://doi.org/10.1078/1438-4221-00232.

[115] J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, H.M. Lappin-Scott, Microbial biofilms, Annu. Rev. Microbiol. 49 (1995) 711–745. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MI.49.100195.003431.

[116] I.W. Sutherland, Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework, Microbiology. 147 (2001) 3–9. https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3/CITE/REFWORKS.

[117] S.S. Branda, Å. Vik, L. Friedman, R. Kolter, Biofilms: the matrix revisited, Trends Microbiol. 13 (2005) 20–26. https://doi.org/10.1016/J.TIM.2004.11.006.

[118] G. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter, Biofilm Formation as Microbial Development. 54 (2003) 49–79. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.54.1.49.

[119] I. Lasa, J.L. del Pozo, J.R. Penadés, J. Leiva, Biofilms bacterianos e infección, An. Sist. Sanit. Navar. 28 (2005) 163–175. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=en .

[120] K. Hiramatsu, Y. Katayama, M. Matsuo, T. Sasaki, Y. Morimoto, A. Sekiguchi, T. Baba, Multi-drug-resistant Staphylococcus aureus and future chemotherapy, J. Infect. Chemother. 20 (2014) 593–601. https://doi.org/10.1016/J.JIAC.2014.08.001.

[121] L.W. Riley, Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic Escherichia coli, Clin. Microbiol. Infect. 20 (2014) 380–390. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12646.

[122] R. Gao, Q. Wang, P. Li, Z. Li, Y. Feng, Genome sequence and characteristics of plasmid pWH12, a variant of the mcr-1-harbouring plasmid pHNSHP45, from the multi-drug resistant E. coli, Virulence. 7 (2016) 732–735. https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1193279.

[123] G. Sharma, S. Sharma, P. Sharma, D. Chandola, S. Dang, S. Gupta, R. Gabrani, Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies, J. Appl. Microbiol. 121 (2016) 309–319. https://doi.org/10.1111/JAM.13078.

[124] S.K. Shukla, T. Subba Rao, Staphylococcus aureus biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins, Indian J. Med. Res. 146 (2017) S1. https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_410_15.

[125] R.A. Proctor, C. von Eiff, B.C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann, G. Peters, Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections, Nat. Rev. Microbiol. 4 (2006) 295–305. https://doi.org/10.1038/nrmicro1384.

[126] S. Besier, C. Smaczny, C. Von Mallinckrodt, A. Krahl, H. Ackermann, V. Brade, T.A. Wichelhaus,

Prevalence and clinical significance of Staphylococcus aureus small-colony variants in cystic fibrosis lung disease, J. Clin. Microbiol. 45 (2007) 168–172. https://doi.org/10.1128/JCM.01510-06.

[127] D. Fernández-Rodríguez, C.A. Colín-Castro, M. Hernández-Durán, L.E. López-Jácome, R. Franco-Cendejas, Staphylococcus epidermidis small colony variants, clinically significant quiescent threats for patients with prosthetic joint infection, Microbes Infect. 23 (2021) 104854. https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2021.104854.

[128] A. Kriegeskorte, S. König, G. Sander, A. Pirkl, E. Mahabir, R.A. Proctor, C. von Eiff, G. Peters, K. Becker, Small colony variants of Staphylococcus aureus reveal distinct protein profiles, Proteomics. 11 (2011) 2476–2490. https://doi.org/10.1002/PMIC.201000796.

[129] J. Seggewiss, K. Becker, O. Kotte, M. Eisenacher, M.R.K. Yazdi, A. Fischer, P. McNamara, N. Al Laham, R. Proctor, G. Peters, M. Heinemann, C. Von Eiff, Reporter metabolite analysis of transcriptional profiles of a Staphylococcus aureus strain with normal phenotype and its isogenic hemB mutant displaying the small-colony-variant phenotype, J. Bacteriol. 188 (2006) 7765–7777. https://doi.org/10.1128/JB.00774-06.

[130] H. Moisan, E. Brouillette, C.L. Jacob, P. Langlois-Bégin, S. Michaud, F. Malouin, Transcription of virulence factors in Staphylococcus aureus small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB, J. Bacteriol. 188 (2006) 64–76. https://doi.org/10.1128/JB.188.1.64-76.2006.

[131] R. Singh, P. Ray, A. Das, M. Sharma, Enhanced production of exopolysaccharide matrix and biofilm by a menadione-auxotrophic Staphylococcus aureus small-colony variant, J. Med. Microbiol. 59 (2010) 521–527. https://doi.org/10.1099/JMM.0.017046-0.

[132] G. Mitchell, E. Brouillette, D.L. Séguin, A.E. Asselin, C.L. Jacob, F. Malouin, A role for sigma factor B in the emergence of Staphylococcus aureus small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides, Microb. Pathog. 48 (2010) 18–27. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2009.10.003.

[133] W. Gao, K. Chua, J.K. Davies, H.J. Newton, T. Seemann, P.F. Harrison, N.E. Holmes, H.W. Rhee, J.I. Hong, E.L. Hartland, T.P. Stinear, B.P. Howden, Two Novel Point Mutations in Clinical Staphylococcus aureus Reduce Linezolid Susceptibility and Switch on the Stringent Response to Promote Persistent Infection, PLOS Pathog. 6 (2010) e1000944. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000944.

[134] X.S. Pan, P.J. Hamlyn, R. Talens-Visconti, F.L. Alovero, R.H. Manzo, L.M. Fisher, Small-colony mutants of Staphylococcus aureus allow selection of gyrase-mediated resistance to dual-target fluoroquinolones, Antimicrob. Agents Chemother. 46 (2002) 2498–2506. https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2498-2506.2002.

[135] S. Häaßler, M. Rohde, I. Steinmetz, Highly resistant Burkholderia pseudomallei small colony

variants isolated in vitro and in experimental melioidosis, Med. Microbiol. Immunol. 1999 1882. 188 (1999) 91–97. https://doi.org/10.1007/S004300050110.

[136] S. Häußler, B. Tümmler, H. Weißbrodt, M. Rohde, I. Steinmetz, Small-Colony Variants of Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis, Clin. Infect. Dis. 29 (1999) 621–625. https://doi.org/10.1086/598644.

[137] N. Wellinghausen, I. Chatterjee, A. Berger, A. Niederfuehr, R.A. Proctor, B.C. Kahl, Characterization of clinical Enterococcus faecalis small-colony variants, J. Clin. Microbiol. 47 (2009) 2802–2811. https://doi.org/10.1128/JCM.00485-09.

[138] A. Roggenkamp, A. Sing, M. Hornef, U. Brunner, I.B. Autenrieth, J. Heesemann, Chronic prosthetic hip infection caused by a small-colony variant of Escherichia coli, J. Clin. Microbiol. 36 (1998) 2530–2534. https://doi.org/10.1128/JCM.36.9.2530-2534.1998.

[139] E.L. Swingle, Studies on small colony variants of Staphylococcus aureus, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 31 (1934) 891–893. https://journals.asm.org/journal/jb.

[140] A. Nasser, T. Azimi, S. Ostadmohammadi, S. Ostadmohammadi, A comprehensive review of bacterial osteomyelitis with emphasis on Staphylococcus aureus, Microb. Pathog. 148 (2020) 104431. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104431.

[141] B. Rolauffs, T.M. Bernhardt, C. von Eiff, M.L. Hart, D. Bettin, Osteopetrosis, femoral fracture, and chronic osteomyelitis caused by Staphylococcus aureus small colony variants (SCV) treated by girdlestone resection--6-year follow-up, Arch. Orthop. Trauma Surg. 122 (2002) 547–550. https://doi.org/10.1007/S00402-002-0435-2.

[142] C. Von Eiff, D. Bettin, R.A. Proctor, B. Rolauffs, N. Lindner, W. Winkelmann, G. Peters, Recovery of small colony variants of Staphylococcus aureus following gentamicin bead placement for osteomyelitis, Clin. Infect. Dis. 25 (1997) 1250–1251. https://doi.org/10.1086/516962.

[143] C. Von Eiff, N. Lindner, R.A. Proctor, W. Winkelmann, G. Peters, Development of gentamicin-resistant Small Colony Variants of S. aureus after implantation of gentamicin chains in osteomyelitis as a possible cause of recurrence., Z. Orthop. Ihre Grenzgeb. 136 (1998) 268–271. https://doi.org/10.1055/s-2008-1054234.

[144] S. Vreugde, S. Peter Kidd, S. Le, F. Laurent, G. Loss, P. Martins Simões, F. Valour, M. Farrel Cortês, L. Gonzaga, M. Bergot, S. Trouillet-Assant, J. Josse, A. Diot, E. Ricci, A. Tereza Vasconcelos, Staphylococcus aureus Small Colony Variants (SCVs): News From a Chronic Prosthetic Joint Infection, Front. Cell. Infect. Microbiol. 9 (2019) 363. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00363.

[145] J.J. Hawkshead, N.B. Patel, R.W. Steele, S.D. Heinrich, Comparative severity of pediatric osteomyelitis attributable to methicillin-resistant versus methicillin-sensitive staphylococcus aureus, J. Pediatr. Orthop. 29 (2009) 85–90. https://doi.org/10.1097/BPO.0B013E3181901C3A.

[146] E.W. Campion, H. Peltola, M. Pääkkönen, Acute Osteomyelitis in Children, N. Engl. J. Med. 370 (2014) 352–360. https://doi.org/10.1056/NEJMRA1213956.

[147] L.O. Conterno, M.D. Turchi, Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults, Cochrane Database Syst. Rev. 9 (2013). https://doi.org/10.1002/14651858.CD004439.PUB3.

[148] J.F. Keating, A.H.R. W.Simpson, C.M. Robinson, The management of fractures with bone loss, J. Bone Surg. 87 (2005) 142–150. https://doi.org/10.1302/0301-620X.87B2.15874.

[149] A.H. Schmidt, Autologous bone graft: Is it still the gold standard?, Injury. 52 (2021) S18–S22. https://doi.org/10.1016/J.INJURY.2021.01.043.

[150] B. Parsons, E. Strauss, Surgical management of chronic osteomyelitis, Am. J. Surg. 188 (2004) 57–66. https://doi.org/10.1016/S0002-9610(03)00292-7.

[151] B. Spellberg, B.A. Lipsky, Systemic Antibiotic Therapy for Chronic Osteomyelitis in Adults, Clin. Infect. Dis. 54 (2012) 393–407. https://doi.org/10.1093/CID/CIR842.

[152] R.E. Barth, H.C. Vogely, A.I.M. Hoepelman, E.J.G. Peters, 'To bead or not to bead?' Treatment of osteomyelitis and prosthetic joint-associated infections with gentamicin bead chains, Int. J. Antimicrob. Agents. 38 (2011) 371–375. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2011.03.008.

[153] I. Uçkay, M. Assal, L. Legout, P. Rohner, R. Stern, D. Lew, P. Hoffmeyer, L. Bernard, Recurrent osteomyelitis caused by infection with different bacterial strains without obvious source of reinfection, J. Clin. Microbiol. 44 (2006) 1194–1196. https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1194-1196.2006.

[154] J.H. Calhoun, M.M. Manring, Adult Osteomyelitis, Infect. Dis. Clin. 19 (2005) 765–786. https://doi.org/10.1016/J.IDC.2005.07.009.

[155] R.N. Greenberg, M.T. Newman, S. Shariaty, R.W. Pectol, Ciprofloxacin, Lomefloxacin, or Levofloxacin as Treatment for Chronic Osteomyelitis, Antimicrob. Agents Chemother. 44 (2000) 164–166. https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.164-166.2000.

[156] A.D. Tice, P.A. Hoaglund, D.A. Shoultz, Risk factors and treatment outcomes in osteomyelitis, J. Antimicrob. Chemother. 51 (2003) 1261–1268. https://doi.org/10.1093/JAC/DKG186.

[157] L. Lazzarini, B.A. Lipsky, J.T. Mader, Antibiotic treatment of osteomyelitis: what have we learned from 30 years of clinical trials?, Int. J. Infect. Dis. 9 (2005) 127–138. https://doi.org/10.1016/J.IJID.2004.09.009.

[158] M. Panda, N. Ntungila, M. Kalunda, M. Hinsenkamp, Treatment of chronic osteomyelitis using the Papineau technique, Int. Orthop. 22 (1998) 37–40. https://doi.org/10.1007/S002640050204.

[159] V.L.L. Beckles, H. Wynn Jones, W.J. Harrison, Chronic haematogenous osteomyelitis in children: A retrospective review of 167 patients in Malawi, J. Bone Surg. 92 (2010) 1138–1143.

https://doi.org/10.1302/0301-620X.92B8.23413.

[160] B. Li, T.F. Moriarty, T. Webster, M. Xing, Racing for the Surface: Antimicrobial and Interface Tissue Engineering ,Tissue Eng. Regen. Med. Springer Nat. (2020).

[161] T. Kurien, R.G. Pearson, B.E. Scammell, Bone graft substitutes currently available in orthopaedic practice: The evidence for their use, Bone Jt. J. 95 B (2013) 583–597. https://doi.org/10.1302/0301-620X.95B5.30286.

[162] J.M. Rueger, Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead?, Unfallchirurg. 99 (1996) 228–236. https://europepmc.org/article/med/8685730.

[163] A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, N. Maffulli, Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions, J. Orthop. Surg. Res. 9 (2014) 1–27. https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18.

[164] A. Balamurugan, S. Rajeswari, G. Balossier, A.H.S. Rebelo, J.M.F. Ferreira, Corrosion aspects of metallic implants — An overview, Mater. Corros. 59 (2008) 855–869. https://doi.org/10.1002/MACO.200804173.

[165] A.C. McLaren, Alternative materials to acrylic bone cement for delivery of depot antibiotics in orthopaedic infections, Clin. Orthop. Relat. Res. 427 (2004) 101–106. https://doi.org/10.1097/01.BLO.0000143554.56897.26.

[166] J.S. Gogia, J.P. Meehan, P.E. Di Cesare, A.A. Jamali, Local Antibiotic Therapy in Osteomyelitis, Semin. Plast. Surg. 23 (2009) 100–107. https://doi.org/10.1055/S-0029-1214162.

[167] D.M. Scott, J.C. Rotschafer, F. Behrens, Use of Vancomycin and Tobramycin Polymethylmethacrylate Impregnated Beads in the Management of Chronic Osteomyelitis, Drug Intell. Clin. Pharm. 22 (2017) 480–483. https://doi.org/10.1177/106002808802200607.

[168] G. Lewis, J.L. Brooks, H.S. Courtney, Y. Li, W.O. Haggard, An approach for determining antibiotic loading for a physician-directed antibiotic-loaded PMMA bone cement formulation, Clin. Orthop. Relat. Res. 468 (2010) 2092–2100. https://doi.org/10.1007/S11999-010-1281-0.

[169] G. Lewis, S. Janna, Estimation of the optimum loading of an antibiotic powder in an acrylic bone cement: Gentamicin sulfate in SmartSet HV, New Pub Med. Journals Sweden. 77 (2009) 622–627. https://doi.org/10.1080/17453670610012700.

[170] K. Klemm, [Gentamicin-PMMA-beads in treating bone and soft tissue infections (author's transl)], Zentralbl. Chir. 104 (1979) 934–942. https://europepmc.org/article/med/494865.

[171] D. Neut, H. Van De Belt, I. Stokroos, J.R. Van Horn, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery, J. Antimicrob. Chemother. 47 (2001) 885–891. https://doi.org/10.1093/JAC/47.6.885.

[172] S. Sánchez-Salcedo, A. Nieto, M. Vallet-Regí, Hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate/agarose

macroporous scaffolds for bone tissue engineering, Chem. Eng. J. 137 (2008) 62–71. https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2007.09.011.

[173] M. Vallet-Regí, A.J. Salinas, Ceramics as bone repair materials, Bone Repair Biomater. (2019) 141–178. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102451-5.00006-8.

[174] L.L. Hench, The story of Bioglass®, in: J. Mater. Sci. Mater. Med. 17 (2006) 967–978. https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z.

[175] I. Izquierdo-Barba, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, Bioactive Glasses: From Macro to Nano, Int. J. Appl. Glas. Sci. 4 (2013) 149–161. https://doi.org/10.1111/IJAG.12028.

[176] U. Gross, J. Brandes, V. Strunz, I. Bab, J. Sela, The ultrastructure of the interface between a glass ceramic and bone, J. Biomed. Mater. Res. 15 (1981) 291–305. https://doi.org/10.1002/JBM.820150302.

[177] N.C. Lindfors, P. Hyvönen, M. Nyyssönen, M. Kirjavainen, J. Kankare, E. Gullichsen, J. Salo, Bioactive glass S53P4 as bone graft substitute in treatment of osteomyelitis, Bone. 47 (2010) 212–218. https://doi.org/10.1016/J.BONE.2010.05.030.

[178] L. Drago, D. Romanò, E. De Vecchi, C. Vassena, N. Logoluso, R. Mattina, C.L. Romanò, Bioactive glass bag-S53P4 for the adjunctive treatment of chronic osteomyelitis of the long bones: An in vitro and prospective clinical study, BMC Infect. Dis. 13 (2013) 1–8. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-584.

[179] J. McAndrew, C. Efrimescu, E. Sheehan, D. Niall, Through the looking glass; Bioactive glass S53P4 (BonAlive®) in the treatment of chronic osteomyelitis, Ir. J. Med. Sci. 182 (2013) 509–511. https://doi.org/10.1007/S11845-012-0895-5.

[180] J.C. Karr, J. Lauretta, G. Keriazes, In Vitro Antimicrobial Activity of Calcium Sulfate and Hydroxyapatite (Cerament Bone Void Filler) Discs Using Heat-Sensitive and Non–Heat-sensitive Antibiotics Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa, J. Am. Podiatr. Med. Assoc. 101 (2011) 146–152. https://doi.org/10.7547/1010146.

[181] M. Vallet-Regí, Evolution of bioceramics within the field of biomaterials, Comptes Rendus Chim. 13 (2010) 174–185. https://doi.org/10.1016/J.CRCI.2009.03.004.

[182] M. Vallet-Regí, Ceramics for medical applications, J. Chem. Soc. Dalt. Trans. 2 (2001) 97–108. https://doi.org/10.1039/B007852M.

[183] L.L. Hench, J.M. Polak, Third-generation biomedical materials, Science. 295 (2002). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1067404.

[184] T. Albrektsson, C. Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, Eur. Spine J. 10 (2001) S96–S101. https://doi.org/10.1007/S005860100282.

[185] P. Chandra, J.J. Yoo, S.J. Lee, Biomaterials in Regenerative Medicine: Challenges in Technology

Transfer from Science to Process Development, Transl. Regen. Med. (2015) 151–167. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410396-2.00013-X.

[186] L. Diaz-Gomez, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, C.A. García-González, Growth factors delivery from hybrid PCL-starch scaffolds processed using supercritical fluid technology, Carbohydr. Polym. 142 (2016) 282–292. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.01.051.

[187] A. Gloria, F. Causa, T. Russo, E. Battista, R. Della Moglie, S. Zeppetelli, R. De Santis, P.A. Netti, L. Ambrosio, Three-dimensional poly(ε-caprolactone) bioactive scaffolds with controlled structural and surface properties, Biomacromolecules. 13 (2012) 3510–3521. https://doi.org/10.1021/BM300818Y.

[188] H.S. Yun, S.E. Kim, Y.T. Hyeon, Design and preparation of bioactive glasses with hierarchical pore networks, Chem. Commun. 21 (2007) 2139–2141. https://doi.org/10.1039/B702103H.

[189] L.L. Hench, I.D. Xynos, J.M. Polak, Bioactive glasses for in situ tissue regeneration, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 15 (2012) 543–562. https://doi.org/10.1163/156856204323005352.

[190] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, J. Biomed. Mater. Res. 5 (1971) 117–141. https://doi.org/10.1002/JBM.820050611.

[191] A. García, I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, C.L. De Laorden, M. Vallet-Regí, Preparation of 3-D scaffolds in the SiO2–P2O5 system with tailored hierarchical meso-macroporosity, Acta Biomater. 7 (2011) 1265–1273. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2010.10.006.

[192] M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, A.J. Salinas, Glasses with Medical Applications, Eur. J. Inorg. Chem. 6 (2003) 1029–1042. https://doi.org/10.1002/ejic.200390134.

[193] J.R. Jones, Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, Acta Biomater. 9 (2013) 4457–4486. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2012.08.023.

[194] W. Cao, L.L. Hench, Bioactive materials, Ceram. Int. 22 (1996) 493–507. https://doi.org/10.1016/0272-8842(95)00126-3.

[195] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, J. Biomed. Mater. Res. 24 (1990) 721–734. https://doi.org/10.1002/JBM.820240607.

[196] Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials, J. Mater. Sci. 26 (2015) 115. https://www.iso.org/standard/65054.html.

[197] D. Arcos, M. Vila, A. López-Noriega, F. Rossignol, E. Champion, F.J. Oliveira, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glasses: Mechanical reinforcement by means of a biomimetic process, Acta Biomater. 7 (2011) 2952–2959. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2011.02.012.

[198] J.S. Beck, J.C. Vartuli, W.J. Roth, M.E. Leonowicz, C.T. Kresge, K.D. Schmitt, C.T.W. Chu, D.H.

Olson, E.W. Sheppard, S.B. McCullen, J.B. Higgins, J.L. Schlenker, A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 10834–10843. https://doi.org/10.1021/JA00053A020.

[199] M. Vallet-Regi, A. Rámila, R.P. Del Real, J. Pérez-Pariente, A New Property of MCM-41: Drug Delivery System, Chem. Mater. 13 (2000) 308–311. https://doi.org/10.1021/CM0011559.

[200] F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet-Regi, Confinement and controlled release of bisphosphonates on ordered mesoporous silica-based materials, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 8116–8117. https://doi.org/10.1021/JA062286Z.

[201] X. Feng, J.S. Lee, J.W. Lee, J.Y. Lee, D. Wei, G.L. Haller, Effect of pore size of mesoporous molecular sieves (MCM-41) on Al stability and acidity, Chem. Eng. J. Biochem. Eng. J. 64 (1996) 255–263. https://doi.org/10.1016/S0923-0467(96)03143-0.

[202] M. Vallet-Regí, Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine, J. Intern. Med. 267 (2010) 22–43. https://doi.org/10.1111/J.1365-2796.2009.02190.X.

[203] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, Highly Ordered Mesoporous Bioactive Glasses with Superior In Vitro Bone-Forming Bioactivities, Angew. Chemie Int. Ed. 43 (2004) 5980–5984. https://doi.org/10.1002/anie.200460598.

[204] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, Mesoporous Materials for Drug Delivery, Angew. Chemie Int. Ed. 46 (2007) 7548–7558. https://doi.org/10.1002/ANIE.200604488.

[205] C.J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, Evaporation-Induced Self-Assembly: Nanostructures Made Easy, Adv. Mater. 11 (1999) 579–585. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(199905)11:7<579::AID-ADMA579>3.0.CO;2-R.

[206] G.J.D.A.A. Soler-Illia, C. Sanchez, B. Lebeau, J. Patarin, Chemical Strategies To Design Textured Materials: from Microporous and Mesoporous Oxides to Nanonetworks and Hierarchical Structures, Chem. Rev. 102 (2002) 4093–4138. https://doi.org/10.1021/CR0200062.

[207] D. Grosso, F. Cagnol, G.J.D.A.A. Soler-Illia, E.L. Crepaldi, H. Amenitsch, A. Brunet-Bruneau, A. Bourgeois, C. Sanchez, Fundamentals of Mesostructuring Through Evaporation-Induced Self-Assembly, Adv. Funct. Mater. 14 (2004) 309–322. https://doi.org/10.1002/ADFM.200305036.

[208] J.M. Kim, G.D. Stucky, Synthesis of highly ordered mesoporous silica materials using sodium silicate and amphiphilic block copolymers, Chem. Commun. 13 (2000) 1159–1160. https://doi.org/10.1039/B002362K.

[209] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric sufactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 6024–6036. https://doi.org/10.1021/JA974025I.

[210] Z. Min, Z. Shichang, X. Chen, Z. Yufang, Z. Changqing, 3D-printed dimethyloxallyl glycine delivery

scaffolds to improve angiogenesis and osteogenesis, Biomater. Sci. 3 (2015) 1236–1244. https://doi.org/10.1039/C5BM00132C.

[211] C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang, Y. Xiao, Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity, Biomaterials. 34 (2013) 422-423. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.066.

[212] V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, Biomaterials. 26 (2005) 5474–5491. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.02.002.

[213] N. Gómez-Cerezo, S. Sánchez-Salcedo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, In vitro colonization of stratified bioactive scaffolds by pre-osteoblast cells, Acta Biomater. 44 (2016) 73–84. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2016.08.014.

[214] J. Peña, J. Román, M. Victoria Cabañas, M. Vallet-Regí, An alternative technique to shape scaffolds with hierarchical porosity at physiological temperature, Acta Biomater. 6 (2010) 1288–1296. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2009.10.049.

[215] S. Shruti, A.J. Salinas, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regi, Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium- and zinc-containing glasses, Acta Biomater. 9 (2013) 4836–4844. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.024.

[216] M.N. Gómez-Cerezo, J. Peña, S. Ivanovski, D. Arcos, M. Vallet-Regí, C. Vaquette, Multiscale porosity in mesoporous bioglass 3D-printed scaffolds for bone regeneration, Mater. Sci. Eng. C. 120 (2021) 111706. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.111706.

[217] F. Baino, G. Novajra, C. Vitale-Brovarone, Bioceramics and scaffolds: A winning combination for tissue engineering, Front. Bioeng. Biotechnol. 3 (2015) 202. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2015.00202/BIBTEX.

[218] T.J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios, Osteoblast adhesion on nanophase ceramics, Biomaterials. 20 (1999) 1221–1227. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00020-4.

[219] A.A. White, S.M. Best, Properties and characterisation of bone repair materials, Bone Repair Biomater. (2009) 121–153. https://doi.org/10.1533/9781845696610.2.121.

[220] S.J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering, Nat. Mater. 4 (2005) 518–524. https://doi.org/10.1038/nmat1421.

[221] J.R. Jones, P.D. Lee, L.L. Hench, Hierarchical porous materials for tissue engineering, Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci. 364 (2005) 263–281. https://doi.org/10.1098/RSTA.2005.1689.

[222] J. Roman, M.V. Cabañas, J. Peña, M. Vallet-Regí, Control of the pore architecture in three-dimensional hydroxyapatite-reinforced hydrogel scaffolds, Sci. Technol. Adv. Mater. 12 (2011)

45003–45012. https://doi.org/10.1088/1468-6996/12/4/045003.

[223] R.A. Martin, S. Yue, J. V. Hanna, P.D. Lee, R.J. Newport, M.E. Smith, J.R. Jones, Characterizing the hierarchical structures of bioactive solgel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration, Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci. 370 (2012) 1422–1443. https://doi.org/10.1098/RSTA.2011.0308.

[224] H. Xu, W. Cui, J. Chang, Fabrication of patterned PDLLA/PCL composite scaffold by electrospinning, J. Appl. Polym. Sci. 127 (2013) 1550–1554. https://doi.org/10.1002/APP.37505.

[225] A. Kumar, S. Mandal, S. Barui, R. Vasireddi, U. Gbureck, M. Gelinsky, B. Basu, Low temperature additive manufacturing of three dimensional scaffolds for bone-tissue engineering applications: Processing related challenges and property assessment, Mater. Sci. Eng. R Reports. 103 (2016) 1–39. https://doi.org/10.1016/J.MSER.2016.01.001.

[226] L.F. Wang, J.W. Rhim, S.I. Hong, Preparation of poly(lactide)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blend films using a solvent casting method and their food packaging application, LWT - Food Sci. Technol. 68 (2016) 454–461. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.12.062.

[227] Z. Fereshteh, Freeze-drying technologies for 3D scaffold engineering, Funct. 3D Tissue Eng. Scaffolds Mater. Technol. Appl. (2018) 151–174. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100979-6.00007-0.

[228] H. Elsayed, A.R. Romero, L. Ferroni, C. Gardin, B. Zavan, E. Bernardo, Bioactive Glass-Ceramic Scaffolds from Novel 'Inorganic Gel Casting' and Sinter-Crystallization, Mater. 10 (2017) 171. https://doi.org/10.3390/MA10020171.

[229] N. Thadavirul, P. Pavasant, P. Supaphol, Development of polycaprolactone porous scaffolds by combining solvent casting, particulate leaching, and polymer leaching techniques for bone tissue engineering, J. Biomed. Mater. Res. Part A. 102 (2014) 3379–3392. https://doi.org/10.1002/JBM.A.35010.

[230] T. Lu, Y. Li, T. Chen, Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, Int. J. Nanomedicine. 8 (2013) 337. https://doi.org/10.2147/IJN.S38635.

[231] T.G. Kim, H. Shin, D.W. Lim, Biomimetic Scaffolds for Tissue Engineering, Adv. Funct. Mater. 22 (2012) 2446–2468. https://doi.org/10.1002/ADFM.201103083.

[232] S.M. Giannitelli, D. Accoto, M. Trombetta, A. Rainer, Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering, Acta Biomater. 10 (2014) 580–594. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.10.024.

[233] R.L. Dahlin, F.K. Kasper, A.G. Mikos, Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering, Tissue Eng. Part B. Rev. 17 (2011) 349. https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2011.0238.

[234] F. Baino, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarone, Bioactive glass-based materials with hierarchical porosity for medical applications: Review of recent advances, Acta Biomater. 42 (2016) 18–32. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2016.06.033.

[235] S.M. Peltola, F.P.W. Melchels, D.W. Grijpma, M. Kellomäki, A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes, Ann. med. 40 (2009) 268–280. https://doi.org/10.1080/07853890701881788.

[236] A. Corker, H.C.H. Ng, R.J. Poole, E. García-Tuñón, 3D printing with 2D colloids: designing rheology protocols to predict 'printability' of soft-materials, Soft Matter. 15 (2019) 1444–1456. https://doi.org/10.1039/C8SM01936C.

[237] M.A. Skylar-Scott, J. Mueller, C.W. Visser, J.A. Lewis, Voxelated soft matter via multimaterial multinozzle 3D printing, Nat. 575 (2019) 330–335. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1736-8.

[238] J.M. Ortega, M. Golobic, J.D. Sain, J.M. Lenhardt, A.S. Wu, S.E. Fisher, L.X. Perez Perez, A.W. Jaycox, J.E. Smay, E.B. Duoss, T.S. Wilson, Active Mixing of Disparate Inks for Multimaterial 3D Printing, Adv. Mater. Technol. 4 (2019) 1800717. https://doi.org/10.1002/ADMT.201800717.

[239] M.N. Gómez-Cerezo, D. Lozano, D. Arcos, M. Vallet-Regí, C. Vaquette, The effect of biomimetic mineralization of 3D-printed mesoporous bioglass scaffolds on physical properties and in vitro osteogenicity, Mater. Sci. Eng. C. 109 (2020) 110572. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110572.

[240] C. Heras, S. Sanchez-Salcedo, D. Lozano, J. Peña, P. Esbrit, M. Vallet-Regi, A.J. Salinas, Osteostatin potentiates the bioactivity of mesoporous glass scaffolds containing Zn2+ ions in human mesenchymal stem cells, Acta Biomater. 89 (2019) 359–371. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.03.033.

[241] J. Zhang, S. Zhao, Y. Zhu, Y. Huang, M. Zhu, C. Tao, C. Zhang, Three-dimensional printing of strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for bone regeneration, Acta Biomater. 10 (2014) 2269–2281. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2014.01.001.

[242] X. Du, D. Wei, L. Huang, M. Zhu, Y. Zhang, Y. Zhu, 3D printing of mesoporous bioactive glass/silk fibroin composite scaffolds for bone tissue engineering, Mater. Sci. Eng. C. 103 (2019) 109731. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.05.016.

[243] M. Zhu, X. He, C. Xin, Y. Zhu, Z. Liu, 3D printing of an integrated triphasic MBG-alginate scaffold with enhanced interface bonding for hard tissue applications, J. Mater. Sci. Mater. Med. 31 (2020) 1–8. https://doi.org/10.1007/S10856-020-06459-6.

[244] Y. Zhang, L. Xia, D. Zhai, M. Shi, Y. Luo, C. Feng, B. Fang, J. Yin, J. Chang, C. Wu, Mesoporous bioactive glass nanolayer-functionalized 3D-printed scaffolds for accelerating osteogenesis and angiogenesis, Nanoscale. 7 (2015) 19207–19221. https://doi.org/10.1039/C5NR05421D.

[245] A. Baeza, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Biotinylation of silicon-doped hydroxyapatite: A new approach to protein fixation for bone tissue regeneration, Acta Biomater. 6 (2010) 743–749. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2009.09.004.

[246] P. Miranda, E. Saiz, K. Gryn, A.P. Tomsia, Sintering and robocasting of β-tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications, Acta Biomater. 2 (2006) 457–466. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2006.02.004.

[247] S. Michna, W. Wu, J.A. Lewis, Concentrated hydroxyapatite inks for direct-write assembly of 3-D periodic scaffolds, Biomaterials. 26 (2005) 5632–5639. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.02.040.

[248] V. DeStefano, S. Khan, A. Tabada, Applications of PLA in modern medicine, Eng. Regen. 1 (2020) 76–87. https://doi.org/10.1016/J.ENGREG.2020.08.002.

[249] S. Liu, S. Qin, M. He, D. Zhou, Q. Qin, H. Wang, Current applications of poly(lactic acid) composites in tissue engineering and drug delivery, Compos. Part B Eng. 199 (2020) 108238. https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2020.108238.

[250] E. Malikmammadov, T.E. Tanir, A. Kiziltay, V. Hasirci, N. Hasirci, PCL and PCL-based materials in biomedical applications, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 29 (2017) 863–893. https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1394711.

[251] L. Adam Dobrzanski, G. Chladek, W. Król, L. Dobrzański, A. Hudecki, G. Chladek, W. Król, A. Mertas, Biodegradable and antimicrobial polycaprolactone nanofibers with and without silver precipitates, Arch. Mater. Sci. Eng. 76 (2015) 5–26.

[252] J. Glowacki, S. Mizuno, Collagen scaffolds for tissue engineering, Biopolymers. 89 (2008) 338–344. https://doi.org/10.1002/BIP.20871.

[253] S.K.L. Levengood, M. Zhang, Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, J. Mater. Chem. B. 2 (2014) 3161–3184. https://doi.org/10.1039/C4TB00027G.

[254] M.G. Raucci, U. D'Amora, A. Ronca, C. Demitri, L. Ambrosio, Bioactivation Routes of Gelatin-Based Scaffolds to Enhance at Nanoscale Level Bone Tissue Regeneration, Front. Bioeng. Biotechnol. 7 (2019) 27. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00027.

[255] M.A. Teixeira, M.T.P. Amorim, H.P. Felgueiras, Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications, Polym. 12 (2020) 7. https://doi.org/10.3390/POLYM12010007.

[256] J.A. Lewis, J.E. Smay, J. Stuecker, J. Cesarano, Direct Ink Writing of Three-Dimensional Ceramic Structures, J. Am. Ceram. Soc. 89 (2006) 3599–3609. https://doi.org/10.1111/J.1551-2916.2006.01382.X.

[257] E. Feilden, C. Ferraro, Q. Zhang, E. García-Tuñón, E. D'Elia, F. Giuliani, L. Vandeperre, E. Saiz, 3D

Printing Bioinspired Ceramic Composites, Sci. Rep. 7 (2017). https://doi.org/10.1038/S41598-017-14236-9.

[258] L. Hao, D. Tang, T. Sun, W. Xiong, Z. Feng, K.E. Evans, Y. Li, Direct Ink Writing of Mineral Materials: A review, Int. J. Precis. Eng. Manuf. - Green Technol. 8 (2021) 665–685. https://doi.org/10.1007/S40684-020-00222-6.

[259] J.H. Choi, S. Lee, J.W. Lee, Non-Newtonian behavior observed via dynamic rheology for various particle types in energetic materials and simulant composites, Korea-Australia Rheol. J. 29 (2017) 9–15. https://doi.org/10.1007/S13367-017-0002-6.

[260] P.T. Smith, A. Basu, A. Saha, A. Nelson, Chemical modification and printability of shear-thinning hydrogel inks for direct-write 3D printing, Polymer. 152 (2018) 42–50. https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2018.01.070.

[261] S. Soares, J. Sousa, A. Pais, C. Vitorino, Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues, Front. Chem. 6 (2018) 360. https://doi.org/10.3389/FCHEM.2018.00360.

[262] C. Vichery, J.M. Nedelec, Bioactive Glass Nanoparticles: From Synthesis to Materials Design for Biomedical Applications, Materials. 9 (2016). https://doi.org/10.3390/MA9040288.

[263] L.D. Field, O.K. Nag, A. Sangtani, K.E. Burns, J.B. Delehanty, The role of nanoparticles in the improvement of systemic anticancer drug delivery, Ther. Deliv. 9 (2018) 527–545. https://doi.org/10.4155/TDE-2018-0015.

[264] P. Mora-Raimundo, M. Manzano, M. Vallet-Regí, Nanoparticles for the treatment of osteoporosis, AIMS Bioeng. 4 (2017) 259–274. https://doi.org/10.3934/BIOENG.2017.2.259.

[265] A. Baeza, M. Colilla, M. Vallet-Regí, Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery, Expert Opin. Drug Deliv. 12 (2015) 319–337. https://doi.org/10.1517/17425247.2014.953051.

[266] A. Zielinska, F. Carreiró, A.M. Oliveira, A. Neves, B. Pires, N. Venkatesh, A. Durazzo, M. Lucarini, P. Eder, A.M. Silva, A. Santini, E.B. Souto, Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology, Molecules. 25 (2020) 3731. https://doi.org/10.3390/MOLECULES25163731.

[267] X. Rong, Y. Xie, X. Hao, T. Chen, Y. Wang, Y. Liu, Applications of Polymeric Nanocapsules in Field of Drug Delivery Systems, Curr. Drug Discov. Technol. 8 (2011) 173–187. https://doi.org/10.2174/157016311796799008.

[268] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, Liposome: Classification, preparation, and applications, Nanoscale Res. Lett. 8 (2013) 1–9. https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102.

[269] S.H. Lee, B.H. Jun, Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine, Int. J. Mol.

Sci. 20 (2019) 865. https://doi.org/10.3390/IJMS20040865.

[270] A.J. Shnoudeh, I. Hamad, R.W. Abdo, L. Qadumii, A.Y. Jaber, H.S. Surchi, S.Z. Alkelany, Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles, Biomater. Bionanotechnol. (2019) 527–612. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9.

[271] T.W. Kim, P.W. Chung, I.I. Slowing, M. Tsunoda, E.S. Yeung, V.S.Y. Lin, Structurally ordered mesoporous carbon nanoparticles as transmembrane delivery vehicle in human cancer cells, Nano Lett. 8 (2008) 3724–3727. https://doi.org/10.1021/NL801976M

[272] C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism, Nat. 1992 3596397. 359 (1992) 710–712. https://doi.org/10.1038/359710a0.

[273] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, J. Colloid Interface Sci. 26 (1968) 62–69. https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5.

[274] C. Wu, Y. Zhang, X. Ke, Y. Xie, H. Zhu, R. Crawford, Y. Xiao, Bioactive mesopore-glass microspheres with controllable protein-delivery properties by biomimetic surface modification, J. Biomed. Mater. Res. A. 95 (2010) 476–485. https://doi.org/10.1002/JBM.A.32873.

[275] Y. Li, B.P. Bastakoti, Y. Yamauchi, Smart soft-templating synthesis of hollow mesoporous bioactive glass spheres, Chem. - A Eur. J. 21 (2015) 8038–8042. https://doi.org/10.1002/chem.201406570.

[276] D. Arcos, A. López-Noriega, E. Ruiz-Hernández, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered mesoporous microspheres for bone grafting and drug delivery, Chem. Mater. 21 (2009) 1000–1009. https://doi.org/10.1021/CM801649Z.

[277] Q. Hu, Y. Li, N. Zhao, C. Ning, X. Chen, Facile synthesis of hollow mesoporous bioactive glass sub-micron spheres with a tunable cavity size, Mater. Lett. 134 (2014) 130–133. https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2014.07.041.

[278] Y. Li, X. Chen, C. Ning, B. Yuan, Q. Hu, Facile synthesis of mesoporous bioactive glasses with controlled shapes, Mater. Lett. 161 (2015) 605–608. https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2015.09.057.

[279] H. suk Yun, S. hyun Kim, S. Lee, I. hyuck Song, Synthesis of high surface area mesoporous bioactive glass nanospheres, Mater. Lett. 64 (2010) 1850–1853. https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2010.04.053.

[280] Z. Hong, G.M. Luz, P.J. Hampel, M. Jin, A. Liu, X. Chen, J.F. Mano, Mono-dispersed bioactive glass nanospheres: Preparation and effects on biomechanics of mammalian cells, J. Biomed. Mater. Res. Part A. 95A (2010) 747–754. https://doi.org/10.1002/JBM.A.32898.

[281] M. Zhu, J. Shi, Q. He, L. Zhang, F. Chen, Y. Chen, An emulsification-solvent evaporation route to mesoporous bioactive glass microspheres for bisphosphonate drug delivery, J. Mater. Sci. 47 (2012) 2256–2263. https://doi.org/10.1007/S10853-011-6037-Z.

[282] X. Li, X. Chen, G. Miao, H. Liu, C. Mao, G. Yuan, Q. Liang, X. Shen, C. Ning, X. Fu, Synthesis of radial mesoporous bioactive glass particles to deliver osteoactivin gene, J. Mater. Chem. B. 2 (2014) 7045–7054. https://doi.org/10.1039/C4TB00883A.

[283] L. Pontiroli, M. Dadkhah, G. Novajra, I. Tcacencu, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarone, An aerosol-spray-assisted approach to produce mesoporous bioactive glass microspheres under mild acidic aqueous conditions, Mater. Lett. 190 (2017) 111–114. https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2016.12.125.

[284] H. Maeda, Y. Nakano, T. Kasuga, Preparation of CaO-SiO2 glass-ceramic spheres by electrospraying combined with sol-gel method, J. Nanomater. 2013 (2013). https://doi.org/10.1155/2013/463048.

[285] K. Zheng, A.R. Boccaccini, Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review, Adv. Colloid Interface Sci. 249 (2017) 363–373. https://doi.org/10.1016/J.CIS.2017.03.008.

[286] S. Liu, W. Gong, Y. Dong, Q. Hu, X. Chen, X. Gao, The effect of submicron bioactive glass particles on in vitro osteogenesis, RSC Adv. 5 (2015) 38830–38836. https://doi.org/10.1039/C5RA03786G.

[287] S.K. Misra, D. Mohn, T.J. Brunner, W.J. Stark, S.E. Philip, I. Roy, V. Salih, J.C. Knowles, A.R. Boccaccini, Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass® composites, Biomaterials. 29 (2008) 1750–1761. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.12.040.

[288] S.K. Misra, T. Ansari, D. Mohn, S.P. Valappil, T.J. Brunner, W.J. Stark, I. Roy, J.C. Knowles, P.D. Sibbons, E.V. Jones, A.R. Boccaccini, V. Salih, Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites, J. R. Soc. Interface. 7 (2010) 453–465. https://doi.org/10.1098/RSIF.2009.0255.

[289] Z. Hong, R.L. Reis, J.F. Mano, Preparation and in vitro characterization of scaffolds of poly(l-lactic acid) containing bioactive glass ceramic nanoparticles, Acta Biomater. 4 (2008) 1297–1306. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2008.03.007.

[290] G.R. Tan, S.S. Feng, D.T. Leong, The reduction of anti-cancer drug antagonism by the spatial protection of drugs with PLA–TPGS nanoparticles, Biomaterials. 35 (2014) 3044–3051. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.12.033.

[291] D. Fernando Hincapié-Rojas, S. Paola Rojas-Hernández, F. Castaño-González, K. Natalia Parra-Castaño, L. Rocío Giraldo-Torres, Mesoporous Silica Nanoparticles obtention, functionalization and biomedical applications: a review , Rev. DYNA. 87 (2020) 239–253.

https://doi.org/10.15446/dyna.v87n215.88586.

[292] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D.E. Discher, Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, Nat. Nanotechnol. 2 (2007) 249–255. https://doi.org/10.1038/nnano.2007.70.

[293] S. Labbaf, O. Tsigkou, K.H. Müller, M.M. Stevens, A.E. Porter, J.R. Jones, Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro, Biomaterials. 32 (2011) 1010–1018. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.08.082.

[294] A.A.R. De Oliveira, D.A. De Souza, L.L.S. Dias, S.M. De Carvalho, H.S. Mansur, M. De Magalhães Pereira, Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications, Biomed. Mater. 8 (2013) 025011. https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/2/025011.

[295] C. Wu, W. Fan, J. Chang, Functional mesoporous bioactive glass nanospheres: synthesis, high loading efficiency, controllable delivery of doxorubicin and inhibitory effect on bone cancer cells, J. Mater. Chem. B. 1 (2013) 2710–2718. https://doi.org/10.1039/C3TB20275E.

[296] F. Baino, S. Hamzehlou, S. Kargozar, Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going?, J. Funct. Biomater. 9 (2018) 25. https://doi.org/10.3390/JFB9010025.

[297] R. Brückner, M. Tylkowski, L. Hupa, D.S. Brauer, Controlling the ion release from mixed alkali bioactive glasses by varying modifier ionic radii and molar volume, J. Mater. Chem. B. 4 (2016) 3121–3134. https://doi.org/10.1039/C5TB02426A.

[298] C. Wu, J. Chang, Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors, J. Control. Release. 193 (2014) 282–295. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.026.

[299] M. Vallet-Regi, A.J. Salinas, Mesoporous bioactive glasses for regenerative medicine, Mater. Today Bio. 11 (2021) 100121. https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2021.100121.

[300] P. Habibovic, J.E. Barralet, Bioinorganics and biomaterials: Bone repair, Acta Biomater. 7 (2011) 3013–3026. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2011.03.027.

[301] G. Boivin, P. Deloffre, B. Perrat, G. Panczer, M. Boudeulle, Y. Mauras, P. Allain, Y. Tsouderos, P.J. Meunier, Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration, J. Bone Miner. Res. 11 (1996) 1302–1311. https://doi.org/10.1002/JBMR.5650110915.

[302] J.- Reginster, Strontium Ranelate in Osteoporosis, Curr. Pharm. Des. 8 (2005) 1907–1916. https://doi.org/10.2174/1381612023393639.

[303] S. Peng, G. Zhou, K.D.K. Luk, K.M.C. Cheung, Z. Li, W.M. Lam, Z. Zhou, W.W. Lu, Strontium Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through the Ras/MAPK

Signaling Pathway, Cell. Physiol. Biochem. 23 (2009) 165–174. https://doi.org/10.1159/000204105.

[304] M.S. Rybchyn, M. Slater, A.D. Conigrave, R.S. Mason, An Akt-dependent Increase in Canonical Wnt Signaling and a Decrease in Sclerostin Protein Levels Are Involved in Strontium Ranelate-induced Osteogenic Effects in Human Osteoblasts , J. Biol. Chem. 286 (2011) 23771–23779. https://doi.org/10.1074/JBC.M111.251116.

[305] S. Peng, X.S. Liu, G. Zhou, Z. Li, K.D.K. Luk, X.E. Guo, W.W. Lu, Osteoprotegerin deficiency attenuates strontium-mediated inhibition of osteoclastogenesis and bone resorption, J. Bone Miner. Res. 26 (2011) 1272–1282. https://doi.org/10.1002/JBMR.325.

[306] L. Mao, L. Xia, J. Chang, J. Liu, L. Jiang, C. Wu, B. Fang, The synergistic effects of Sr and Si bioactive ions on osteogenesis, osteoclastogenesis and angiogenesis for osteoporotic bone regeneration, Acta Biomater. 61 (2017) 217–232. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.08.015.

[307] S. Zhu, X. Hu, Y. Tao, Z. Ping, L. Wang, J. Shi, X. Wu, W. Zhang, H. Yang, Z. Nie, Y. Xu, Z. Wang, D. Geng, Strontium inhibits titanium particle-induced osteoclast activation and chronic inflammation via suppression of NF-κB pathway, Sci. Reports. 6 (2016) 1–11. https://doi.org/10.1038/srep36251.

[308] M. Yamaguchi, M.N. Weitzmann, The bone anabolic carotenoid p-hydroxycinnamic acid promotes osteoblast mineralization and suppresses osteoclast differentiation by antagonizing NF-κB activation, Int. J. Mol. Med. 30 (2012) 708–712. https://doi.org/10.3892/IJMM.2012.1043/HTML.

[309] E. Buache, F. Velard, E. Bauden, C. Guillaume, E. Jallot, J.M. Nedelec, D. Laurent-Maquin, P. Laquerriere, Effect of strontium-substituted biphasic calcium phosphate on inflammatory mediators production by human monocytes, Acta Biomater. 8 (2012) 3113–3119. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2012.04.045.

[310] C. Cardemi, I. Elgali, W. Xia, L. Emanuelsson, B. Norlindh, O. Omar, P. Thomsen, Strontium-Doped Calcium Phosphate and Hydroxyapatite Granules Promote Different Inflammatory and Bone Remodelling Responses in Normal and Ovariectomised Rats, PLoS One. 8 (2013) e84932. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0084932.

[311] L. Rink, P. Gabriel, Zinc and the immune system, Proc. Nutr. Soc. 59 (2000) 541–552. https://doi.org/10.1017/S0029665100000781.

[312] R.S. MacDonald, The Role of Zinc in Growth and Cell Proliferation, J. Nutr. 130 (2000) 1500S-1508S. https://doi.org/10.1093/JN/130.5.1500S.

[313] J. Eberle, S. Schmidmayer, R.G. Erben, M. Stangassinger, H.P. Roth, Skeletal Effects of Zinc Deficiency in Growing Rats, J. Trace Elem. Med. Biol. 13 (1999) 21–26.

https://doi.org/10.1016/S0946-672X(99)80019-4.

[314] J. Yu, L. Xu, K. Li, N. Xie, Y. Xi, Y. Wang, X. Zheng, X. Chen, M. Wang, X. Ye, Zinc-modified Calcium Silicate Coatings Promote Osteogenic Differentiation through TGF-β/Smad Pathway and Osseointegration in Osteopenic Rabbits, Sci. Reports. 7 (2017) 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03661-5.

[315] D. Zhu, Y. Su, M.L. Young, J. Ma, Y. Zheng, L. Tang, Biological Responses and Mechanisms of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Zn and Mg Biomaterials, ACS Appl. Mater. Interfaces. 9 (2017) 27453–27461. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.7B06654.

[316] X. Luo, D. Barbieri, N. Davison, Y. Yan, J.D. De Bruijn, H. Yuan, Zinc in calcium phosphate mediates bone induction: In vitro and in vivo model, Acta Biomater. 10 (2014) 477–485. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.10.011.

[317] Y. Qiao, W. Zhang, P. Tian, F. Meng, H. Zhu, X. Jiang, X. Liu, P.K. Chu, Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials, Biomaterials. 35 (2014) 6882–6897. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.04.101.

[318] A. Grandjean-Laquerriere, P. Laquerriere, E. Jallot, J.M. Nedelec, M. Guenounou, D. Laurent-Maquin, T.M. Phillips, Influence of the zinc concentration of sol–gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro, Biomaterials. 27 (2006) 3195–3200. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.01.024.

[319] A.S. Prasad, Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health, Front. Nutr. 1 (2014) 14. https://doi.org/10.3389/FNUT.2014.00014/BIBTEX.

[320] J. Chou, M. Komuro, J. Hao, S. Kuroda, Y. Hattori, B. Ben-Nissan, B. Milthorpe, M. Otsuka, Bioresorbable zinc hydroxyapatite guided bone regeneration membrane for bone regeneration, Clin. Oral Implants Res. 27 (2016) 354–360. https://doi.org/10.1111/CLR.12520.

[321] G. Jin, H. Cao, Y. Qiao, F. Meng, H. Zhu, X. Liu, Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 117 (2014) 158–165. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2014.02.025.

[322] Y. Xie, Y. He, P.L. Irwin, T. Jin, X. Shi, Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against Campylobacter jejuni, Appl. Environ. Microbiol. 77 (2011) 2325–2331. https://doi.org/10.1128/AEM.02149-10.

[323] T.J. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R.N. Grass, L.K. Limbach, A. Bruinink, W.J. Stark, In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 4374–4381. https://doi.org/10.1021/ES052069I.

[324] G. Borkow, J. Gabbay, Copper as a Biocidal Tool, Curr. Med. Chem. 12 (2005) 2163–2175. https://doi.org/10.2174/0929867054637617.

[325] F.H. Nielsen, New Essential Trace Elements for the Life Sciences, Nucl. Anal. Methods Life Sci. (1990) 599–611. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0473-2_65.

[326] J.Y. Uriu-Adams, C.L. Keen, Copper, oxidative stress, and human health, Mol. Aspects Med. 26 (2005) 268–298. https://doi.org/10.1016/J.MAM.2005.07.015.

[327] W. Feng, F. Ye, W. Xue, Z. Zhou, Y.J. Kang, Copper Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 Activity, Mol. Pharmacol. 75 (2009) 174–182. https://doi.org/10.1124/MOL.108.051516.

[328] P. Matak, S. Zumerle, M. Mastrogiannaki, S. El Balkhi, S. Delga, J.R.R. Mathieu, F. Canonne-Hergaux, J. Poupon, P.A. Sharp, S. Vaulont, C. Peyssonnaux, Copper Deficiency Leads to Anemia, Duodenal Hypoxia, Upregulation of HIF-2α and Altered Expression of Iron Absorption Genes in Mice, PLoS One. 8 (2013) e59538. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0059538.

[329] L. Finney, S. Vogt, T. Fukai, D. Glesne, Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 36 (2009) 88–94. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.04969.x.

[330] E. Mir, A.H. Nezhad, M.R Bekheirnia, E. Javadi, A.L.M. Bagher, A. Bahrami, A.A. Naderi, Adequate serum copper concentration could improve bone density, postpone bone loss and protect osteoporosis in women, Iran. J. Public Health. (2007) 24–29.

[331] J. Zhang, J. Huang, S. Xu, K. Wang, S. Yu, Effects of Cu^{2+} and pH on osteoclastic bone resorption in vitro , Prog. Nat. Sci. 13 (2003) 266–270. https://doi.org/10.1080/10020070312331343510.

[332] H. Nojiri, Y. Saita, D. Morikawa, K. Kobayashi, C. Tsuda, T. Miyazaki, M. Saito, K. Marumo, I. Yonezawa, K. Kaneko, T. Shirasawa, T. Shimizu, Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking, J. Bone Miner. Res. 26 (2011) 2682–2694. https://doi.org/10.1002/jbmr.489.

[333] W. Opsahl, H. Zeronian, M. Ellison, D. Lewis, R.B. Rucker, R.S. Riggins, Role of Copper in Collagen Cross-linking and Its Influence on Selected Mechanical Properties of Chick Bone and Tendon, J. Nutr. 112 (1982) 708–716. https://doi.org/10.1093/jn/112.4.708.

[334] M. Shi, Z. Chen, S. Farnaghi, T. Friis, X. Mao, Y. Xiao, C. Wu, Copper-doped mesoporous silica nanospheres, a promising immunomodulatory agent for inducing osteogenesis, Acta Biomater. 30 (2016) 334–344. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2015.11.033.

[335] S. Basith, B. Manavalan, G. Lee, S.G. Kim, S. Choi, Toll-like receptor modulators: a patent review (2006 – 2010), Expert Opin. Ther. Pat. 21 (2011) 927–944. https://doi.org/10.1517/13543776.2011.569494.

[336] J. Ye, J. He, C. Wang, K. Yao, Z. Gou, Copper-containing mesoporous bioactive glass coatings on orbital implants for improving drug delivery capacity and antibacterial activity, Biotechnol. Lett. 36 (2014) 961–968. https://doi.org/10.1007/s10529-014-1465-x.

[337] J.P. Ruparelia, A.K. Chatterjee, S.P. Duttagupta, S. Mukherji, Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, Acta Biomater. 4 (2008) 707–716. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2007.11.006.

[338] K.-Y. Yoon, J. Hoon Byeon, J.-H. Park, J. Hwang, Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles, Sci. Total Environ. 373 (2007) 572–575. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2006.11.007.

[339] J. Barker, I.B. Vipond, S.F. Bloomfield, Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces, J. Hosp. Infect. 58 (2004) 42–49. https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2004.04.021.

[340] J.O. Noyce, H. Michels, C.W. Keevil, Inactivation of Influenza A Virus on Copper versus Stainless Steel Surfaces, Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007) 2748. https://doi.org/10.1128/AEM.01139-06.

[341] A.A. Cortes, J.M. Zuñiga, The use of copper to help prevent transmission of SARS-coronavirus and influenza viruses. A general review, Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 98 (2020) 115176. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2020.115176.

[342] A.K.-A. Scientist, undefined 1990, Growth and form of the bacterial cell wall, JSTOR. (n.d.). https://www.jstor.org/stable/29774119.

[343] Y. Ohsumi, K. Kitamoto, Y. Anraku, Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion, J. Bacteriol. 170 (1988) 2676–2682. https://doi.org/10.1128/JB.170.6.2676-2682.1988.

[344] Z.G. Dan, H.W. Ni, B.F. Xu, J. Xiong, P.Y. Xiong, Microstructure and antibacterial properties of AISI 420 stainless steel implanted by copper ions, Thin Solid Films. 492 (2005) 93–100. https://doi.org/10.1016/J.TSF.2005.06.100.

[345] Y. Yoshida, S. Furuta, E. Niki, Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron, Biochim. Biophys. Acta. 1210 (1993) 81–88. https://doi.org/10.1016/0005-2760(93)90052-B.

[346] N. Hoshino, T. Kimura, A. Yamaji, T. Ando, Damage to the cytoplasmic membrane of Escherichia Coli by catechin-copper (II) complexes, Free Radic. Biol. Med. 27 (1999) 1245–1250. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00157-4.

[347] G. Tong, M. Yulong, G. Peng, X. Zirong, Antibacterial effects of the Cu(II)-exchanged montmorillonite on Escherichia coli K88 and Salmonella choleraesuis, Vet. Microbiol. 105 (2005) 113–122. https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.11.003.

[348] C.H. Hu, M.S. Xia, Adsorption and antibacterial effect of copper-exchanged montmorillonite on Escherichia coli K88, Appl. Clay Sci. 31 (2006) 180–184. https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2005.10.010.

[349] O. Krasnovskaya, A. Naumov, D. Guk, P. Gorelkin, A. Erofeev, E. Beloglazkina, A. Majouga, Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 3965. https://doi.org/10.3390/IJMS21113965.

[350] E. Sharifi, A. Bigham, S. Yousefiasl, M. Trovato, M. Ghomi, Y. Esmaeili, P. Samadi, A. Zarrabi, M. Ashrafizadeh, S. Sharifi, R. Sartorius, F. Dabbagh Moghaddam, A. Maleki, H. Song, T. Agarwal, T.K. Maiti, N. Nikfarjam, C. Burvill, V. Mattoli, M.G. Raucci, K. Zheng, A.R. Boccaccini, L. Ambrosio, P. Makvandi, Mesoporous Bioactive Glasses in Cancer Diagnosis and Therapy: Stimuli-Responsive, Toxicity, Immunogenicity, and Clinical Translation, Adv. Sci. (2021) 2102678. https://doi.org/10.1002/ADVS.202102678.

[351] L. Chang, Y. Liu, C. Wu, Copper-Doped Mesoporous Bioactive Glass for Photothermal Enhanced Chemotherapy, J. Biomed. Nanotechnol. 14 (2018) 786–794. https://doi.org/10.1166/JBN.2018.2542.

[352] L.B. Romero-Sánchez, M. Marí-Beffa, P. Carrillo, M.Á. Medina, A. Díaz-Cuenca, Copper-containing mesoporous bioactive glass promotes angiogenesis in an in vivo zebrafish model, Acta Biomater. 68 (2018) 272–285. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.12.032.

[353] A. Bari, N. Bloise, S. Fiorilli, G. Novajra, M. Vallet-Regí, G. Bruni, A. Torres-Pardo, J.M. González-Calbet, L. Visai, C. Vitale-Brovarone, Copper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent for bone regeneration, Acta Biomater. 55 (2017) 493–504. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.04.012.

[354] H. Palza, B. Escobar, J. Bejarano, D. Bravo, M. Diaz-Dosque, J. Perez, Designing antimicrobial bioactive glass materials with embedded metal ions synthesized by the sol–gel method, Mater. Sci. Eng. C. 33 (2013) 3795–3801. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2013.05.012.

[355] B.A.E. Ben–Arfa, S. Neto, I.M. Miranda Salvado, R.C. Pullar, J.M.F. Ferreira, Robocasting of Cu^{2+} & La^{3+} doped sol–gel glass scaffolds with greatly enhanced mechanical properties: Compressive strength up to 14 MPa, Acta Biomater. 87 (2019) 265–272. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.01.048.

[356] C. Wang, K. Jin, J. He, J. Wang, X. Yang, C. Yao, X. Dai, C. Gao, Z. Gou, J. Ye, Synergistic Effect of Copper-Containing Mesoporous Bioactive Glass Coating on Stimulating Vascularization of Porous Hydroxyapatite Orbital Implants in Rabbits, J. Biomed. Nanotechnol. 14 (2018) 688–697. https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2513.

[357] S.H. Wu, H.P. Lin, Synthesis of mesoporous silica nanoparticles, Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 3862–3875. https://doi.org/10.1039/C3CS35405A.

[358] D. Zeng, X. Zhang, X. Wang, Q. Huang, J. Wen, X. Miao, L. Peng, Y. Li, X. Jiang, The osteoimmunomodulatory properties of MBG scaffold coated with amino functional groups, Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 46 (2017) 1425–1435. https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1369428.

[359] X. Zhang, D. Zeng, N. Li, J. Wen, X. Jiang, C. Liu, Y. Li, Functionalized mesoporous bioactive glass scaffolds for enhanced bone tissue regeneration, Sci. Reports. 6 (2016) 1–12. https://doi.org/10.1038/srep19361.

[360] A. Vinu, K.Z. Hossain, K. Ariga, Recent advances in functionalization of mesoporous silica, J. Nanosci. Nanotechnol. 5 (2005) 347–371. https://doi.org/10.1166/JNN.2005.089.

[361] V. Biju, Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 744–764. https://doi.org/10.1039/C3CS60273G.

[362] P. Yang, S. Gai, J. Lin, Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 3679–3698. https://doi.org/10.1039/C2CS15308D.

[363] Z. Li, J.C. Barnes, A. Bosoy, J.F. Stoddart, J.I. Zink, Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 2590–2605. https://doi.org/10.1039/C1CS15246G.

[364] P. Tallury, K. Payton, S. Santra, Silica-based multimodal/multifunctional nanoparticles for bioimaging and biosensing applications, Nanomed. J. 3 (2008) 579–592. https://doi.org/10.2217/17435889.3.4.579.

[365] R. Subbiah, M. Veerapandian, K. S. Yun, Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences, Curr. Med. Chem. 17 (2011) 4559–4577. https://doi.org/10.2174/092986710794183024.

[366] K.T. Yong, R. Hu, I. Roy, H. Ding, L.A. Vathy, E.J. Bergey, M. Mizuma, A. Maitra, P.N. Prasad, Tumor Targeting and Imaging in Live Animals with Functionalized Semiconductor Quantum Rods, ACS Appl. Mater. Interfaces. 1 (2009) 710–719. https://doi.org/10.1021/AM8002318.

[367] G. Sanità, B. Carrese, A. Lamberti, Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization, Front. Mol. Biosci. 7 (2020) 381. https://doi.org/10.3389/FMOLB.2020.587012.

[368] I. Carmagnola, E. Ranzato, V. Chiono, Scaffold functionalization to support a tissue biocompatibility, Funct. 3D Tissue Eng. Scaffolds Mater. Technol. Appl. (2018) 255–277. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100979-6.00011-2.

[369] K. Anselme, Osteoblast adhesion on biomaterials, Biomaterials. 21 (2000) 667–681. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2.

[370] M. Martínez-Carmona, I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, M. Vallet-Regí, Concanavalin A-targeted mesoporous silica nanoparticles for infection treatment, Acta Biomater. 96 (2019) 547–556. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.07.001.

[371] H. Le, C. Arnoult, E. Dé, D. Schapman, L. Galas, D. Le Cerf, C. Karakasyan, Antibody-Conjugated Nanocarriers for Targeted Antibiotic Delivery: Application in the Treatment of Bacterial

Biofilms, Biomacromolecules. 22 (2021) 1639–1653. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.1C00082.

[372] E. Álvarez, M. Estévez, C. Jiménez-Jiménez, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, B. González, M. Vallet-Regí, A versatile multicomponent mesoporous silica nanosystem with dual antimicrobial and osteogenic effects, Acta Biomater. 136 (2021) 570–581. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2021.09.027.

[373] S. Sanchez-Salcedo, M. Vallet-Regí, S.A. Shahin, C.A. Glackin, J.I. Zink, Mesoporous core-shell silica nanoparticles with anti-fouling properties for ovarian cancer therapy, Chem. Eng. J. 340 (2018) 114–124. https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2017.12.116.

[374] S.S. Suri, H. Fenniri, B. Singh, Nanotechnology-based drug delivery systems, J. Occup. Med. Toxicol. 2 (2007) 1–6. https://doi.org/10.1186/1745-6673-2-16.

[375] P. Ball, Quinolone generations: natural history or natural selection?, J. Antimicrob. Chemother. 46 (2000) 17–24. https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JAC.A020889.

[376] K. Drlica, Mechanism of fluoroquinolone action, Curr. Opin. Microbiol. 2 (1999) 504–508. https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00008-9.

[377] K. Drlica, M. Malik, R.J. Kerns, X. Zhao, Quinolone-mediated bacterial death, Antimicrob. Agents Chemother. 52 (2008) 385–392. https://doi.org/10.1128/AAC.01617-06.

[378] K. Drlica, H. Hiasa, R. Kerns, M. Malik, A. Mustaev, X. Zhao, Quinolones: action and resistance updated, Curr. Top. Med. Chem. 9 (2009) 981–998. https://doi.org/10.2174/156802609789630947.

[379] P.E. Reynolds, Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8 (1989) 943–950. https://doi.org/10.1007/BF01967563.

[380] K.M. Krause, A.W. Serio, T.R. Kane, L.E. Connolly, Aminoglycosides: An Overview., Cold Spring Harb. Perspect. Med. 6 (2016). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029.

[381] E.A. Campbell, N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, S.A. Darst, Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase, Cell. 104 (2001) 901–912. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-0.

[382] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, Biomaterials. 32 (2011) 2757–2774. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004.

[383] I.D. Xynos, M.V.J. Hukkanen, J.J. Batten, L.D. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Bioglass ®45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation In Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering, Calcif. Tissue Int. 67 (2014) 321–329. https://doi.org/10.1007/S002230001134.

[384] I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution, J. Biomed. Mater. Res. 55 (2001) 151-157. https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:2<151::AID-JBM1001>3.0.CO;2-D

[385] C. Wu, J. Chang, Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application., Interface Focus. 2 (2012) 292–306. https://doi.org/10.1098/rsfs.2011.0121.

[386] E. O'Neill, G. Awale, L. Daneshmandi, O. Umerah, K.W.-H. Lo, The roles of ions on bone regeneration, Drug Discov. Today. 23 (2018) 879–890. https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2018.01.049.

[387] A. Hoppe, V. Mouriño, A.R. Boccaccini, Therapeutic inorganic ions in bioactive glasses to enhance bone formation and beyond, Biomater. Sci. 1 (2013) 254–256. https://doi.org/10.1039/c2bm00116k.

[388] E. Bonnelye, A. Chabadel, F. Saltel, P. Jurdic, Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro, Bone. 42 (2008) 129–138. https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.08.043.

[389] S. Padilla, S. Sánchez-Salcedo, M. Vallet-Regí, Bioactive glass as precursor of designed-architecture scaffolds for tissue engineering, J. Biomed. Mater. Res. Part A. 81A (2007) 224–232. https://doi.org/10.1002/jbm.a.30934.

[390] L. Fiocco, B. Michielsen, E. Bernardo, Silica-bonded apatite scaffolds from calcite-filled preceramic polymers, J. Eur. Ceram. Soc. 36 (2016) 3211–3218. https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2016.05.013.

[391] M. Cicuéndez, M.T. Portolés, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, New Nanocomposite System with Nanocrystalline Apatite Embedded into Mesoporous Bioactive Glass, Chem. Mater. 24 (2012) 1100–1106. https://doi.org/10.1021/cm203416x.

[392] Y. Zhang, L. Wei, J. Chang, R.J. Miron, B. Shi, S. Yi, C. Wu, Strontium-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds stimulating in vitro proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells and in vivo regeneration of osteoporotic bone defects, J. Mater. Chem. B. 1 (2013) 5711–5722. https://doi.org/10.1039/c3tb21047b.

[393] Ø.R. Riise, E. Kirkhus, K.S. Handeland, B. Flatø, T. Reiseter, M. Cvancarova, B. Nakstad, K.O. Wathne, Childhood osteomyelitis-incidence and differentiation from other acute onset musculoskeletal features in a population-based study, BMC Pediatr. 8 (2008) 1–10. https://doi.org/10.1186/1471-2431-8-45.

[394] P.K. Henke, S.A. Blackburn, R.W. Wainess, J. Cowan, A. Terando, M. Proctor, T.W. Wakefield, G.R. Upchurch, J.C. Stanley, L.J. Greenfield, H.C. Polk, J.M. Seeger, W.C. Lineaweaver,

Osteomyelitis of the foot and toe in adults is a surgical disease: Conservative management worsens lower extremity salvage, Ann. Surg. 241 (2005) 885–894. https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000164172.28918.3F.

[395] S. Hathroubi, M.A. Mekni, P. Domenico, D. Nguyen, M. Jacques, Biofilms: Microbial Shelters Against Antibiotics, Https://Home.Liebertpub.Com/Mdr. 23 (2017) 147–156. https://doi.org/10.1089/MDR.2016.0087.

[396] Q. Ye, W. Chen, H. Huang, Y. Tang, W. Wang, F. Meng, H. Wang, Y. Zheng, Iron and zinc ions, potent weapons against multidrug-resistant bacteria, Appl. Microbiol. Biotechnol. 104 (2020) 5213–5227. https://doi.org/10.1007/S00253-020-10600-4.

[397] R. Pérez, S. Sanchez-Salcedo, D. Lozano, C. Heras, P. Esbrit, M. Vallet-Regí, A.J. Salinas, Osteogenic Effect of ZnO-Mesoporous Glasses Loaded with Osteostatin., Nanomater. 8 (2018) 592. https://doi.org/10.3390/nano8080592.

[398] M. Yamaguchi, Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis, Mol. Cell. Biochem. 338 (2010) 241–254. https://doi.org/10.1007/S11010-009-0358-0.

[399] J. Pasquet, Y. Chevalier, E. Couval, D. Bouvier, G. Noizet, C. Morlière, M.A. Bolzinger, Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties, Int. J. Pharm. 460 (2014) 92–100. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2013.10.031.

[400] Y. Hu, Y. Du, H. Jiang, G.S. Jiang, Cerium promotes bone marrow stromal cells migration and osteogenic differentiation via Smad1/5/8 signaling pathway, Int. J. Clin. Exp. Pathol. 7 (2014) 5369. /pmc/articles/PMC4152115/.

[401] E. Verron, J.M. Bouler, J.C. Scimeca, Gallium as a potential candidate for treatment of osteoporosis, Drug Discov. Today. 17 (2012) 1127–1132. https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2012.06.007.

[402] C. Bonchi, F. Imperi, F. Minandri, P. Visca, E. Frangipani, Repurposing of gallium-based drugs for antibacterial therapy, BioFactors. 40 (2014) 303–312. https://doi.org/10.1002/BIOF.1159.

[403] M.L.F. Capati, A. Nakazono, K. Igawa, K. Ookubo, Y. Yamamoto, K. Yanagiguchi, S. Kubo, S. Yamada, Y. Hayashi, Boron Accelerates Cultured Osteoblastic Cell Activity through Calcium Flux, Biol. Trace Elem. Res. 174 (2016) 300–308. https://doi.org/10.1007/S12011-016-0719-Y.

[404] M. Dzondo-Gadet, R. Mayap-Nzietchueng, K. Hess, P. Nabet, F. Belleville, B. Dousset, Action of boron at the molecular level, Biol. Trace Elem. Res. 85 (2002) 23–33. https://doi.org/10.1385/BTER:85:1:23.

[405] N.M. Lowe, W.D. Fraser, M.J. Jackson, Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis?, Proc. Nutr. Soc. 61 (2002) 181–185. https://doi.org/10.1079/PNS2002154.

[406] D.C. Rigiracciolo, A. Scarpelli, R. Lappano, A. Pisano, M.F. Santolla, P. De Marco, F. Cirillo, A.R. Cappello, V. Dolce, A. Belfiore, M. Maggiolini, E.M. De Francesco, Copper activates HIF-1α/GPER/VEGF signalling in cancer cells, Oncotarget. 6 (2015) 34158. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5779.

[407] A. Gupta, S. Lutsenko, Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential, Future Med. Chem. 1 (2009) 1125. https://doi.org/10.4155/FMC.09.84.

[408] Z. Wu, X. Zhou, Y. Zhang, J. Luan, X. Yang, Z. Wu, B. Wang, Synthesis and characterization of mesoporous bioactive glasses with highly ordered structures and high surface areas by a self-assembly process, J. Non. Cryst. Solids. 517 (2019) 1–8. https://doi.org/10.1016/J.JNONCRYSOL.2019.05.007.

[409] R. Koohkan, T. Hooshmand, M. Tahriri, D. Mohebbi-Kalhori, Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous copper silicate bioactive glasses, Ceram. Int. 44 (2018) 2390–2399. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.10.208.

[410] W. Xia, J. Chang, Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system, 110 (2006) 522–530. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.11.002.

[411] A. Philippart, N. Gómez-Cerezo, D. Arcos, A.J. Salinas, E. Boccardi, M. Vallet-Regi, A.R. Boccaccini, Novel ion-doped mesoporous glasses for bone tissue engineering: Study of their structural characteristics influenced by the presence of phosphorous oxide, J. Non. Cryst. Solids. 455 (2017) 90–97. https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2016.10.031.

[412] Z. ALOthman, A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials, Materials (Basel). 5 (2012) 2874–2902. https://doi.org/10.3390/ma5122874.

[413] H. Luo, J. Xiao, M. Peng, Q. Zhang, Z. Yang, H. Si, Y. Wan, One-pot synthesis of copper-doped mesoporous bioglass towards multifunctional 3D nanofibrous scaffolds for bone regeneration, J. Non. Cryst. Solids. 532 (2020) 119856. https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2019.119856.

[414] C. Wang, K. Jin, J. He, J. Wang, X. Yang, C. Yao, X. Dai, C. Gao, Z. Gou, J. Ye, Synergistic effect of copper-containing mesoporous bioactive glass coating on stimulating vascularization of porous hydroxyapatite orbital implants in rabbits, J. Biomed. Nanotechnol. 14 (2018) 688–697. https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2513.

[415] C. Heras, J. Jiménez-Holguín, A.L. Doadrio, M. Vallet-Regí, S. Sánchez-Salcedo, A.J. Salinas, Multifunctional antibiotic- and zinc-containing mesoporous bioactive glass scaffolds to fight bone infection, Acta Biomater. 114 (2020) 395–406. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.07.044.

[416] G.G. Zhanel, A. Walkty, L. Vercaigne, J.A. Karlowsky, J. Embil, A.S. Gin, D.J. Hoban, The new fluoroquinolones: A critical review, Can. J. Infect. Dis. 10 (1999) 207. https://doi.org/10.1155/1999/378394.

[417] M.G. Papich, Danofloxacin Mesylate, Papich Handb. Vet. Drugs. (2021) 231–232. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-70957-6.00135-7.

[418] L. Polo, N. Gómez-Cerezo, E. Aznar, J.L. Vivancos, F. Sancenón, D. Arcos, M. Vallet-Regí, R. Martínez-Máñez, Molecular gates in mesoporous bioactive glasses for the treatment of bone tumors and infection, Acta Biomater. 50 (2017) 114–126. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2016.12.025.

[419] A. Aguilar-Colomer, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, C. Jiménez-Jiménez, I. Mahillo, J. Esteban, M. Vallet-Regí, Impact of the antibiotic-cargo from MSNs on gram-positive and gram-negative bacterial biofilms, Microporous Mesoporous Mater. 311 (2021) 110681. https://doi.org/10.1016/J.MICROMESO.2020.110681.

[420] M. Ekkapongpisit, A. Giovia, C. Follo, G. Caputo, C. Isidoro, Biocompatibility, endocytosis, and intracellular trafficking of mesoporous silica and polystyrene nanoparticles in ovarian cancer cells: effects of size and surface charge groups, Int. J. Nanomedicine. 7 (2012) 4147. https://doi.org/10.2147/IJN.S33803.

[421] J. Popara, L. Accomasso, E. Vitale, C. Gallina, D. Roggio, A. Iannuzzi, S. Raimondo, R. Rastaldo, G. Alberto, F. Catalano, G. Martra, V. Turinetto, P. Pagliaro, C. Giachino, Silica nanoparticles actively engage with mesenchymal stem cells in improving acute functional cardiac integration, Nanomedicine. 13 (2018) 1121–1138. https://doi.org/10.2217/NNM-2017-0309.